

## Une méthode moléculaire de classement des clones de Peupliers (*Populus*) dans les sections Tacamahaca, Aigeiros, Leuce et Leucoïdes par des fragments de restriction des unités ribosomiques

Patricia FAIVRE-RAMPANT, Robert BODERGAT et André BERVILLÉ

**Résumé** – Par hybridation de l'ADN hydrolysé séparément par *EcoRI*, *EcoRV*, *PstI* et *SacI*, des plants de peupliers sont classés, sans ambiguïté, parmi les dix espèces les plus représentées du genre *Populus*. La méthode utilise une seule sonde moléculaire en conditions standardisées.

### A molecular method to classify poplar (*Populus*) clones into sections Tacamahaca, Aigeiros, Leuce and Leucoïdes using ribosomal DNA variable restriction fragments

**Abstract** – Restriction pattern analysis of DNAs purified from young cuttings digested separately with *EcoRI*, *EcoRV*, *PstI* and *SacI* allowed classification of the clones among the ten most commonly represented *Populus* species. The method works with one probe only in standardized conditions.

**Abridged English Version** – The classification of poplar clones into species presents some difficulties. The usefulness of biochemical markers has been reported for isozymes ([1], [2], [3]) but the genetic variability between the species is not large enough and the isozyme alleles are not unique to one species [4]. Recently RFLPs have been used successfully to differentiate species [5], but these markers do not allow a formal identification of species. Ribosomal DNA polymorphism has been widely used to construct phylogenetic trees and allows species recognition [6]. The variability in the *rDNA* is due to variable length units present in a species. The detection of new restriction sites regularly leads to new unit being present in different species ([7], [8]). Moreover the existence of more than one *rDNA* locus allows a variable number of units in every type ([9], [10]). Consequently major *rDNA* fragments and minor *rDNA* fragments coexist.

Physical maps of *rDNA* have been constructed for five species [11]. Every species can be characterized by a specific *rDNA* restriction pattern. Conversely the detection of one *rDNA* fragment in a clone is sufficient to prove the relationship between the clone and the species. The *rDNA* physical maps of ten species are currently available for the assignation of clones to the most commonly cultivated poplar species in the world [12].

The total DNA of leaves of cuttings was extracted [11] from ten species, Table I. The *EcoRI* hybridization profiles, revealed with the flax *rDNA* entire unit as a probe [13], are displayed, Fig. A. The major variable *EcoRI* fragments are indicated Table II. The four classes of *EcoRI* fragments clearly distinguish *P. nigra* (E-4.4-18) which is also identified by P-0.7-8.2. The second class of three species corresponds to E-1.9-18; each species is recognized by E-4.8-18 and P-0.4-8.2. Species from the third class, which correspond to E-4.8-18 are differentiated by P-4.9-18 and V-3.9-25, Fig. B. The species from the fourth class are differentiated by P-0.4-8.2, P-5.5-18 and V-3.9-25. Moreover *P. tremula* is devoid of the S-1.9-18 fragment. The ten species are therefore differentiated by hybridizing with the 8.2 kb as a probe, the DNA restricted independently with *EcoRI*, *EcoRV*, *PstI* and

Note présentée par André CAUDERON.

0764-4469/92/03150133 \$ 2.00 © Académie des Sciences

*SacI*. We noticed that the *EcoRI* classes do not contain the closest taxonomically related species, *i.e.* class 2 contains three species belonging to three different sections. We do not discuss this here, but the possible explanations and discussions are presented elsewhere [12].

In consequence we propose a simple method to assign most poplar clones to a species or as a hybrid. The DNA from each clone has to be restricted separately by *EcoRI*, *PstI*, *EcoRV* and *SacI*. The DNAs are separated by gel electrophoresis in parallel to facilitate their comparison. The transfers are hybridized with an entire *rDNA* unit as a probe. The shortest intense fragments in every lane allow recognition of the species and detection of possible hybridization. The method offers several possibilities for clone comparison and the study of atypic clones. Old interspecific hybridization can be detected. Moreover the donor species can be identified by the fragment profile.

Usually the *rDNA* unit types of closely related species are more homologous than those of distant species. However, the *EcoRI* classes found in *Populus* do not fit the genus taxonomy. Consequently the ribosomal units may have evolved according to a specific mechanism [11]. Nevertheless the identification of species and clones has been demonstrated.

---

INTRODUCTION. — Le genre *Populus* comprend une trentaine d'espèces réparties en cinq sections. La définition des sections repose sur la morphologie, la structure florale, la répartition géographique et l'incompatibilité des croisements intersections. La détermination de l'espèce d'un arbre adulte à la floraison est relativement simple. La détermination de l'espèce des jeunes plants en végétation implique un travail de spécialiste. Les formes hybrides sont très polymorphes et ne sont pas toujours décelées d'après le phénotype. La reconnaissance des clones d'une espèce comme la reconnaissance de clones hybrides, *P. × euramericana* Garnier par exemple, nécessitent d'avoir des plants à plusieurs stades de développement, ce qui ne facilite pas la tâche.

Les marqueurs phénotypes permettant la reconnaissance d'espèces et de clones faisant défaut, depuis plusieurs années les recherches ont porté sur des marqueurs biochimiques. L'utilisation du polymorphisme de variants enzymatiques permet des regroupements de clones en espèces et parfois de différencier des hybrides *P. euramericana*. Pour un individu, la présence d'un marqueur isoenzymatique ne permet pas de déterminer formellement l'espèce d'appartenance du clone lorsque le marqueur présente un gradient de fréquence entre plusieurs espèces. Pour les peupliers, une quarantaine de systèmes enzymatiques sont utilisables mais le polymorphisme est souvent insuffisant, d'autant plus que les stades de développement d'un clone montrent souvent des diagrammes variants.

Plus récemment, les marqueurs moléculaires anonymes d'ADN qui révèlent un polymorphisme de longueur des fragments de restriction (PLFR) ont été utilisés avec succès sur Peupliers pour différencier des espèces; de tels marqueurs peuvent présenter le même inconvénient que les isozymes, à savoir des fréquences alléliques différentes entre espèces. L'identification formelle d'espèces par de tels marqueurs est donc sujette à caution si une étude préalable de distribution du marqueur dans l'espèce n'a pas été effectuée.

Pour palier cet inconvénient, nous avons utilisé le polymorphisme des unités ribosomiques nucléaires dont le haut degré de répétition facilite la mise en évidence et qui ont été déjà largement utilisés pour rétablir les relations phylogénétiques entre espèces. Pour une espèce végétale il est fréquent de trouver des unités de longueurs différentes dues à l'addition de motifs répétés dans l'espaceur intergénique (IGS), sans que l'on puisse les différencier par des sites de restriction. Ce sont des variants de longueur d'un type

TABLEAU I

Liste, désignation, origine géographique et classification des clones des peupliers étudiés.

*List, designation, geographic origin and classification of clones under study*

Sections	Espèce	Origine	Désignation
<i>Tacamahaca</i> . . . . .	<i>P. trichocarpa</i>	Amérique (O, W)	Fritzi-Pauley 3-100
	<i>P. maximowiczii</i>	Chine	12-81 7-36
	<i>P. balsamifera</i>	Amérique (N)	q-07
<i>Aigeiros</i> . . . . .	<i>P. nigra</i>	Eurasie	PBL6 Pourtet
	<i>P. deltoides</i>	Amérique (E)	054-11 Alcinde
	<i>P. fremontii</i>	Amérique (O, W)	F-57-06
<i>Leucoïdes</i> . . . . .	<i>P. lasiocarpa</i>	Chine	LSC
<i>Leuce</i> . . . . .	<i>P. alba</i>	Eurasie	NL-1554
	<i>P. Tremula</i>	Eurasie	129-37
	<i>P. tremuloides</i>	Amérique (N)	210-22

d'unité, variation généralement intra-spécifique. Quand deux unités diffèrent par au moins un site de restriction, il s'agit de types d'unités différents, variation généralement inter-spécifique. Dans certaines espèces coexistent plusieurs types d'unités d'ADN ribosomique. Chez les *Triticinae* et les *Brassicaceae*, qui ont une origine amphiploïde, les différents types proviennent des génomes qui ont fusionné. Chez *Pisum sativum* et *Petunia hybrida*, espèces diploïdes, il existe plusieurs loci portant un type d'unité. Les loci ont des tailles variables, chaque type est donc plus ou moins représenté dans un génome, d'où des intensités de fragments révélés qui permettent de distinguer des fragments intenses majeurs, ou peu intenses, mineurs.

Les cartes physiques des unités ribosomiques majeures et mineures de cinq espèces *P. nigra* L., *deltoides* Bartr. and Marsh (Aigeiros Duby), *P. trichocarpa* Torr. and Gray, *P. maximowiczii* Henry (Tacamahaca Spach.) et *P. alba* L. (Leuce Duby) ont été construites. Chaque espèce est caractérisée par des types d'unités spécifiques dont la mise en évidence est suffisante pour établir la parenté d'un clone avec cette espèce. Nous avons montré que les clones hybrides portent les fragments de restriction spécifiques de chacun des parents. Inversement, lorsqu'un clone porte la signature moléculaire de deux espèces, il est logique de conclure qu'il provient d'une hybridation (plus ou moins ancienne) entre les deux espèces.

Les cartes physiques de cinq nouvelles espèces *P. fremontii* Watson (Aigeiros), *P. balsamifera* (*P. tacamahaca* Mill., Tacamahaca), *P. lasiocarpa* Olivier (Leucoïdes Spach.), *P. tremuloides* Michaux Fils, *P. Tremula* L. (Leucées) étant maintenant construites, nous présentons dans cet article les combinaisons enzymes de restriction/sonde moléculaire, qui permettent de reconnaître puis d'identifier les espèces, et donc d'assigner un clone dans l'une des espèces de *Populus* les plus répandues. Les profils de restriction *EcoRI* conduisent à quatre groupes d'espèces. Chacun d'eux est subdivisé grâce à un, deux ou trois enzymes de restriction. Une seule sonde moléculaire est suffisante.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Le matériel végétal a été fourni par la Station d'Amélioration des Arbres forestiers de l'I.N.R.A., Orléans. M. Lemoine, M. Villar, F. Lefèvre (I.N.R.A.,

TABLEAU II

Fragments de restriction permettant de classer les clones entre les dix espèces de peupliers, la sonde révélant spécifiquement le fragment de restriction est indiquée (18S, 25S ou 8,2 pour l'unité ribosomique entière du lin). (a) plus un fragment de 5,2 kb. (b) fragments de 7 à 12 kb.

Restriction fragments allowing clones to be assigned to one of the ten poplar species under studies. The probe hybridizing specifically with the fragment is indicated (18S, 25S or 8.2 entire flax rDNA unit. (a) plus one 5.2 kb fragment. (b) 7 to 12 kb fragments.

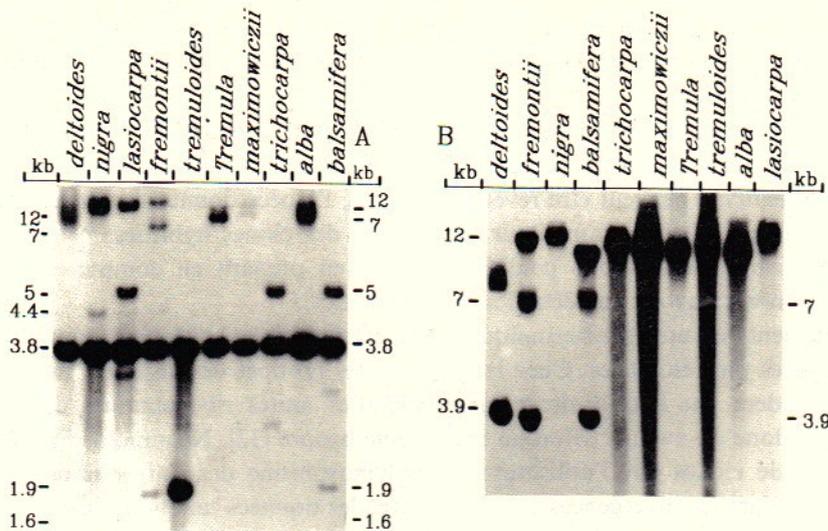
Enzymes . . . .	EcoRI				PstI				EcoRV	SacI
	1,9	4,4	4,8 (a)	7 (b)	0,7	0,4	4,9	5,5	3,9	1,9
Sondes . . . . .	18S	18S	18S	18S	8,2	8,2	18S	18S	25S	18S
<i>Populus</i> . . . . .	II	I	III	IV						
<i>deltoides</i> . . . . .				+					+	+
<i>nigra</i> . . . . .		+		+	+		+			+
<i>fremontii</i> . . . . .	+								+	+
<i>maximowczii</i> . . . . .				+						+
<i>trichocarpa</i> . . . . .			+							+
<i>balsamifera</i> . . . . .	+								+	+
<i>Tremula</i> . . . . .				+		+				
<i>tremunoides</i> . . . . .	+									+
<i>alba</i> . . . . .				+		+	+	+		+
<i>lasiocarpa</i> . . . . .			+	+			+			+

Orléans) et J. Pinon (I.N.R.A., Nancy) nous ont conseillé pour le choix des espèces et des clones. Leur liste est donnée, tableau I.

L'ADN des feuilles de boutures d'environ 1 an a été préparé selon la méthode déjà décrite. Les conditions de restriction sont celles données par les fournisseurs des enzymes. Nous avons utilisé 5 unités d'enzyme par milligramme d'ADN. Les conditions d'électrophorèse, de transfert des ADN sur membrane de nylon (Amersham N<sup>+</sup> ou Bioprobe System) de marquage des sondes avec le <sup>32</sup>P a-dCTP et celles d'hybridation des membranes puis des rinçages sont déjà décrites. Les sondes radioactives sont préparées à partir d'inserts purifiés du plasmide. Nous avons utilisé comme sonde le fragment de l'unité ribosomique entière 8,2 kb du lin.

La taille des fragments de restriction a été calculée d'après plusieurs expériences. Nous sommes convenus de désigner un fragment par - 1) une lettre correspondant à l'enzyme de restriction (B = *Bam*HI, E = *Eco*RI, V = *Eco*RV, P = *Pst*I, S = *Sac*I; - 2) un chiffre désignant la taille en kilobases (kb); - 3) la désignation de la sonde qui révèle spécifiquement le fragment (18 pour 18S, 25 pour 25S et 8,2 pour l'unité entière). Les marqueurs standards de poids moléculaires sont le « 1 kpb ladder » de Bethesda Research Laboratories.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — Pour chaque espèce, nous avons répertorié les fragments qui donnent des signaux intenses en autoradiographie. Ces fragments portent donc au moins pour partie, les gènes ribosomiques 18S, 25S ou 5,8S. Certains fragments apparaissent nettement moins intenses soit parce qu'ils portent une faible longueur de séquence conservée, soit parce qu'ils correspondent à un type d'unité nettement moins représenté que nous avons appelé unités mineures. Dans cet article, nous n'indiquerons que les fragments majeurs qui correspondent aux unités les plus fréquentes pour une espèce. Leur absence ou leur présence fournit une clé de différenciation pour les dix espèces étudiées.



A: Profils *EcoRI* des ADN des dix espèces de peupliers révélés par hybridation avec l'unité ribosomique entière comme sonde. B.: Profils *EcoRV* des ADN de dix espèces des peupliers révélés par hybridation avec l'unité ribosomique entière comme sonde.

A: *EcoRI* of DNA from ten poplar species with the flax entire ribosomal unit as a probe. B: *EcoRV* profiles of DNA from ten poplar species with the flax entire ribosomal unit as a probe

A: Puits/Lane 1: *P. deltooides*; 2: *P. nigra*; 3: *P. lasiocarpa*; 4: *P. fremontii*; 5: *P. tremulooides*; 6: *P. Tremula*; 7: *P. maximowiczii*; 8: *P. trichocarpa*; 9: *P. alba*; 10: *P. balsamifera*. B: Puits/Lane 1: *P. deltooides*; 2: *P. fremontii*; 3: *P. nigra*; 4: *P. balsamifera*; 5: *P. trichocarpa*; 6: *P. maximowiczii*; 7: *P. Tremula*; 8: *P. tremulooides*; 9: *P. alba*; 10: *P. lasiocarpa*.

Après hydrolyse par *EcoRI*, l'hybridation par l'unité entière permet de séparer les espèces en quatre groupes selon la taille du plus petit fragment visualisé, tableau II, fig A et B. Le fragment de E-3,8-25 est invariant entre espèces. *P. nigra* est caractérisé par E-4,4-18 et par P-0,7-8,2. Les trois espèces du deuxième groupe sont différenciées par E-4,8-18, P-4,9-18 et V-3,9-25. Les trois espèces du troisième groupe sont différenciées par E-1,9-18 et P-4,9-18. Les quatre espèces du quatrième groupe sont aisément différenciées par P-0,4-8,2, par P-5,5-18 et V-3,9-25. *P. Tremula* ne contient pas S-1,9-18.

Après hydrolyse par *PstI*, *EcoRV* ou *SacI*, l'hybridation des membranes par la sonde 18S ou 8,2 kb est beaucoup moins informative qu'après digestion par *EcoRI* pour la mise en évidence de PLFR. En revanche les hydrolyses par ces enzymes sont nécessaires pour parfaire la subdivision des quatre groupes donnés par *EcoRI*. Il est intéressant de constater que les couples d'espèces sœurs, l'une eurasiennne et l'autre américaine, sont différenciés par *EcoRI*. Il s'agit de *P. nigra* et *P. deltooides*; *P. maximowiczii* et *P. trichocarpa*; *P. Tremula* et *P. tremulooides*. De plus, les quatre groupes *EcoRI* ne correspondent pas aux quatre sections du genre. Par exemple le groupe 2 comprend trois espèces appartenant à trois sections. Ces points seront discutés ultérieurement.

Nous pouvons donc proposer une méthode simple pour classer les clones des peupliers en utilisant la variation des unités d'ADN ribosomiques. L'ADN des clones à comparer doit être hydrolysé séparément par *EcoRI*, *PstI*, *EcoRV* et *SacI*. Les ADN hydrolysés par l'une des enzymes sont regroupés sur un même gel pour faciliter la comparaison. Après transfert, les membranes sont hybridées avec la sonde d'une unité ribosomique.

La lecture des fragments intenses de moins de 7 kb pour chaque ligne de migration, permettra de classer les clones entre les espèces et éventuellement de mettre en évidence des hybridations interspécifiques lorsque deux fragments marqueurs d'espèces seront présents dans un clone.

La méthode offre, en revanche, des possibilités variées pour comparer et rechercher des différences entre clones atypiques. Des hybridations interspécifiques non détectables d'après le phénotype peuvent être révélées. De plus, l'espèce donneuse peut être reconnue par les fragments de restriction. Pour différencier des clones hybrides  $P \times euramericana$  et interaméricains, la méthode peut être utilisée en prenant en compte les fragments mineurs que nous n'avons pas détaillés dans cet article.

Généralement les unités ribosomiques d'espèces voisines sont plus homologues que celles d'espèces plus éloignées. Chez les *Populus* les groupes définis par l'enzyme *EcoRI* ne correspondent pas à ceux de la taxinomie. Les unités ribosomiques dans le genre *Populus* ont donc dû évoluer selon un mécanisme propre [12]. Néanmoins l'identification d'espèces et de clones par l'utilisation du polymorphisme des unités ribosomiques est démontrée malgré les divergences constatées avec les données taxonomiques.

P. F.-R.: Chercheur C.I.F.R.E., Contrat I.N.R.A.-R.M.C.V. (Recherche, Multiplication, Culture *in vitro*. Desnes, 39140 Bletterans).

Note remise le 13 avril 1992, acceptée après révision le 18 juin 1992.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] O. M. P. RAJORA, *Euphytica*, 43, 1989 a, p. 207-213.
- [2] O. M. P. RAJORA, *Genome*, 32, 1989 b, p. 440-448.
- [3] T. CASTILLO et A. PADRO, *Silvae Genetica*, 36, 1987, p. 5-6.
- [4] M. C. BO, F. RICCARDI et M. NAJAR, *Annales AFOCEL*, 1992 (sous presse).
- [5] P. KEIM, K. N. PAIGE, T. G. WHITHAM et K. G. LARK, *Genetics*, 123, 1989, p. 557-565.
- [6] S. O. ROGERS et A. J. BENDICH, *Plant. Mol. Biol.*, 9, 1987, p. 509-520.
- [7] R. APPELS, W. L. GERLACH, E. S. DENNIS, H. SWIFT et W. J. PEACOCK, *Chromosoma*, 78, 1980, p. 293-311.
- [8] M. DELSENY, J. M. MCGRATH, P. THIS, A. M. CHEVRE et C. F. QUIROS, *Genome*, 33, 1990, p. 733-744.
- [9] T. H. N. ELLIS, D. R. DAVIES, J. A. CASTLETON et I. D. BEDFORD, *Chromosoma*, 91, 1984, p. 74-91.
- [10] J. WALDRON, P. DUNSMUIR et J. BEDBROOK, *Plant Mol. Biol.*, 2, 1983, p. 57-65.
- [11] P. FAIVRE-RAMPANT, S. JEANDROZ, F. LEFÈVRE, M. LEMOINE, M. VILLAR et A. BERVILLÉ, *Genome*, 1992 (sous presse).
- [12] P. FAIVRE-RAMPANT et A. BERVILLÉ, 1992, soumis.
- [13] P. B. GOLDSBROUGH et C. A. CULLIS, *Nucl. Acids Res.*, 9, 1981, p. 1301-1309.

I.N.R.A.-Dijon, Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes,  
B.V. 1540, 21034 Dijon Cedex.