

Structuration de la diversité génétique de *Hedysarum flexuosum* en Algérie et au Maroc. Implications sur sa conservation

N. Ben Fadhel, M. Afif, M. Boussaïd

Hedysarum flexuosum, utile pour la création et la valorisation de parcours, est représentée en Algérie et au Maroc par un nombre réduit de populations menacées de disparition. L'analyse du polymorphisme isoenzymatique de 5 populations naturelles permet d'estimer leur diversité génétique, d'évaluer leur degré de différenciation et de préciser les programmes de sauvegarde de l'espèce.

RÉSUMÉ

L'analyse de la structure génétique de 5 populations naturelles (1 algérienne et 4 marocaines) a été abordée par l'étude du polymorphisme de 6 systèmes enzymatiques (par électrophorèse horizontale sur gel d'amidon). 20 loci, dont 15 se sont avérés polymorphes, ont été détectés. La diversité génétique intra-population est importante. Un écart significatif par rapport à la panmixie, par défaut d'hétérozygotes, est observé chez les populations. Une structuration génétique importante entre les populations est révélée. Les stratégies de conservation de l'espèce doivent donc s'appuyer sur la collecte d'un maximum d'individus à l'intérieur des populations ayant montré des taux élevés de polymorphisme.

MOTS CLÉS

Algérie, *Hedysarum flexuosum*, légumineuse, Maroc, marqueur isoenzymatique, population naturelle, ressources génétiques, variabilité génétique, zone semi-aride, zone méditerranéenne

KEY-WORDS

Algeria, genetic resources, genetic variability, *Hedysarum flexuosum*, isoenzymatic marker, legume, Mediterranean region, molecular marker, Morocco, natural population, semi-arid region

AUTEURS

Laboratoire de Biotechnologie Végétale, Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie, Tunis cedex (Tunisie)

CORRESPONDANCE

M. Boussaïd, Laboratoire de Biotechnologie Végétale, Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie, BP 676, 1080 Tunis cedex, Tunisie ; mohamed.boussaid@insat.rnu.tn

Le genre *Hedysarum* L., fabacée pastorale, comprend deux groupes d'espèces, un groupe asiatique et arctique (nombre chromosomique de base $x = 7$) et un groupe méditerranéen ($x = 8$; BOUSSAÏD *et al.*, 1995). Onze espèces (*H. naudinianum* Coss., *H. perrauderianum* Coss., *H. humile* L., *H. membranaceum* Coss., *H. flexuosum* L., *H. pallidum* Desf., *H. coronarium* L., *H. carnosum* Desf., *H. spinosissimum* L., *H. glomeratum* L. et *H. aculeolatum* Mumby.) ont été décrites dans la flore de l'Afrique du Nord (MAIRE, 1958; POTTIER-ALAPETITE, 1979). Un nombre limité d'entre elles est utilisé pour la création de parcours, la valorisation des jachères ou la réhabilitation des terres dégradées en milieux semi-arides et arides de l'Afrique du Nord (BOUSSAÏD *et al.*, 1995).

1. Caractéristiques et intérêt de *Hedysarum flexuosum* en zone semi-aride

Hedysarum flexuosum L., espèce annuelle, diploïde ($2n = 16$) et préférentiellement allogame, présente une morphologie proche des formes cultivées d'*H. coronarium* (sulla) (BOUSSAÏD *et al.*, 1995). Ses fleurs pourpres violacées sont de petite taille (8-12 mm) et fréquemment butinées par les abeilles. Les gousses (1-3 cm) sont flexueuses.

Les populations naturelles de *Hedysarum flexuosum*, de port érigé (facilitant le fauchage), assurent un pâturage hivernal et printanier de bonne valeur nutritive (ABDELGUERFI-BERRAKIA *et al.*, 1991). L'espèce peut participer à la valorisation des jachères et à leur enrichissement en azote organique ainsi qu'à la protection des sols marneux et marno-calcaires en pente (souvent dénudés) et des abords des forêts (pin d'Alep et genévrier de Phœnicie essentiellement) (KILLIAN, 1939; BOUSSAÏD *et al.*, 1995; ABDELGUERFI-BERRAKIA *et al.*, 1991).

Dans le bassin méditerranéen, **l'aire de répartition de l'espèce est relativement limitée**. Elle s'étend du sud de la péninsule ibérique à l'Afrique du Nord (KILLIAN, 1939; BOUSSAÏD *et al.*, 1995; ABDELGUERFI-BERRAKIA *et al.*, 1991). L'espèce est absente en Libye, Tunisie, Egypte et en Mauritanie. En Algérie et au Maroc, l'espèce se développe sur des substrats marneux et marno-calcaires dans des régions où la pluviométrie moyenne annuelle est supérieure à 550 mm (ABDELGUERFI-BERRAKIA *et al.*, 1991). Au Maroc, l'espèce est représentée par des populations de taille réduite couvrant 1 à 3 ha chacune, particulièrement dans les régions de Tanger, Tétouan et Asilah. En Algérie, l'espèce est plus représentée. Elle abonde sur les pentes septentrionales de l'Atlas mitidjien et manque sur les hauts plateaux et au désert. L'étendue des populations varie souvent selon l'état de dégradation des sites. Mais, d'une façon générale, les populations sont surpâturées ou récoltées au stade végétatif pour l'alimentation du bétail (BOUSSAÏD *et al.*, 1995).

La diminution de la taille des populations, sous l'influence des pressions anthropiques croissantes, accélère les **risques d'érosion génétique chez cette espèce**. Des mesures de sauvegarde et d'exploitation rationnelle des populations sont donc nécessaires pour assurer leur maintien. L'analyse de la variabilité génétique des populations par

des marqueurs génétiques (morphologiques, isoenzymatiques et moléculaires) fournirait des informations utiles permettant de comprendre leur évolution et d'élaborer des stratégies de conservation.

L'analyse de la variation phénotypique de populations marocaines et algériennes d'*H. flexuosum* a révélé une **forte variabilité de nombreux traits morphologiques** (longueur de la tige principale, longueur des rameaux latéraux, nombre moyen de folioles par feuille, précocité...) selon l'origine géographique des populations (Maroc ou Algérie) (BEN FADHEL *et al.*, 1997). Une forte différenciation des populations au sein d'une même aire géographique (Maroc ou Algérie) ou entre les deux pays est observée (BEN FADHEL *et al.*, 1997). Les populations algériennes se distinguent notamment par un port érigé, une ramification intense et des feuilles à nombre élevé de folioles.

L'analyse du polymorphisme isoenzymatique des populations naturelles d'*H. flexuosum*, objet du présent travail, permet d'affiner les résultats de l'analyse de la variabilité phénotypique. Contrairement aux traits phénotypiques, les isozymes sont codominants, polymorphes et neutres vis-à-vis des facteurs du milieu (HAMRICK et GODT, 1989), mais peuvent être aussi sélectifs (WENDEL et WEEDEN, 1989 ; SOLTIS et SOLTIS, 1991). Ils constituent un moyen utile permettant d'estimer la diversité génétique des populations, d'évaluer leur degré de différenciation et d'appuyer les programmes de sauvegarde et d'amélioration de l'espèce (PERNÈS, 1984 ; PASTEUR *et al.*, 1987 ; BATISTA *et al.*, 2001 ; HEDRICK, 2001).

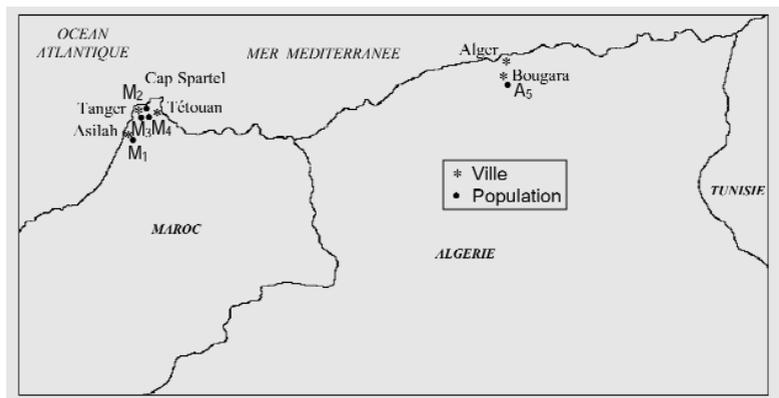
2. Matériel et méthodes

■ Populations analysées et échantillonnage

Les prospections que nous avons effectuées en Algérie et au Maroc, nous ont permis de repérer uniquement cinq populations (figure 1), en dépit de nos larges explorations des régions où l'espèce a été signalée. Les populations sont de taille réduite (100 à 300 individus). Nous avons collecté **une population algérienne** (A₅, région de Bougara) **et quatre populations marocaines** (M₁, M₂, M₃ et M₄). La population M₁ est originaire de la région d'Asilah ; M₂ a été prélevée à 12 km de Tanger ; M₃ et M₄ proviennent d'un même site (à 8 km de

FIGURE1 : Localisation géographique des 5 populations d'*Hedysarum flexuosum* analysées.

FIGURE 1 : Geographical location of the 5 populations of *Hedysarum flexuosum* analysed.



Tanger). M₃ se développait dans une plaine, en population dense (40 pieds/m²) alors que M₄ poussait sur un talus, avec des individus épars (1 individu/20 m²).

Des gousses, constituées de 1 à 3 articles renfermant chacun une graine, ont été prélevées sur 30 à 40 individus par population. Une gousse par individu a été choisie au hasard. Une graine par gousse a été utilisée pour l'analyse enzymatique.

■ Electrophorèse des isozymes et systèmes analysés

L'analyse du polymorphisme isoenzymatique a été abordée par la technique d'électrophorèse horizontale sur gel d'amidon à 13% (PASTEUR *et al.*, 1987). Les graines sont mises à germer, pendant une semaine, dans des boîtes de Petri, sur du papier filtre imbibé d'eau distillée. Chaque plantule (2 à 5 cm avec des cotylédons étalés) est broyée à froid dans un tampon ascorbate de sodium (0,1 mol/l, pH 8,4) additionné de 0,03% de β -mercaptoéthanol et 16,7% de saccharose. L'homogénat est centrifugé à 4°C, à une vitesse de 1 800 tr/mn pendant 20 minutes. Le surnageant contenant les protéines est récupéré. Des rectangles de papier Whatman (1 x 0,5 cm²) sont imbibés d'extraits protéiques puis introduits dans des fentes pratiquées à 2 cm du front supérieur du gel.

Six systèmes enzymatiques ont été révélés : la malate deshydrogénase (MDH ; EC1.1.1.37), l'alcool deshydrogénase (ADH ; EC1.1.1.1), la 6 phosphogluconate deshydrogénase (6PGD ; EC1.1.1.44), l'isocitrate deshydrogénase (ICD ; EC1.1.1.42), la glutamate oxaloacétate transaminase (GOT ; EC2.6.1.1) et les estérases (EST ; EC3.1.1.2). La séparation de la GOT, de l'ADH et des estérases a été réalisée avec tampon gel tris citrate (pH 8,3) et un tampon de migration lithium borate (0,04 mol/l d'hydroxyde de lithium et 0,19 mol/l d'acide borique, pH 8,3) (CARDY *et al.*, 1980). La 6PGD, l'ICD et la MDH ont été séparées en utilisant un tampon de gel et un tampon de migration histidine citrate (0,065 mol/l de L-histidine et 0,02 mol/l d'acide citrique, pH 6,5) (1980 ; SOLTIS et SOLTIS, 1991). La migration, anodique, se déroule à ampérage constant (50 mA) et dure 6 heures. Après la migration, le gel est découpé en tranches (2 mm d'épaisseur). Chaque tranche est incubée, à l'obscurité, pendant 30 à 45 minutes, à 37°C, dans une solution de révélation contenant un substrat spécifique de chaque enzyme. Les solutions de révélation des différents enzymes sont celles préconisées par STUBER *et al.* (1988), WENDEL et WEEDEN (1989).

■ Méthodes d'interprétation des résultats

A partir de l'ensemble des zymogrammes, nous avons émis **des hypothèses sur le déterminisme génétique des différents isozymes** analysés, selon les principes avancés par PERNÈS, PASTEUR *et al.*, et WENDEL et WEEDEN. Pour chaque système enzymatique observé chez l'ensemble des populations, nous avons préconisé son déterminisme génétique en tenant compte du nombre et du niveau de migration des bandes et de la structure mono ou dimérique de l'enzyme (WENDEL et WEEDEN). Pour chaque locus, lorsque l'enzyme est monomérique, les individus homozygotes présentent une bande et les hétérozygotes,

deux. Si l'enzyme est dimérique, les homozygotes présentent une bande et les hétérozygotes, trois. Hormis les estérases, qui présentent une structure monomérique (rarement dimérique), tous les autres systèmes que nous avons analysés sont à structure dimérique (PERNÈS, PASTEUR *et al.*, et WENDEL et WEEDEN). Concernant les estérases, vu la difficulté d'interprétation des zymogrammes, nous avons tenu compte uniquement de la présence/absence des bandes et considéré chaque bande comme un locus.

Notre interprétation génétique des zymogrammes a tenu aussi compte de celle rapportée pour les mêmes enzymes chez des espèces végétales diploïdes, plus particulièrement celles appartenant au genre *Hedysarum* (TRIFI-FARAH *et al.*, 1989 ; BAATOUT *et al.*, 1990). Chez *Hedysarum coronarium*, espèce très proche de l'*H. flexuosum*, l'ADH est contrôlée par un seul locus, la MDH par 4 loci dont 3 sont monomorphes, l'ICD par un seul locus, la 6PGD par 3 loci, la GOT par 5 loci et les estérases par 13 loci (TRIFI-FARAH *et al.*, 1989).

Pour chaque système enzymatique, les loci identifiés sont désignés respectivement par les chiffres 1, 2, 3..., selon leur vitesse de migration anodique. Les allèles, pour chaque locus, sont codés par des lettres a, b, c..., selon leur vitesse de migration vers l'anode.

Pour chaque système polymorphe, nous avons calculé les **fréquences génotypiques**. La matrice des données a été traitée par le programme informatique Biosys-1 (SWOFFORD et SELANDER, 1981) pour calculer les fréquences alléliques, le nombre moyen d'allèles par locus polymorphe (A_p), le pourcentage de loci polymorphes et les taux moyens d'hétérozygotie observée (H_o) et attendue (H_e) sous l'équilibre de Hardy-Weinberg. La déviation par rapport à la panmixie, pour chaque population, a été estimée par l'indice (F_{IS}) de fixation de WRIGHT (1951) : $F_{IS} = 1 - H_o/H_e$. La signification de l'écart par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg a été évaluée après des permutations par le Jackknif (GOUDET, 1995).

La **structure génétique des populations** est évaluée par les F-statistics de WRIGHT (1951) : F_{IT} (paramètre de différenciation globale de toutes les subdivisions), F_{IS} (paramètre de différenciation dans les populations) et F_{ST} (indice de différenciation entre les populations) selon les estimations de WEIR et COCKERHAM (1984) : $F = F_{IT}$, $\theta = F_{ST}$ et $f = F_{IS}$. Le calcul de ces indices et de leur niveau de signification statistique, après randomisations par le Jackknif, a été effectué par le programme FSTAT (GOUDET, 1995 et 2001). La **divergence génétique** entre les populations a été évaluée à travers les indices d'identité génétique non biaisés (NEI, 1978) calculés entre les différentes paires des populations analysées.

3. Résultats

■ Diversité génétique intrapopulation

Pour les six systèmes enzymatiques analysés, **20 loci ont été détectés**. Un locus monomorphe pour l'ADH, 3 loci dont un monomorphe et 2 polymorphes pour la 6-PGD, 6 loci dont 5 sont polymorphes

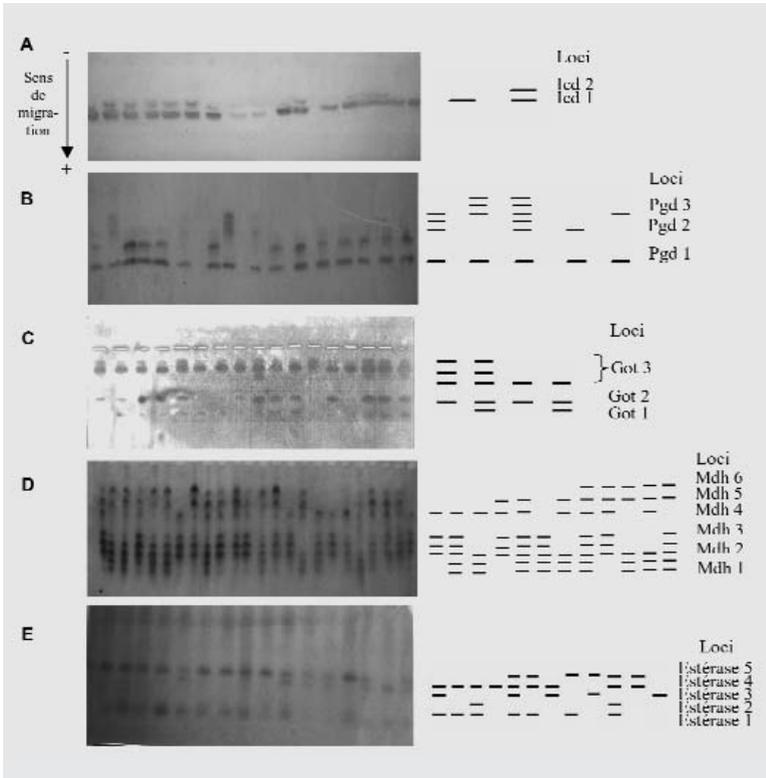


FIGURE 2 : Exemples de zymogrammes avec les profils types révélés chez les populations d'*Hedysarum flexuosum* analysées.

FIGURE 2 : Examples of zymogrammes with the typical profiles revealed in the populations of *Hedysarum flexuosum* analysed.

TABLEAU 1 : Fréquences alléliques pour les 15 loci polymorphes détectés chez les 5 populations d'*Hedysarum flexuosum* analysées.

TABLE 1 : Allelic frequencies in the 15 polymorphous loci detected in the 5 populations of *Hedysarum flexuosum* analysed.

Populations	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	A ₅	Populations	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	A ₅
Icd-2						Mdh-4					
a	0,000	0,000	0,000	0,821	0,829	a	1,000	1,000	0,951	1,000	0,842
b	1,000	1,000	1,000	0,179	0,171	b	0,000	0,000	0,049	0,000	0,158
6-Pgd-2						Mdh-5					
a	0,620	0,645	0,588	0,474	0,526	a	0,000	0,174	0,463	0,026	0,579
b	0,380	0,355	0,412	0,526	0,474	b	1,000	0,826	0,537	0,974	0,421
6-Pgd-3						Mdh-6					
a	0,641	0,576	0,824	0,855	0,654	a	0,000	0,000	0,000	0,000	0,447
b	0,359	0,424	0,176	0,145	0,346	b	1,000	1,000	1,000	1,000	0,553
Got-1						Est-1					
a	0,750	0,563	0,875	0,563	0,813	a	0,968	0,839	0,688	0,839	0,938
b	0,250	0,438	0,125	0,438	0,188	b	0,032	0,161	0,313	0,161	0,063
Got-3						Est-2					
a	0,500	0,500	0,500	0,563	0,547	a	0,000	0,000	0,094	0,000	0,344
b	0,500	0,500	0,500	0,438	0,453	b	1,000	1,000	0,906	1,000	0,656
Mdh-1						Est-3					
a	0,114	0,065	0,159	0,250	0,167	a	0,452	0,258	0,063	0,645	0,000
b	0,886	0,935	0,841	0,750	0,833	b	0,548	0,742	0,938	0,355	1,000
Mdh-3						Est-4					
a	1,000	0,957	0,976	1,000	0,895	a	1,000	1,000	0,969	0,871	0,969
b	0,000	0,043	0,024	0,000	0,105	b	0,000	0,000	0,031	0,129	0,031
						Est-5					
						a	0,065	0,097	0,031	0,516	0,063
						b	0,935	0,903	0,969	0,484	0,938

pour la MDH, 3 loci dont un monomorphe pour la GOT, 2 loci pour l'ICD dont un est polymorphe et 5 loci polymorphes pour les estérases. Chaque locus comporte deux allèles (figure 2, tableau 1).

Les fréquences alléliques sont variables selon les populations. Des allèles particuliers ont été détectés. C'est le cas des allèles *Icd2-a* (populations M₄ et A₅), *Mdh4-b* (populations M₃ et A₅), *Mdh6-a* (population A₅) et *Est2-a* (populations M₃ et A₅).

Le nombre moyen d'allèles par locus polymorphe (Ap) varie de 1,5 (population M₁) à 1,9 (populations M₃ et A₅) (tableau 2). Les pourcentages des loci polymorphes varient de 46,7 (population M₁) à 86,7% (population A₅), avec une moyenne de 64,02% témoignant d'un niveau élevé de diversité génétique intrapopulation. Les moyennes d'hétérozygotie observée (Ho) et attendue (He) sous l'équilibre de Hardy-Weinberg sont respectivement de 0,139 et 0,238. Le F_{IS} moyen par population est assez élevé et varie de 0,281 pour M₁ à 0,526 pour A₅. Les populations accusent un déficit significatif en hétérozygotes (P entre 0,005 et 0,01, après 1 500 randomisations).

■ Structure génétique et divergence entre les populations

Pour les cinq populations et pour l'ensemble des loci polymorphes analysés, la comparaison entre les fréquences génotypiques observées et attendues sous l'équilibre de Hardy-Weinberg a révélé **des écarts hautement significatifs par rapport à la panmixie**. La valeur moyenne de F_{IS} (indice de fixation de Wright décrivant la subdivision à l'intérieur des populations) est de 0,417 (tableau 3). Pour la majorité des loci (12/15), une déviation significative par rapport à la panmixie par défaut d'hétérozygotie est observée. Un excès d'hétérozygotes (non significatif) est observé pour les loci *Got-3*, *6-Pgd-2* et *Mdh-1* (tableau 3).

La structuration des populations, évaluée par l'indice de subdivision de WRIGHT (F_{ST}), **est importante** (F_{ST} = 0,206, tableau 3). Une forte différenciation entre les paires de populations est observée (P = 0,005 < 0,01, après 200 permutations), en dépit de la proximité géographique de certaines d'entre elles (M₃ et M₄), sauf entre les populations M₂ et M₃ (P = 0,025 > 0,01, tableau 4).

TABLEAU 2 : Diversité génétique chez les 5 populations d'*Hedysarum flexuosum* analysées.

TABLE 2 : Genetic diversity in the 5 populations of *Hedysarum flexuosum* analysed.

Population	Nombre moyen d'individus / population	Nombre moyen d'allèles / locus polymorphe (Ap)	% loci polymorphes (P)	Taux d'hétérozygotie		Indice de fixation de WRIGHT (F _{IS})
				observé (Ho)	attendu (He)	
M ₁	38,5 (±1,8)	1,5 (±0,1)	46,7	0,131 (±0,076)	0,182 (±0,056)	0,281**
M ₂	38,6 (±1,9)	1,7 (±0,1)	60,0	0,128 (±0,073)	0,220 (±0,054)	0,452**
M ₃	35,9 (±1,1)	1,9 (±0,1)	60,0	0,143 (±0,084)	0,219 (±0,049)	0,342**
M ₄	35,3 (±1,0)	1,7 (±0,1)	66,7	0,149 (±0,078)	0,258 (±0,053)	0,426**
A ₅	35,1 (±0,8)	1,9 (±0,1)	86,7	0,148 (±0,074)	0,311 (±0,046)	0,526**
Moyenne	36,68	1,74	64,02	0,139	0,238	0,417**

** Hautement significatif à P < 0,01, après 1 500 permutations par le Jackknif

Locus	F _{IS} ⁽¹⁾	F _{IT} ⁽¹⁾	F _{ST} ⁽¹⁾
<i>Icd-2</i>	1,000**	1,000**	0,786**
<i>6pgd-2</i>	-0,405 ns	-0,387 ns	0,012**
<i>6Pgd-3</i>	0,611**	0,630**	0,050 ns
<i>Got-1</i>	1,000**	1,000**	0,070**
<i>Got-3</i>	-0,919 ns	-0,915 ns	0,002 ns
<i>Mdh-1</i>	-0,196 ns	-0,163 ns	0,028 ns
<i>Mdh-3</i>	1,000**	1,000**	0,048**
<i>Mdh-4</i>	1,000**	1,000**	0,095**
<i>Mdh-5</i>	1,000**	1,000**	0,320**
<i>Mdh-6</i>	1,000**	1,000**	0,440**
<i>Est-1</i>	1,000**	1,000**	0,066**
<i>Est-2</i>	1,000**	1,000**	0,173**
<i>Est-3</i>	1,000**	1,000**	0,313**
<i>Est-4</i>	1,000**	1,000**	0,044**
<i>Est-5</i>	1,000**	1,000**	0,276**
Sur l'ensemble des loci	0,417**	0,537**	0,206**

1 : Indices de fixation de WRIGHT (1951) selon WEIR et COCKERHAM (1984)
 ** Hautement significatif à P < 0,01 ; ns : non significatif

Les indices de similarité génétique (I) de NEI sont assez élevés et varient de 0,865 à 0,993 (tableau 4). Les valeurs les plus élevées sont observées pour les couples de populations marocaines sauf, curieusement, pour M₃ et M₄, situées sur le même site mais se développant en conditions de densité différentes. Les indices de similarité entre les couples réunissant la population algérienne (très distante des populations marocaines) aux populations marocaines varient de 0,865 (A₅-M₁) à 0,908 (A₅-M₃).

4. Discussion et conclusions

L'analyse du polymorphisme isoenzymatique chez *Hedysarum flexuosum* a révélé une diversité génétique intrapopulation importante, témoignant de la richesse génotypique des populations qui résulterait en majeure partie du régime de reproduction allogame de l'espèce et du fort taux de régénération des individus à partir des semences (BEN FADHEL *et al.*, 1997).

Les fréquences alléliques pour les 15 loci polymorphes identifiés accusent des différences entre les populations. Curieusement, tous les loci identifiés se sont avérés bialléliques. L'absence de multiallélisme pourrait résulter, du moins pour certains loci, d'allèles nuls non révélés sur nos gels (non transcrits ou codant pour des polypeptides défectueux). Des allèles peu fréquents (*Icd2-a*, *Mdh4-b*,

TABLEAU 3 : Indices de différenciation pour les loci polymorphes chez l'ensemble des populations d'*Hedysarum flexuosum* analysées.

TABLE 3 : Differentiation indices for the polymorphous loci for the totality of the populations of *Hedysarum flexuosum* analysed.

TABLEAU 4 : Indices de similarité et indices de différenciation F_{ST} (de part et d'autre de la diagonale) entre les paires de populations d'*Hedysarum flexuosum* analysées.

TABLE 4 : Similarity indices and differentiation indices F_{ST} (on both sides of the diagonal line) between pairs of the populations of *Hedysarum flexuosum* analysed.

Population	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	A ₅
Indices de similarité de NEI					
M ₁		0,993	0,961	0,915	0,865
M ₂	0,0245*		0,976	0,903	0,880
M ₃	0,1315*	0,0709 ns		0,865	0,908
M ₄	0,2306*	0,2276*	0,2996*		0,875
A ₅	0,2984*	0,2383*	0,2053*	0,2363*	
Indices de différenciation F _{ST} (* significatif à P < 0,1)					

Mdh6-a et *Est2-a*), contribuant à structurer la diversité génétique, ont été rencontrés dans certaines populations telles que M₃, M₄ et A₅. Dans certaines populations, l'absence de ces allèles pourrait résulter d'un défaut d'échantillonnage. Toutefois, leur présence pourrait également résulter de pressions sélectives (physiques, édaphiques, anthropiques...). La sélection de formes alléliques, en dépit de la neutralité des isozymes, a été rapportée dans de nombreux travaux (LACY, 1987 ; PASCHKE *et al.*, 2002).

La valeur de F_{IS} (indice de fixation de WRIGHT à l'intérieur des populations) pour la majorité des loci est élevée. Ceci ne pourrait s'expliquer par l'existence d'un taux substantiel d'autogamie (BOUSSAÏD *et al.*, 1995) ni par la petite taille des populations (PASCHKE *et al.*, 2002). Le faible taux d'hétérozygotie conduirait à long terme à une faible adaptation des individus vis-à-vis des variations des facteurs du milieu (FRANCISCO-ORTEGA *et al.*, 2000 ; HAMRICK *et al.*, 1991 ; MORGAN, 1999).

Une différenciation substantielle entre les populations est observée. Elle est comparable à celle rapportée chez les populations de petite taille d'espèces annuelles préférentiellement allogames (ELLSTRAND et ROOSE, 1987 ; HAMRICK *et al.*, 1989 ; BARTLETT *et al.*, 2002). Chez *H. flexuosum*, la forte structuration génétique des populations ne peut être due uniquement à l'éloignement géographique (Algérie, Maroc) mais vraisemblablement à un effet Wahlund conséquent à la réduction de la taille des populations (cas des populations marocaines, géographiquement proches). La dérive génétique chez ces populations, conduirait à augmenter leur niveau de différenciation et accélérerait le risque de leur extinction (LACY, 1987 ; HAMRICK *et al.*, 1989 ; PASTEUR *et al.*, 1987 ; TOMINATSU et OHARA, 2003).

Les indices de similarité génétique (I) de NEI (1978) sont assez élevés, particulièrement entre les couples des populations marocaines. Cette forte similarité génétique ($0,865 < I < 0,993$) contrastant avec le niveau élevé de la structuration des populations ($F_{ST} = 0,206$) indiquerait leur **compartimentation récente sous l'influence de pressions anthropiques** (mise en culture des habitats, surpâturage...).

Notre travail, sur le polymorphisme enzymatique des populations d'*H. flexuosum* **corrobore nos résultats sur leur variabilité phénotypique** (BEN FADHEL *et al.*, 1997). La structuration des populations, analysée par les paramètres morphologiques (caractères adaptatifs), est comparable à celle révélée à travers l'analyse des isozymes.

Les populations analysées manifestent un niveau relativement élevé de diversité génétique intrapopulation et une forte similarité génétique entre elles. **La conservation** doit s'appuyer sur la collecte d'un maximum d'individus à l'intérieur des populations en tenant compte de leur localisation géographique. La conservation doit concerner dans un premier temps les populations ayant présenté un niveau élevé de polymorphisme et des allèles rares (A₅ et M₃) (HAMRICK et GODT, 1996). La mise en défens des populations permettrait l'accroissement de leur taille et éviterait la perte d'allèles à long terme.

Les programmes de conservation de cette espèce ne peuvent s'appuyer uniquement sur l'analyse des variations morphologiques et isoenzymatiques qui peuvent masquer d'autres variations pouvant être liées à des adaptations spécifiques à certaines conditions du milieu (physiologiques, résistance à des stress biotiques...). L'élargissement de nos prospections, notamment en Algérie, et l'analyse d'autres systèmes enzymatiques, en précisant davantage leur déterminisme génétique à travers une analyse mendélienne de la descendance de génotypes connus, aideraient à mieux affiner nos résultats et orienter les opérations de conservation. L'analyse de marqueurs moléculaires (RAPD, AFLP, microsatellites...) et la recherche de corrélations entre les différents marqueurs (morphologiques, isoenzymatiques et moléculaires) sont nécessaires pour élaborer des programmes d'amélioration de l'espèce.

Accepté pour publication, le 23 décembre 2005.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABDELGUERFI-BERRAKIA R., ABDELGUERFI A., BOUGANA N., GUITTONNEAU G.G. (1991) : "Répartition des espèces spontanées du genre *Hedysarum* selon certains facteurs du milieu en Algérie", *Fourrages*, 126, 187-207.
- BAATOUT M., MARRAKCHI M., PERNÈS J. (1990) : "Electrophoretic studies of genetic variation in natural population of allogamous *Hedysarum capitatum* and autogamous *Hedysarum eupinosissimum*", *Plant Sci.*, 69, 49-64.
- BARTLETT E., NOVAC E.S.J., MACK R.N. (2002) : "Genetic variation in *Bromus tectorum* (Poaceae) : differentiation in the Eastern United States", *Am. J. Bot.*, 89, 602-612.
- BATISTA F., BANARES A., CAUJAPÉ J., CARQUÉ E., MARRERO M., SOSA P.A. (2001) : "Allozyme diversity in three endemic species of *Cistus* from the Canary Islands : Intraspecific comparison and implications for genetic conservation", *Am. J. Bot.*, 88, 1581-1592.
- BEN FADHEL N., BOUSSAÏD M., MARRAKCHI M. (1997) : "Variabilité morphologique et isoenzymatique des populations naturelles maghrébines d'*Hedysarum flexuosum* L.", *El Awamia*, 96, 77-90.
- BOUSSAÏD M., BEN FADHEL N., TRIFI-FARAH N., ABDELKEFI A., MARRAKCHI M. (1995) : "Les espèces méditerranéennes du genre *Hedysarum* L.", Prosperi J.M., Guy P., Balfourier F. eds., *Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon*, Bureau des Ressources Génétiques, Paris, France, 115-130.
- CARDY B.H., STUBER C.W., GOODMAN M.M. (1980) : "Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.)", *Inst. Statistics. Mimeograph*, n° 1317, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina.
- ELLSTRAND N.C., ROOSE M.L. (1987) : "Patterns of genotypic diversity in clonal plant species", *Am. J. Bot.*, 74, 123-131.
- FRANCISCO-ORTEGA J., SANTOS-GUERRA A., KIM S.C., CRAWFORD D.J. (2000) : "Plant genetic diversity in the Canary Island : a conservation perspective", *Am. J. Bot.*, 87, 909-919.
- GOUDET J. (1995) : "FSTAT (Version 1.2) a computer program to calculate F-Statistics", *Journal of Heredity*, 86, 485-486.
- GOUDET J. (2001) : "FSTAT (Version 2.9.3) a program to estimate and test gene diversities and fixation indices", available from <http://www.unil.ch/izea/sotwares/fstat.html>, update from GOUDET, 1995.
- HAMRICK J.L., GODT M.J.W. (1989) : "Allozyme diversity in plant species", Brown A.H.D. Clegg M.T., Kahler A.L., Weir B.S. eds., *Plant population genetics, breeding and germplasm resources*, Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA, 43-63.

- HAMRICK J.L., GODT M.J.W. (1996) : "Conservation genetics of endemic plant species", Advise J.C., Hamrick J.L. eds., *Conservation genetics : case histories from nature*, Chapman and Hall, New York, New York, USA, 281-304.
- HAMRICK J.L., GODT M.J.W., MURAWSKI D.A., LORELESS M.D. (1991) : "Correlation between species traits and allozyme diversity : Implications for conservation biology", D.A. Falk, K.E. Holsinger eds., *Genetics and conservation of rare plants*, Oxford University Press, New York, 75-86.
- HEDRICK P.W. (2001) : "Conservation genetics : where are we now ?", *Trends Ecol. Evol.*, 16, 629-636.
- KILLIAN C. (1939) : "La biologie des sols argileux des environs d'Alger et la question de leurs plantes indicatrices. Essai de micropédologie", *Ann. Agro.*, 93-120.
- LACY R.E. (1987) : "Loss of genetic diversity from managed populations: Interacting effects of drift, mutation, immigration, selections, and population subdivision", *Cons. Biol.*, 1, 143-158.
- MAIRE R. (1958) : *Flore de l'Algérie du Nord*, Lechevalier éd., Paris.
- MORGAN J.W. (1999) : "Effect of population size on seed production and germinability in an endangered, fragmented grassland plant", *Conserv. Biol.*, 13, 266-273.
- NEI M. (1978) : "Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals", *Genetics*, 89, 583-590.
- PASCHKE M., ABS C., SCHMID B. (2002) : "Relationship between population size, allozyme variation, and plant performance in the narrow endemic *Cochlearia bavarica* conservation", *Genetics*, 3, 131-144.
- PASTEUR N., PASTEUR G., BONHOMME F., CATALAN J., BRITTON-DAVIDIAN J. (1987) : *Manuel Technique de génétique par électrophorèse des protéines*, Tec. Doc. éd., Lavoisier, Paris.
- PERNÈS J. (1984) : *Gestion des ressources génétiques des plantes, Tome II* Tec. Doc. Ed., Lavoisier, Paris.
- POTTIER-ALAPETITE G. (1979) : *Flore de la Tunisie, Angiospermes dicotylédones. Apétales - Dialypétales*, I.O.R. éd., Tunis, Tunisie.
- SOLTIS P.S., SOLTIS D.E. (1991) : "Genetic variation in endemic and widespread plant species, examples from Saxifragaceae and *Polystiochum* (Dryopteridaceae)", *Aliso*, 13, 215-223.
- STUBER C.W., WENDEL J.F., GOODMAN M.M., SMITH J.S.C. (1988) : "Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.), *Technical Bull.*, North Carolina State University, Raleigh. N.C.
- SWOFFORD D.L., SELANDER R.B. (1981) : *Biosys-1 : A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematic*, Illinois Natural History Survey, Champaign, IL.
- TOMINATSU H., OHARA M. (2003) : "Genetic diversity and local population structure of fragmented populations of *Trillium camschatcense* (Trilliaceae)", *Biol. Conserv.*, 109, 249-258.
- TRIFI-FARAH N., CHATTI W.S., MARRKCHI M., PERNÈS J. (1989) : "Déterminisme génétique de dix systèmes enzymatiques chez *Hedysarum coronarium* L.", *Agronomie*, 9, 503-510.
- WEIR B.S., COCKERHAM C.C. (1984) : "Estimating F-statistics for the analysis of population structure", *Evolution*, 38, 1358-1370.
- WENDEL J.F., WEEDEN N.F. (1989) : "Visualization and interpretation of plant isozymes", D. E. Soltis, P. S. Soltis eds., *Isozymes in plant biology*, Discorids Press, Portland, Oregon, U.S.A., 5-45.
- WRIGHT S. (1951) : "The genetic structure of populations", *Annals of Eugenics*, 15, 323-354.

SUMMARY

Structuration of the genetic diversity of populations of Hedysarum flexuosum from Algeria and Morocco. Implication for its conservation

Hedysarum flexuosum L. grows spontaneously in Morocco and Algeria. The species is represented by a limited number of populations, often small-sized. The genetic diversity of five natural populations (one from Algeria and four from Morocco) was analysed, using six isozymes revealed by starch gel electrophoresis.

Twenty loci were detected and 15 of them were polymorphic. A high level of genetic diversity within a population, as a result of the species' out-crossing breeding system, was revealed. The fact however that populations exhibited a significant deficiency of heterozygotes could result from their small sizes and from a substantial autogamy of the species.

A large differentiation was revealed among Moroccan populations, indicating weak gene flows among them. There was a substantial differentiation among all populations (from both Morocco and Algeria). Nei's genetic identity values were high. The high level of the genetic similarity between populations and their substantial differentiation indicate their recent fragmentation, resulting mainly from anthropic pressures.

The species conservation strategies should rest on the collection of a high number of individuals within populations that showed high rates of polymorphism in the two regions (Morocco and Algeria) according to the population eco-geographical conditions. Placing populations in defence would favoured their dynamic evolution and avoid allelic loss.