

Mots clés

- ADN
- Clone
- Identification
- Peuplier

Identification ADN des cultivars de peuplier du registre national des matériels de base

Il y a quelques années, BioGEVES et l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) présentaient une méthode d'identification des cultivars de peuplier dans la revue *Forêt-Entreprise* (Lallemand *et al.*, 2000). Dernièrement, une Fiche Informations-Forêt (Harvengt, 2005) présentait différentes techniques utilisables pour les arbres forestiers, tandis qu'une publication italienne traitait du même sujet (Fossati *et al.*, 2005).

En 2003, le Ministère de l'agriculture et de la pêche (MAP / DGFAR) a inscrit 44 cultivars du genre *Populus* sur le registre national des matériels de base. Ces cultivars sont d'origine française ou étrangère, et correspondent à diverses combinaisons génétiques. Dans le cadre de la certification et du contrôle réglementaire des matériels forestiers de reproduction, la DGFAR a souhaité être en mesure, à l'aide des outils de la biologie moléculaire, de vérifier l'identification de ces cultivars.



La DGFAR a confié au Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) peuplier, et plus précisément à l'AFOCEL, l'organisation d'une étude, qui a consisté à :

- collecter des échantillons de peuplier auprès des diverses collections européennes,
- choisir le laboratoire et faire procéder aux analyses ADN des échantillons,
- analyser les résultats et proposer des pistes de résolution des éventuels problèmes rencontrés.

Cette fiche présente les résultats de cette étude et illustre, à l'aide de quelques exemples, l'intérêt que peuvent avoir ces outils d'identification des cultivars pour tous les acteurs de la filière populiicole.

Les services de l'Etat, ainsi que tout professionnel, disposent désormais d'un outil efficace de caractérisation du matériel végétal. Sur l'ensemble des échantillons analysés, seules trois non-conformités ont été détectées, ce qui, compte tenu de l'extrême facilité de multiplication du genre *Populus*, est un excellent résultat. Ces trois irrégularités ont été expliquées et n'ont pas eu de répercussions notables. Des mesures correctives seront mises en œuvre dans les collections concernées.

Déroulement de l'étude

■ Origine des échantillons

Les 44 cultivars de la liste nationale des matériels de base, proviennent de cinq pays européens : Italie, Belgique, Pays-Bas, France et Hongrie. Pour la plupart des cultivars, nous avons pu trouver une source de matériel végétal "officielle", c'est-à-dire provenant de l'obteneur ou de son représentant.

En outre, deux collections de référence existent : l'une se trouve en Allemagne, au Bundessortenamt de Scharnhorst (BSA), organisme chargé, au niveau européen, des tests de distinction / homogénéité / stabilité (DHS) pour les nouvelles variétés ; l'autre collection est située en France, à la pépinière expérimentale de Guémené-Penfao.

Nous disposons donc de trois sources de matériel végétal pour vérifier la conformité des cultivars. Chaque interlocuteur a fourni au cours de l'été 2005, un échantillon de matériel végétal le concernant. Dix cultivars n'étaient présents que dans deux collections de référence et 'Carolin' n'était présent que dans une seule. Un total de **127 échantillons ont été analysés**.

■ Les analyses

Deux laboratoires ont été contactés pour réaliser les analyses : le laboratoire de biotechnologie de l'AFOCEL et le laboratoire de BioGEVES. C'est ce dernier qui a été retenu, pour son expérience en matière de peuplier.

Les échantillons étaient constitués d'extrémités de pousses, feuillées et en cours de développement. Ils ont été reçus tout au long de l'été 2005 par le laboratoire et immédiatement conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Dans un deuxième temps, l'ADN a été extrait des échantillons, puis amplifié par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sur un principe d'analyse "semi-aléatoire" avec deux amorces ISSR (*Inter Single Sequence Repeat*). Les profils d'amplification ont été analysés (cf. figure 1). La base de données ainsi obtenue a permis de classer les échantillons.

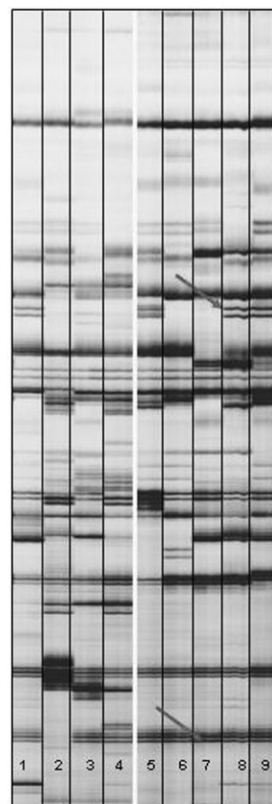


Figure 1 : Exemple de profils d'amplification obtenus pour 9 cultivars de *P. deltooides* et de *P. x euramericana* (cliché BioGEVES) : chaque profil est caractéristique d'un cultivar.

■ Les résultats

Tous les échantillons correspondant à un même cultivar et provenant de plusieurs collections présentent un profil d'amplification identique, sauf dans les trois cas suivants :

- pour 'Rajane', peuplier grisard obtenu par l'INRA (*P. alba x P. tremula*) : les deux sources de matériel présentent des profils d'amplification différents,
- pour 'Boelare', *P. x interamericana* d'origine belge : la source 'conservatoire de Guémené-Penfao' est différente des deux autres sources (Obteneur belge & BSA). Le profil d'amplification est en revanche identique à celui de 'Beaupré' (Obteneur belge & BSA),
- pour 'Beaupré', *P. x interamericana* d'origine belge : la source 'conservatoire de Guémené-Penfao' est différente des deux autres sources (Obteneur belge & BSA). Le profil d'amplification obtenu ne peut être rapproché d'aucun cultivar connu.

Mise en conformité des collections

■ Analyses complémentaires concernant les trois irrégularités

Le problème principal était posé par les cas de 'Beaupré' et de 'Boelare', deux cultivars largement utilisés depuis une vingtaine d'années. Des analyses complémentaires ont été effectuées en décembre 2005, pour plusieurs origines françaises de ces deux cultivars :

- parcelle conservatoire de la pépinière de Guémené-Penfao,
- deux parcelles de production de Guémené-Penfao,
- parc à pieds-mères de l'AFOCEL, à Charrey-sur-Saône,
- parcelle conservatoire (en futaie) de l'AFOCEL,
- pépinière de l'INRA, à Nancy.

Les résultats sont rassurants puisqu'en dehors des deux origines du conservatoire de la pépinière de Guémené-Penfao, tous les échantillons sont conformes aux origines provenant de Belgique (obtenteur) et d'Allemagne (BSA). C'est le cas, en particulier, des parcelles de production de Guémené-Penfao, dont le matériel végétal a toujours été maintenu séparé de celui du conservatoire. A l'origine, le matériel végétal des parcelles de production, destiné à la commercialisation, a été introduit depuis la Belgique, dans les années 1980.

Pour le conservatoire, où se trouvent localisées les deux identifications non conformes, le matériel végétal provient d'anciennes collections héritées du *Cemagref* et du Centre de Recherche Forestier (CRF) d'Orléans. L'erreur d'identification est vraisemblablement assez ancienne, puisqu'elle existait déjà dans le conservatoire précédent, installé en 1985. Il est important de noter que **ces conservatoires n'ont jamais fourni de matériel destiné à la commercialisation**. En dehors de quelques dispositifs expérimentaux, ce matériel mal

identifié n'a pas été disséminé à l'extérieur de la pépinière de Guémené-Penfao.

■ Actions correctives envisagées

Les sources litigieuses de 'Beaupré' et de 'Boelare', installées dans le conservatoire de Guémené-Penfao ont été détruites et remplacées par des boutures issues des parcelles de production, analysées par BioGEVES, et qui se sont révélées conformes.

Le cas de 'Rajane' reste anecdotique car cette variété est très peu utilisée, mais nécessitera des investigations supplémentaires. L'échantillonnage ne comportait que deux sources (INRA d'Orléans, Pépinière de Guémené-Penfao) dont il est impossible de prouver la validité. *A priori*, la solution la plus fiable et qui devrait être mise en œuvre en 2006, serait de caractériser une source de matériel végétal provenant de dispositifs de terrains anciens (populeums).

Quelques problèmes d'identification résolus par analyses ADN

■ Cas des 'Canadese' et des 'Bianco Lomellina'

En 2001, après la mise au point de la technique au laboratoire BioGEVES de Surgères, le *Cemagref* a souhaité analyser l'ADN de neuf cultivars italiens assez anciens. Ces analyses ont conduit à rassembler ces neuf cultivars en seulement deux ensembles :

- le groupe des 'Bianco Lomellina' composé de : 'BL Costanzo', 'Pan', 'Cappa Bigliona', 'Mellone Carlo',
- le groupe des 'Canadese' composé de : 'Boccalari', 'Branagesi', 'Gattoni', 'Stella Ostigliese', 'Adige'.

Ces résultats ont été confirmés une nouvelle fois pour les trois cultivars inscrits au registre national ('BL Costanzo', 'Cappa Bigliona' et 'Boccalari').

Les cultivars d'un même groupe, sous des appellations différentes enregistrées en Italie, ne sont constitués que d'un seul et même clone.

■ Cas du “Faux-Gaver”

Sollicités par les populteurs, la DGFAR et le GIS peuplier ont fait procéder, en 2004, à des analyses d’ADN du cultivar connu sous le nom de “Faux-Gaver”. Ce cultivar, reçu de Belgique comme ‘Gaver’, a été reconnu à la pépinière de Guémené-Penfao, grâce à ses caractères phénotypiques, comme un hybride interaméricain alors que ‘Gaver’ est un hybride euraméricain.

A la suite des fortes attaques de rouille du mélèze (*Melampsora larici-populina*) sur les cultivars ‘Beaupré’ et ‘Boelare’, ce “Faux Gaver” pouvait constituer une possibilité de diversification des plantations, car son comportement face à cet agent pathogène était très satisfaisant.

Des prélèvements effectués dans une quinzaine de parcelles ont été analysés et comparés aux cinq interaméricains belges les plus connus (‘Beaupré’, ‘Boelare’, ‘Hunnegem’, ‘Raspalje’ et ‘Unal’), provenant de deux sources (BSA et Guémené-Penfao). Les résultats ont prouvé, que “Faux-Gaver” est en réalité le clone ‘Raspalje’. De nombreux observateurs avaient d’ailleurs noté le comportement proche de ces deux variétés qui en réalité n’en font qu’une. La procédure d’inscription, un temps envisagée, a été interrompue par l’obteneur belge et la société agri obtentions.

■ Cas du ‘Blanc du Poitou’

Le troisième et dernier exemple d’utilisation des analyses ADN provient d’une étude de sensibilité au chancre bactérien (*Xanthomonas populi*) du cultivar ‘Blanc du Poitou’. Ce cultivar, jugé sensible depuis très longtemps à cet agent pathogène, était observé indemne dans les plantations du nord de la France. Il existait une suspicion que cette variété ancienne soit composée d’un mélange de boutures issues de plusieurs individus (cultivar multiclonal). Afin de vérifier l’homogénéité des plantations étudiées, plusieurs échantillons ont été analysés et comparés à une source provenant de Guémené-Penfao. Tous les échantillons ont été jugés identiques et conformes à la source de Guémené-Penfao. Le cultivar ‘Blanc du Poitou’ est donc monoclonal et l’explication de l’absence d’attaque de chancre dans les plantations du nord de la France est à chercher

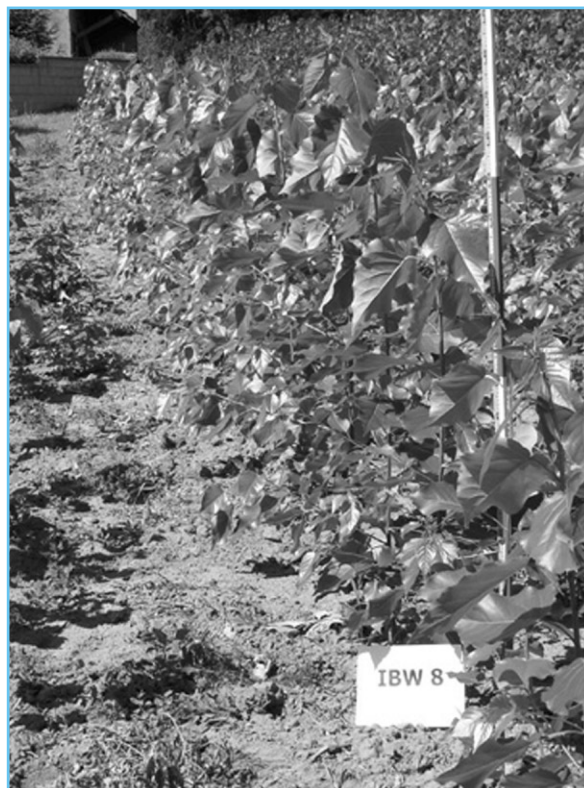


Figure 2 : Le clone de peuplier *P. x interamericana* “Faux-Gaver” était en réalité le cultivar ‘Raspalje’.

ailleurs car il s’est à nouveau montré sensible dans les tests récents pratiqués dans la station INRA d’Angers.



Figure 3 : L’utilisation de variétés clonales a pour intérêt majeur l’homogénéité des plantations, qui facilite la gestion et valorise les produits qui en sont issus. Pour le planteur comme pour l’industriel du bois, l’identité clonale doit être respectée (Jeune peupleraie âgée de 7 ans).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

■ Quelles perspectives d'utilisation des analyses ADN ?

Les professionnels de la filière populicole disposent désormais d'un outil simple et pertinent pour vérifier l'identité supposée des cultivars. Ce peut être un pépiniériste qui suspecte un mélange dans une de ses parcelles de production, un propriétaire, voire un industriel utilisateur du bois. De même, les contrôleurs de pépinière sont en mesure de faire vérifier la conformité du matériel végétal qu'ils observent.

■ Comment procéder ?

En théorie, toute partie du végétal peut être utilisée pour une analyse ADN. En pratique, nous avons utilisé deux types de matériel végétal :

- extrémités de pousses feuillées, prélevées en juin/juillet. Pour ce type de matériel, il faut être vigilant sur les conditions d'acheminement des échantillons vers le laboratoire, car ces tissus fermentent vite,
- extrémités de pousses en repos végétatif (gros bourgeon terminal), en décembre/janvier.

Une attention toute particulière doit être apportée au nombre et à la répartition spatiale des prélèvements, en fonction de la question traitée.

Si on suspecte une fausse identité, mais sans mélange, il est possible de limiter le nombre de prélèvements (un seul suffit).

En revanche, si un mélange évident de variétés est suspecté au sein d'une parcelle, il faut prévoir des prélèvements ciblés, pour tenter d'identifier ses composantes.

Enfin, si on soupçonne un mélange aléatoire et peu décelable *de visu*, il faut organiser un échantillonnage systématique, dont l'ampleur sera fonction de la précision que l'on désire obtenir.

Dans tous les cas, il faudra bien réfléchir à l'origine des échantillons expédiés, pour être



Figure 4 : Tiges en repos végétatif ou pousses feuillées, plusieurs types de matériel végétal peuvent être utilisés pour une analyse ADN.

certain de la pertinence des réponses apportées. Le ou les individus prélevés sur le terrain doivent être systématiquement repérés et identifiés de manière claire et leur identification doit être reportée sur les échantillons envoyés au laboratoire.

■ Quelles limites d'utilisation ?

Les analyses réalisées sur l'ADN consistent à vérifier l'absence de différence génétique entre l'échantillon et une référence. Ceci entraîne un certain nombre de conséquences :

- la référence doit être indiscutable,
- il n'est possible de caractériser un échantillon que si la référence est connue du laboratoire.

En d'autres termes, il n'est pas possible d'attribuer à coup sûr un nom à un échantillon de peuplier prélevé n'importe où dans la nature, car tous les génotypes de référence n'ont pas été caractérisés au laboratoire (une connaissance exhaustive est impossible). En revanche, il est possible d'affirmer que tel ou tel échantillon n'est pas un génotype référencé.

En pratique, cela signifie qu'il est possible aujourd'hui de déterminer si un échantillon correspond à l'un des 44 cultivars du



Figure 5 : Séquenceur ABI310, utilisé par le laboratoire de biotechnologie de l'AFOCEL pour des génotypages réalisés à l'aide de marqueurs microsatellites.

catalogue national des matériels de base. Le laboratoire BioGEVES dispose désormais des empreintes génétiques de ces cultivars. Par ailleurs, l'excellente concordance des différentes origines, après correction des trois erreurs identifiées, nous indique que la collection de Guémené-Penfao, comme celle de Scharnhorst, constituent des références solides qui peuvent être utilisées par d'autres laboratoires et avec d'autres techniques d'analyse de l'ADN (marqueurs microsatellites, par exemple).

Pour en savoir plus

FOSSATI T. *et al.* (2005)

Genetic relationships and clonal identity in a collection of commercially relevant poplar cultivars assessed by AFLP and SSR.

Tree Genetics & Genomes 1, 11-19 p.

HARVENGT L. (2005)

Identification des arbres forestiers par empreintes ADN.

Fiche Informations-Forêt n° 709, 6 p.

Cemagref/ DGFAR (2003)

Conseils d'utilisation des matériels forestiers de reproduction.

173 p. Fiche "Peupliers cultivés" pp 121-132.

LALLEMAND J. *et al.* (2000)

Identifier les cultivars de peuplier.

Forêt Entreprise 136, p 38.

Alain BERTHELOT
AFOCEL Station Nord-Est
60, Route de Bonnencontre
21170 Charrey-sur-Saône
Tél. : 03.80.36.36.20
Fax : 03.80.36.36.44
E-mail : nordest@afocel.fr

Hervé LE BOULER
Pépinière expérimentale de
Guémené-Penfao
Route de Redon
44290 Guémené-Penfao

Pierre BOUILLON
DGFAR
19, avenue du Maine
75732 Paris

Bernard HEOIS
Cemagref
Domaine des Barres
45290 Nogent-sur-Vernisson

Bénédicte JAUDEAU
BioGEVES
Domaine du Magneraud
17700 SURGERES

