



Caractérisation de la diversité génétique des palmeraies Djiboutiennes à l'aide des marqueurs microsatellites

Sabira Abdoukader¹, Jean Christophe Pintaud², Abdourahman Daher¹ Frédérique Aberlenc-Bertossi²

¹ Institut des Sciences de la Vie/CERD-Centre d'Etude et de Recherche de Djibouti, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, BP 486, Djibouti

² IRD- Institut de Recherche pour le Développement/CIRAD Palm Developmental Biology Group, UMR DIADE, 911 avenue Agropolis, 34394 Montpellier, France

Résumé

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est une plante fruitière importante qui principalement cultivée depuis très longtemps dans les régions chaudes du Moyen orient et d'Afrique du Nord à des fins alimentaires. A Djibouti, la culture du palmier dattier est une activité récente et présente un intérêt capital dans le cadre de stratégie de sécurité alimentaire et de lutte contre la pauvreté et la désertification. Les palmeraies sont composées de génotypes étrangers originaires des pays limitrophes. La plupart des cultivars est issus de graines. L'objectif de cette étude est de caractériser la diversité génétique des cultivars dattiers et de l'identifier leur origine probable à l'aide de 11 marqueurs microsatellites. Les résultats montrent i) une variabilité génétique relativement important au sein de palmiers dattiers et un déficit en hétérozygote ii) une faible différenciation génétique suggérant des échanges des matériels végétales. Enfin, cette analyse génétique révèle que le patrimoine phœnicicole djiboutien présente une affinité génétique avec les cultivars des pays orientaux (Oman, Irak, Arabie Saoudite).

Mots clés : *Phoenix dactylifera*, diversité génétique, cultivars, marqueurs microsatellites

Abstract

Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) is an important fruit crop that has been cultivated from times immemorial in the Middle East and North Africa for food. In Djibouti, date palm cultivation is a recent activity and presents a vital interest in the strategy for food security and to fight against poverty and desertification. Date palm groves are composed of unknown cultivars originated from neighboring countries and well adapted to soil and climatic conditions of the country. Most of them are propagated from seedling. The goal of this study is firstly to characterize the structure of the genetic diversity of date palms using 11 microsatellite markers. The results show i) a relatively high genetic variability among palm trees and a deficit in heterozygous ii) low genetic differentiation suggesting plant material exchange between the palm plantations. Finally, the genetic analyses reveal that djiboutian phoenicicole heritage has close genetic relations with cultivars from the Arabian Peninsula (Oman, Iraq, Saudi Arabia,).

Key words: *Phoenix dactylifera*, genetic diversity, cultivars, *microsatellite* markers

INTRODUCTION

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L, $2n=36$) est une plante monocotylédone de la famille des Arecaceae. Il est principalement cultivé dans les régions chaudes du Moyen orient et d'Afrique du Nord. Le palmier dattier joue un rôle social, écologique et économique important dans ces zones arides et constitue un atout considérable dans la mise en place d'un modèle oasien permettant de lutter contre la désertification et garantir la sécurité alimentaire.

La république de Djibouti dispose d'un capital génétique phoenicicole riche, original et en expansion. Il convient de rappeler que la culture intensive du palmier dattier est une activité récente et peu développée. La plupart des palmeraies sont situées dans les zones côtières, les bordures des grands oueds et les fonds de vallées montagneuses, là où l'eau est disponible pour l'irrigation depuis des nappes phréatiques peu profondes. Ces palmeraies ont servi d'abri pour les nomades avant d'être exploitées comme « palmeraies de cueillette » (Toutain, 1990). Ils constituent des zones de regroupement social important au moment de la récolte des dattes. Ces palmiers ne bénéficient d'aucun entretien, la pollinisation se faisant de façon naturelle grâce à la présence d'une proportion importante de plants mâles.

Les anciennes palmeraies étaient constituées de plants issus des graines et se sont développées de façon spontanée. Elles seraient le vestige de l'occupation turque ou égyptienne de cette région vers la fin du 19^{ème} siècle (Awaleh, 1990). On trouve ces palmeraies à Sagallou et à Ambabo dans le nord du pays, vers Tadjourah (Fig 1A). Plus au sud, à Dikhil, existe aussi des palmiers qui seraient issus de graines jetées au hasard par des caravaniers venus d'Ethiopie pour échanger leurs marchandises contre du sel (Fig.1B). Une seconde génération de palmiers dattiers, originaires de la péninsule arabique, fit son apparition au début du 20^{ème} siècle sur les bordures des oueds d'Ambouli, de Douda, de Damerjog. Plus récemment, à partir des années 1980, des essais de plantation de rejets de variétés locales ou de variétés provenant du Yémen, d'Oman, du Soudan, d'Irak et d'Assab ont été réalisés (Toutain, 1990). D'une façon générale, les palmiers dattiers de Djibouti, d'origines diverses, se sont bien adaptés aux conditions édapho-climatiques du pays.

Beaucoup de travaux ont été menés sur les descriptions morphologiques et génétiques des variétés de palmiers dattiers (El Bekr, 1972 ; Youssef et al. 1982 ; Hannachi et al., 1998 ; Elhoumaizi, 2001, Al-Moshileh et al. 2004, Elshibi et al. 2008). A Djibouti, aucune étude de caractérisation de la diversité génétique de palmiers dattiers n'a été réalisé jusqu'à ce jour. Ainsi l'objectif de cette étude est de déterminer la variabilité génétique des palmeraies d'une

part et d'identifier l'origine des génotypes issues de diverses introduction à l'aide des marqueurs microsatellites.

MATERIELS ET METHODES

1) Matériel végétal

L'échantillonnage des palmiers dattiers a été effectué à Djibouti dans trois régions (Tableau 1 et Fig 1C). Au total, nos travaux ont porté sur 197 de palmiers. Des cultivars du Maroc, de la Tunisie, d'Oman, d'Irak et d'Egypte ont été inclus dans l'analyse de palmiers dattiers de Djibouti. Les échantillons de feuilles fraîches prélevés ont été lyophilisés avant l'extraction d'ADN.

2) Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée en utilisant le protocole de Dellaporta et al, (1983). Le principe consiste à utiliser un ajout, à l'extrait d'ADN, une solution de chlorure de guanidium qui permet de fixer la molécule d'ADN sur une plaque à laine de verre. L'ADN est ainsi élué de la membrane de la plaque par ajout d'eau milliQ chauffés.

3) Amplification des marqueurs microsatellites

Dans cette étude, 11 marqueurs microsatellites nucléaires di-nucléotidiques d'un motif répété (GA)_n, identifié chez *Phoenix dactylifera* (Billotte et al 2004) ont été utilisées. Les microsatellites sont des séquences d'ADN de quelques nucléotides (1à6 bp) répétées en tandem, multi-allélique et abondamment dispersées à travers tout le génome (Balfourier et al. 2006). L'amplification a été réalisée dans une microplaque à 96 puits et placées dans un thermocycleur (PCR Master Cycler ep 384)

4) Migration sur gel d'électrophorèse capillaire

L'analyse des produits d'amplification a été effectuée à l'aide du séquenceur ABI 3130xl. Le principe de cet appareil consiste à faire migrer par électrophorèse dans des capillaires contenant du polymère d'acrylamide (Applied Biosystems) les produits de PCR qui seront séparés en fonction de leur taille. Les fragments amplifiés marqués vont être excités par un laser et détectés par un capteur.

5) Analyses des données

Les paramètres de la diversité génétique, à savoir, le nombre d'allèles par locus, les fréquences alléliques, l'hétérozygotie attendue (Hexp) et observée (Hobs), ont été calculés en

utilisant le programme Genetix 4.04 (Belkhir et al, 2001). Les indices de diversité génétique totale (H_t), de diversité à l'intérieur d'une population (H_s) et l'indice de différenciation génétique entre populations ont été estimés aussi à l'aide de ce même programme. Les indices de fixation du F_{is} et de F_{st} (Wright, 1965) par paire pour chaque population ont été calculés à l'aide des estimateurs de Weir & Cockerham (1984) après 100 permutations. Les paramètres F_{is} et F_{st} sont des indicateurs de la réduction d'hétérozygotie attendue sous panmixie et de la différenciation entre sous-population respectivement. La matrice de distances génétiques entre les différents groupes de palmiers dattiers de Djibouti d'une part et une matrice de distances génétiques incluant des cultivars orientale (Oman, Irak, Egypte) et du Maghreb (Tunisie, Maroc) ont été obtenue en utilisant la distance génétique de Nei (1972) avec le programme Genetix 4.04. Ces matrices ont été utilisées pour construire deux arbres selon la méthode de Neighbour Joining (NJ) à l'aide du logiciel PAST (Hammer et al, 2001).

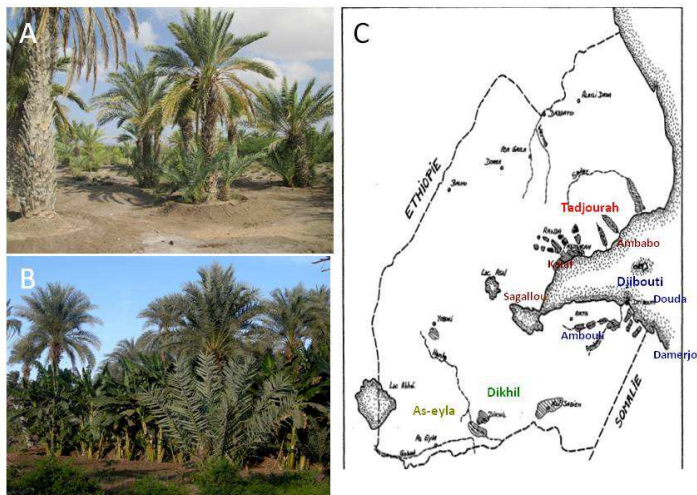


Fig.1 Palmeraies côtières (A), continentales (B) et répartition géographique des palmiers, Source GRIDAO

Tableau 1. Caractéristiques des sites de collectes des échantillons

localités de collectes	Régions	caractéristiques
Sagallou 1	Tadjourah	Ancienne palmeraie en bord de mer, issue de graines, abandonnée avec un excès de palmiers mâles, « palmeraies de cueillettes ».
Sagallou 2	Tadjourah	Palmiers relativement jeunes, issus de rejets et de graines. Culture associée.
Kalaf	Tadjourah	Palmeraies créés à partir de rejets étrangers, génotypes inconnus
Ambabo 1	Tadjourah	Ancienne palmeraie en bord de mer, avec quelques palmiers qui produisent des dattes
Ambabo 2	Tadjourah	Jeunes palmiers issus de rejets et de graines
Dikhil 1	Dikhil	Plantation des palmiers isolés à l'intérieur de la localité
Dikhil 2 et 3	Dikhil	Plantation abandonnée composée de vieux palmiers situés vers As-eyla, à la frontière éthiopienne dont les plants produisent toujours de dattes.
Ambouli	Djibouti	site composé de plusieurs palmeraies, situé à proximité l'une de l'autre avec une production importante de dattes
Douda	Djibouti	Palmeraie privée isolée, probablement créée à partir des rejets locaux ou étrangers
Damerjog	Djibouti	Plantation isolée, origine des plants inconnue

RESULTATS

a) *Variabilité génétique*

Le polymorphisme au sein des 197 individus de palmiers dattiers étudiés avec 11 marqueurs microsatellites a été estimé en calculant le nombre d'allèles par locus, l'hétérozygotie observée (H_{obs}) et l'hétérozygotie attendue (H_{exp}). L'ensemble des marqueurs utilisés présente un polymorphisme important avec un total de 124 allèles (Tableau.2) et une moyenne de 11,27 allèles par locus. Le nombre d'allèles et les fréquences ne sont pas très différents entre les régions. Les fréquences des allèles à chaque locus varient faiblement entre Tadjourah, Dikhil et Djibouti sauf pour les individus d'Ambabo 1 où l'on observe l'existence de certains allèles caractéristiques de ce site et présents à des fréquences importantes à deux loci microsatellites (Fig.2).

Le taux d'hétérozygotie moyen attendu est supérieur au taux d'hétérozygotie moyen observé à Sagallou, Ambabo 2, Damerjog, Dikhil et Ambouli (Tableau 2).

Ces résultats montrent que les différentes palmeraies présentent donc un déficit d'hétérozygotes avec des valeurs de Fis fortement positives (Tableau 4). A l'inverse on

observe un excès d'hétérozygotes dans le groupe d'Ambabo 1, de Kalaf et de Douda. Dans l'ensemble, le taux d'hétérozygotie moyen attendu (0,711) est supérieur à celui observé (0,623).

Tableau 2. Indices de la diversité génétique pour l'ensemble des groupes de palmiers dattiers. En gras : valeurs d'Hexp, H.n.b, Hobs, Fis et nbre d'alleles/locus de l'ensemble des génotypes pour chaque site

Localités	sites	Hexp	H.n.b.	Hobs	Fis	nbre alleles/locus
Sagallou	1	0,676	0,6978	0,636	0,0907	6,18
	2	0,711	0,7418	0,636	0,1476	5,9
Kalaf		0,6	0,6118	0,63	-0,030	6,36
Ambabo	1	0,514	0,5443	0,758	-0,427	2,82
	2	0,712	0,7534	0,647	0,1495	5,64
Dikhil	1	0,559	0,6024	0,571	0,0555	3,9
	2	0,622	0,6404	0,535	0,1693	5,54
	3	0,635	0,6843	0,623	0,0958	4,64
Ambouli		0,634	0,6546	0,653	0,0031	5,54
Douda		0,496	0,5288	0,636	-0,221	3
Damerjog		0,645	0,6943	0,533	0,2477	4,27
Tous les groupes		0,711	0,7132	0,623	0,126	11,27

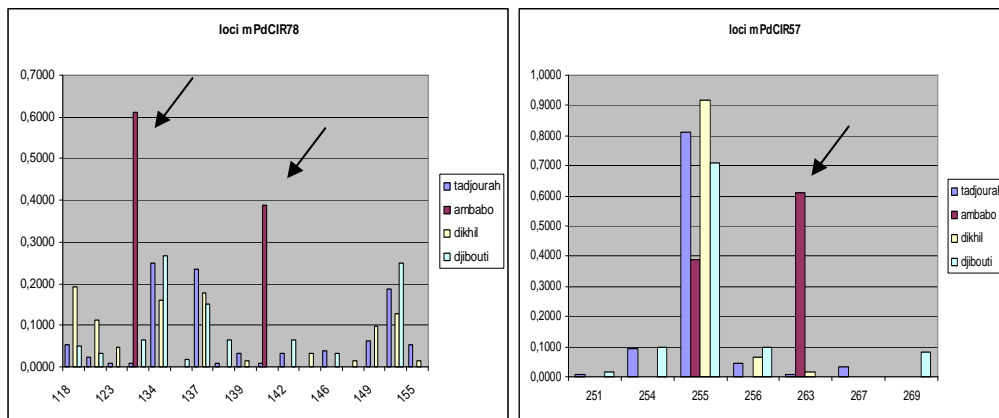


Fig.2. Histogramme illustrant la distribution des fréquences alléliques au sein de 4 groupes de palmeraies à deux loci microsatellites.

b) Origine de palmiers dattiers Djiboutiens

L’AFC (Analyse Factorielle des correspondances) montre une représentation graphique de l’ensemble de la diversité échantillonnée. On observe bien que les génotypes de Djibouti (points en jaunes) forment un ensemble avec les génotypes orientaux d’Oman, d’UAE et d’Egypte (points en gris et violet respectivement) le long des trois axes. Cependant, la représentation des résultats sous forme de dendrogramme de NJ (Fig.3) montre que les individus de Djibouti forment un clade à part. De plus, il convient de noter l’existence de deux clones: un premier clone essentiellement limité au site d’Ambabo et un deuxième clone présent sur les différents sites échantillonnés (Fig.4).

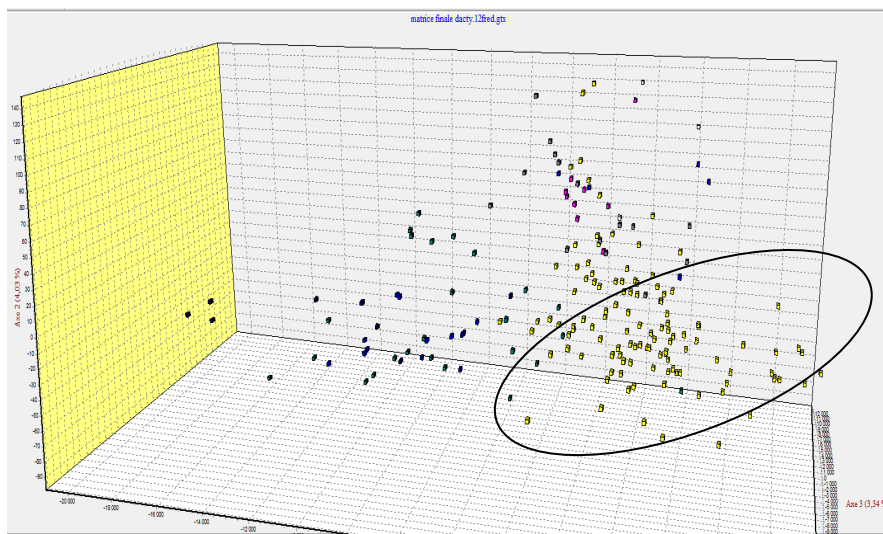


Fig 3. Analyse Factorielles des Correspondances (AFC) de l'ensemble des génotypes de palmiers dattiers étudiés réalisée à l'aide du logiciel Genetix 4.04. en jaune : génotypes Djibouti ; cercle bleu : génotypes de Tunisie ; en blanc : génotypes d'Irak ; en gris : génotypes d'Oman ; en violet : génotypes UAE et en vert : génotypes d'Egypte.

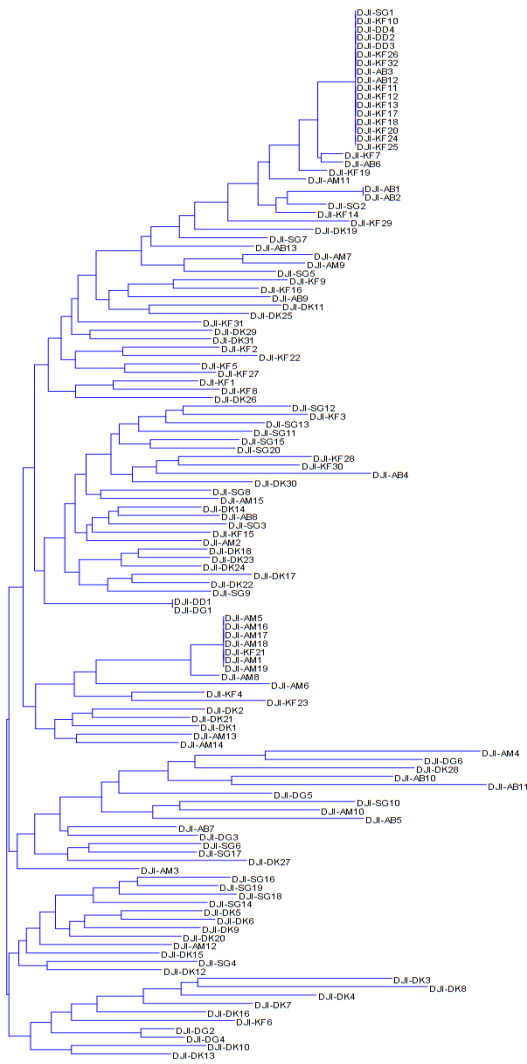


Fig.4.Dendrogramme représentant les génotypes de Djibouti

DISCUSSION

L'ensemble des 10 marqueurs microsatellites a montré un fort polymorphisme avec un nombre d'allèles élevé. Par comparaison avec la forte diversité génétique connue des germplasmes de Tunisie et du Soudan, nous pouvons confirmer l'existence d'une variabilité génétique relativement importante au sein des palmiers dattiers de Djibouti. L'importance de cette diversité génétique constatée est en accord avec les diverses introductions de génotypes étrangers dans le pays aux cours de dernières décennies.

La plupart des palmeraies présentent un déficit d'hétérozygotes avec des valeurs de Fis fortement positives. Chez la palmeraie de Damerjog, le déficit peut s'expliquer par le fait que ce site est constitué par une petite population de palmiers isolés ce qui a pour conséquence une fluctuation importante des fréquences alléliques et une perte de la variabilité génétique du fait de la dérive génétique. A Sagallou, Ambabo, Dikhil et Ambouli, le déficit en hétérozygotes est expliqué par le mode de reproduction qui consiste à sélectionner certains génotypes mâles pour polliniser plusieurs plants femelles. De plus, ce déficit peut s'expliquer aussi du fait que dans la plupart des palmeraies Djiboutienne, la pollinisation se fait de façon spontanée. Cela se traduit par une augmentation du taux d'homozygotes et une diminution de la diversité génétique. Des résultats similaires ont été obtenus par Zehdi et al (2004) sur les palmiers dattiers tunisiens avec un déficit en hétérozygote du à une intense sélection et la multiplication végétative des génotypes d'intérêt. A l'inverse, les palmeraies de Kalaf et Doua possèdent des valeurs de Fis négatives, donc un excès d'hétérozygotes, qui peut être expliqué par le fait qu'elles sont constituées d'un assemblage de génotypes divers issus de plusieurs introductions.

Par ailleurs, le dendrogramme de NJ confirme les introductions successives d'origines variées des cultivars de palmiers dattiers de Djibouti. En effet, les différents génotypes étrangers introduits ont été repartis sur l'ensemble du territoire conduisant parfois à distribuer un même clone sur plusieurs sites. Cependant, hormis quelques cultivars, les individus de palmiers dattiers de Djibouti semblent former des clades isolés par rapport aux cultivars des autres pays. Ces résultats laissent penser que le mode de multiplication par semis de graine a été plus favorisé. Ceci laisse supposer aussi que l'origine de ces génotypes correspondrait à d'autres cultivars d'autres pays limitrophes comme le Yémen, l'Arabie saoudite, Ethiopie que l'on n'a pas intégrée dans nos analyses.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces travaux représentent les premières études réalisées sur la diversité génétiques de palmiers dattiers hétérogènes existant à Djibouti en relation avec les données historiques sur la chronologie de la diffusion du palmier dattier sur l'ensemble du territoire.

Les résultats de génotypage des palmiers dattiers à l'aide des marqueurs microsatellites ont révélé une diversité génétique importante qui tend actuellement à s'homogénéiser du fait des échanges des rejets et des pollens entre les palmeraies. Cette caractérisation génétique de palmiers dattiers constitue un premier élément dans la gestion et l'exploitation des génotypes Djiboutiens. Ces travaux seront complétés par des études phénologiques et pomologiques pour identifier des « cultivars population » composant le patrimoine phoenicicole du pays. Cette étude est d'un intérêt capital pour la valorisation et la sauvegarde du patrimoine phoenicicole mais aussi pour le développement de la culture du palmier dattier qui constitue une priorité nationale pour la lutte contre l'insécurité alimentaire.

Références

- Al-Moshileh, M., Motawei, M.I., Al-Wasel, A. and Abdel-Latif, T. (2004) Identification of Some Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Cultivars in Saudi Arabia Using RAPD Fingerprints. *Agricultural and Marine Sciences*.9, 1-3.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. and Bonhomme, F. (2001) Genetix (Ver. 4.01) logiciel sous windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Population, Université Montpellier II, Montpellier, France.
- Billotte, N., Marseillac, N., Brottier, P., Noyer, J., Jacquemoud-collet, J., Moreau, C., Couvreur, T., Chevallier, M., Pintaud, J.C. and Risterucci, A. (2004) Nuclear microsatellite markers for the date palm (*Phoenix dactylifera* L.): characterization and utility across the genus *Phoenix* and in other palm genera. *Molecular Ecology Notes*. 4, 256-258.
- Dellaporta, S., Wood, J. and Hicks, J. (1983) A plant DNA miniprep. *Plant Molecular Biology Reports*. 1, 19-21.
- El Bekr, A. (1972) Le palmier dattier : Passé et Présent et Nouveauté dans son agronomie, industrie et commerce Imp. El Ani. Bagdad. Irak 1050 p.
- Youssef, K.A., Benjamin, N.D., Kado, A., Shefa, M.A. and Saad, M.A. (1982) Chemical composition of four Iraqi date cultivars. *Date Palm Journal*. 1, 285–294
- Elhoumaizi, M.A., Saaïdi, M., Oihabi, A. and Cilas, C. (2001) Phenotypic diversity of date-palm cultivars (*Phoenix dactylifera* L.) from Morocco. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 49, 483–490.
- Eshibli, S and Korpelainen, H. (2008) Microsatellite makers reveal high genetic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) germplasm from Sudan. *Genetica* 134, 251–260.
- Hammer, O., Harper, D.A.T., and P. D. Ryan, 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp.
- Hanachi, S., Benkhalifa, A., Khtiri, D. And Brac de la Perriere, R . A. (1988) Inventaire variétal de la palmeraie algérienne. Commissariat au Développement de l'agriculture des régions Sahariennes (CDARS)- Unité de Recherche sur les Zones Arides (URZA) de l'Université des Sciences et Technologie «Houari Boumedienne». République Algérienne. 223 p.

- Nei, M. (1972) Genetic distance between populations. *Amer. Natur.* 106, 283-292.
- Toutain, G. (1990) palmier dattier et agriculture oasienne à Djibouti. *Compte-rendu de mission.*
- Weir, B. S. and Cockerham, C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* 38, 1358-1370.
- Wright, S. (1969) *Evolution and the Genetics of Populations, Vol. II. The Theory of Gene frequencies.* University of Chicago Press, Chicago
- Youssef, K.A., Benjamin, N.D., Kado, A., Shefa, M.A. and Saad, M.A. (1982) Chemical composition of four Iraqi date cultivars. *Date Palm Journal.* 1, 285–294.
- Zehdi, S., Trifi, M., Billotte, N., Marrakchi, M. And Pintaud, J.C. (2004) Genetic diversity of Tunisian date-palms (*Phoenix dactylifera* L.) revealed by nuclear Microsatellite polymorphism. *Hereditas.* 141, 278-287.