

Diversité morfo génétique de *Oxalis pes-caprae*, L. au Péninsule du Cap Bon de la Tunisie

[Morpho genetic diversity of *Oxalis pes-caprae* L. in the Cap Bon Peninsula of Tunisia]

Aya BOUSSAHA¹, Akram HAYOUNI², Ahmed Marouani³, and M'barek BEN NACEUR¹⁻⁴

¹National Agronomic Research Institute of Tunisia

²Centre de Biotechnologie de Borj Cedria, BP 901 Hammam Lif 2050, Tunisie

³Ecole Supérieure d'Agriculture du kef, 7119; le kef, Tunisia

⁴National Gene Bank of Tunisia

Copyright © 2014 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

RESUME: *Oxalis pes-caprae*, L. qui se multiplie essentiellement par voie végétative (rhizome et bulbe), est une plante invasive riche en métabolites secondaires et qui a envahie tous les terrains en Afrique du Nord et particulièrement en Tunisie. En vue d'exploiter la diversité génétique des ressources végétales en général, nous avons pensé à étudier la diversité génétique de cette espèce et d'exploiter les métabolites secondaires qu'elle en contient. Dans cette étude limitée à la zone de la Péninsule du Cap Bon de la Tunisie, nous avons montré que cette espèce pourrait se multiplier par voie sexuée et contribuer à sa diversité génétique. Les résultats obtenus ont montré une grande diversité de pigmentation qui a été confirmée par l'étude moléculaire. L'utilisation des inters simples séquences répétées (ISSR) a montré que les accessions du Cap Bon peuvent être classées en quatre groupes homogènes différents.

MOTS-CLEFS: Oxalis, ISSR, diversité, morphologique, moléculaire.

1 INTRODUCTION

Durant ces dernières décennies, les travaux de recherches ont été orientés vers l'exploitation des ressources végétales spontanées, riches en métabolites secondaires, en produits pharmaceutiques, et/ou en produits cosmétiques, etc.... Pour avoir une idée de la diversité des espèces spontanées, l'étude menée par certains auteurs Maghrébins en (2003) [1] dans une région limitée à Wergla (Algérie) ont inventorié trente sept (37) espèces appartenant à vingt familles dont les plus importantes sont les Composées, les Graminées, les Chénopodiacées et les Labiées. De même, les travaux de Nabli (1989) cités par El-Hamrouni, (2001) [2] sur la flore spontanée de la Tunisie ont inventorié 2162 espèces réparties en 115 familles et en 742 genres. Parmi ces espèces 80% d'entre elles existent sur l'ensemble du territoire national et 929 se rencontrent au Cap Bon.

Parmi ces études, certaines ont été focalisées tout particulièrement sur le genre *Oxalis* qui comporte plusieurs espèces dont la plus abondante est *Oxalis pes-caprae* et *Oxalis corniculata* mais aussi d'autres sous espèces ou des hybrides difficilement distinguables des espèces déjà connues ont été décrits.

Oxalis pes-caprae L. anciennement nommée *Oxalis cernua* Thunb est une espèce originaire de l'Afrique du Sud. Elle a colonisé différentes régions du monde à climat de type méditerranéen. En Afrique du Nord, elle a été citée dans différentes synthèses sur la flore adventive du Maroc occidentale et central [3]; [4] et [5]) et également, durant les années 30 en Tunisie par Chabroliin (http://bibdigital.rjb.csic.es/Imagenes/P0063_10/P0063_10_0434.pdf).

Dans son habitat naturel (Afrique du Sud), les plantes d'*O. pes-caprae* présentent différents niveaux de ploïdie: diploïdes ($2n = 2x = 14$) ou tétraploïdes ($2n = 4x = 28$) [6]; [7]. Les espèces pentaploïdes ($2n = 5x = 35$) sont rares et stériles et donc leur reproduction est essentiellement asexuée [6].

En Tunisie, l'*Oxalis pes-caprae* est la plus dominante. C'est une plante à petites fleurs jaunes (une ou deux par pédoncule) en fascicule ombelliforme de couleur jaune [8]. Elle est utilisée en culinaire, notamment fraîche dans les salades, ou comme additifs avec les viandes grillées ou cuites. Ses fleurs sont utilisées en teintureries traditionnelles, ce qui constitue un enjeu économique important à l'avenir.

Vu son importance économique, écologique et sociale, l'étude de la diversité génétique de cette espèce est maintenant d'une importance primordiale. Selon Baril, (2001) [9], l'intérêt de la caractérisation moléculaire de la biodiversité de n'importe quelle espèce apparaît dans tous les domaines de la génétique végétale: taxonomie, gestion des ressources génétiques, amélioration des plantes et enfin, inscription et protection variétale.

C'est dans ce cadre que se situe ce travail, qui a pour objectif de caractériser la diversité génétique des différentes accessions d'*Oxalis* au Cap Bon (péninsule située au Nord-Est de la Tunisie) sur le plan morphologique et moléculaire et voir si cette espèce se multiplie uniquement par voie végétative ou, au contraire, la voie sexuée est aussi possible et dans quelle mesure elle contribue à la diversité de cette espèce.

2 MATÉRIEL & MÉTHODES

2.1 MATÉRIEL VÉGÉTAL UTILISÉ

L'espèce utilisée dans cette étude est l'*Oxalis pes-caprae* L. C'est une herbe à fleurs en fascicule ombelliforme de couleur jaune. Ses feuilles, longuement pétiolées, sont toutes disposées en rosette dense, à 3 folioles en forme de cœur. Les fruits sont des capsules cylindriques oblongues, mais ne se forment que rarement [10].

2.2 COLLECTE ET DESCRIPTION DES ÉCHANTILLONS

Nous avons collecté les différentes accessions d'*Oxalis* étudiées dans différentes régions du Cap Bon (Tunisie) et dont les localités sont mentionnées ci-dessous :

A1) Soliman; **A2)** Mraysa ; **A3)** Takelsa ; **A4)** Sidi Daoud ; **A5)** Saheb Jebel; **A6)** Hawarya; **A7)** Grombalia; **A8)** Bou Argoub; **A9)** Bir Bouragba; **A10)** Hammamet; **A11)** Nabeul; **A12)** Beni Khiar; **A13)** Korba; **A14)** Menzel Horr; **A15)** Menzel Temim; **A16)** Tazarka; **A17)** Kelibya; **A18)** Menzel Bou Zelfa; **A19)** Beni Khalled.

Les échantillons collectés ont été ramenés au Laboratoire où ils ont été décrits sur le plan morphologique (longueur du pédoncule, degré de pigmentation des feuilles) et broyés pour en extraire l'ADN pour l'étude moléculaire.

2.3 RÉALISATION DE POLLINISATION ARTIFICIELLE

Il s'agit dans ce type d'expérience, de castrer la fleur (éliminer les étamines), et empêcher toute action d'agents pollinisateurs susceptibles de provoquer la fécondation. Ceci a été fait par ensachage des fleurs castrées dans des sacs en papier spécial percés de nombreux petits pores pendant quelques jours. Après cette phase, nous avons apporté des grains de pollen étranger que nous avons déposés sur le gynécée des fleurs, nous les avons ensachés et après 10 jours, nous avons observé les résultats obtenus.

2.4 EXTRACTION ET QUANTIFICATION DE L'ADN TOTAL

Afin de minimiser le temps d'exposition du matériel végétal à la température ambiante, et éviter ainsi la dégradation de l'ADN, le mortier et le pilon sont trempés dans l'azote liquide. Un échantillon de 1g de matière végétale de chaque accession est broyé dans ce mortier, en présence d'azote liquide, jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine.

Chaque broyat (chaque accession) est transféré dans un tube de 2 ml, auquel nous avons ajouté 900µl de tampon d'extraction (2% CTAB, 20 Mm EDTA; 1,44 mM Tris HCl à pH 8) et 9 µl de β-mercaptoéthanol). Tous les tubes sont, par la suite, incubés à 65°C pendant 30 min avec des agitations périodiques toutes les 5min. Après un repos de 4 à 5 min, 900 µl de chloroforme: isoamylalcool (24:1 v/v) ont été ajoutés. Le mélange a été agité manuellement pendant 15 min afin de maintenir l'émulsion, puis il a subi une centrifugation pendant 10 min à 13000 tr/min, à température de 4°C.

A la fin de cette centrifugation, la phase aqueuse a été gardée, et les acides nucléiques qui en font partie, ont été précipités en ajoutant un volume égal d'isopropanol. Ensuite, une deuxième centrifugation a été réalisée dans les mêmes conditions, pendant 10 min. Le surnageant est éliminé, et le culot d'ADN obtenu est lavé avec 500 µl d'éthanol (70%).

Au terme de ce lavage (centrifugation), le surnageant est éliminé et les tubes sont séchés à l'air libre pendant une heure. Le culot est par la suite dissout dans 100 µl de TE (Tampon de re-suspension: Tris Hcl 10mM à pH 8, EDTA 1 mM à pH 8).

L'élimination des ARN a été réalisée en ajoutant à chaque tube 2 µl de RNase (1 µg/ml), et nous avons incubé les tubes à 37°C pendant 2 heures. Ensuite, nous avons ajouté à chaque tube 300µl de chloroforme alcool iso amylique avant de les centrifuger pendant 10min à 13000 tpm.

Le surnageant récupéré a reçu 0.1volume (20 µl) d'acétate de sodium (3M, pH 5.2) et 2 volumes (400 µl) d'éthanol. L'ensemble étant mis à -80°C pendant 10 min, centrifugé pendant 10 min à 13000 tpm et le culot est récupéré. Ce dernier a été lavé à l'alcool à 70%, séché et dissout dans 100 µl de TE

L'estimation de la quantité d'ADN a été réalisée en faisant migrer les ADN des différentes accessions sur gel d'agarose à 0.8% contenant du Bromure d'Ethidium (BET) et leur visualisation sous UV.

2.5 APPLICATION DU PROTOCOLE ISSR (INTER SIMPLE SEQUENCE REPEAT)

Les inters séquences simples répétées (ISSR) est une technique moléculaire basée sur la PCR et qui est hautement reproductible, en raison de l'ancrage de ses amorces à leurs fins et aussi en raison de leur longueur. Elles ont été largement utilisées pour révéler le polymorphisme inter variétal [11]. Cette technique a été utilisée par Malice (2009)[12] pour révéler la diversité génétique et la structure de *Oxalis tuberosa* Mol de la Bolivie.

2.5.1 LES AMORCES ISSR

Les amorces (ISSR) représentées dans le tableau 1 sont des amorces testées sur *Oxalis tuberosa*. Nous les avons utilisé sur *Oxalis pes-caprae* puisqu'il appartient au même genre (*Oxalis*).

Tableau 1: Liste des amorces testées avec leurs températures d'hybridation.

Amorce	Séquence 5'→3'	Références	T _m (°C)	T _a (°C)
1	BDB-(ACA) ₅	Mc Gregor <i>et al.</i> 2000	50	-
2	DD-(CCA) ₅	Mc Gregor <i>et al.</i> 2000	56	52
3	DHB-(CGA) ₅	Mc Gregor <i>et al.</i> 2000	58	53
4	VHV-(GT) ₇ -G	Mc Gregor <i>et al.</i> 2000	56	51
5	DBD-(AC) ₇	Mc Gregor <i>et al.</i> 2000	50	-
6	BDB-(CAC) ₅	Prevost and wilkinson 1998	60	55
7	(AG) ₈ -YT	Prevost and wilkinson 1998	52	47
8	(GA) ₈ -YC	Prevost and wilkinson 1998	56	51
9	(AC) ₈ -G	Prevost and wilkinson 1998	52	47
10	(AC) ₈ -YG	Prevost and wilkinson 1998	56	51
11	(AG) ₈ -T	Prevost and wilkinson 1998	50	50
12	(GA) ₈ -A	Prevost and wilkinson 1998	50	50
13	(GA) ₈ -C	Joshi <i>et al.</i> 2000	52	50
14	(GATG) ₄ -C	Joshi <i>et al.</i> 2000	52	-
15	VHV-(GTG) ₅	Joshi <i>et al.</i> 2000	60	-
16	DDC-(CAC) ₅	Joshi <i>et al.</i> 2000	60	55
17	(GT) ₈ -C	Joshi <i>et al.</i> 2000	52	
18	(GT) ₈ -YC	Joshi <i>et al.</i> 2000	56	47
19	(TG) ₈ -A	Joshi <i>et al.</i> 2000	50	-
20	(CA) ₈ -G	Pasqualone <i>et al.</i> 2000	52	-
21	(CCA) ₈ -YA	Pasqualone <i>et al.</i> 2000	52	49
22	(GACA) ₄	Pasqualone <i>et al.</i> 2000	48	49

B= G ou T ou C; D= G ou A ou T; H= A ou T ou C, V= G ou A ou C

2.5.2 MILIEU RÉACTIONNEL D'AMPLIFICATION PAR PCR

Après avoir déterminé les concentrations optimales de tous les composants de la réaction (PCR), nous avons préparé un milieu réactionnel contenant le tampon PCR, le $MgCl_2$, les dNTPs, l'amorce, l'ADN, la Taq polymérase et l'eau ultra pure (Tableau 2). L'application de la technique ISSR aux accessions d'*Oxalis* du Cap Bon, a été réalisée en testant toutes les amorces indiquées dans le tableau 1, ensuite, seules les amorces qui ont donné des bandes reproductibles et polymorphes ont été retenues pour l'étude du polymorphisme moléculaire.

L'analyse ISSR a été réalisée en utilisant 25 ng d'ADN des différentes accessions d'*Oxalis*, et 8 amorces ISSR (tableau 2).

Tableau 2: Le mélange réactionnel pour l'amplification de l'ADN par PCR.

Composant	Concentration	Volume prélevé (μ l)
ADN	25 ng/ μ l	0,5
Go Taq Buffer (y compris $MgCl_2$)	5 X	5
$MgCl_2$ (25 mM)	2 mM	2
dNTP (2 mM)	200 μ M	2,5
Amorce (100 μ M)	2,5 μ M	0,625
Go Taq polymérase (Promega)	5 U/ μ l	0,2

Le volume final de la réaction est ajusté à 25 μ l par l'eau ultra-pure. Les milieux réactionnels contenus dans les tubes PCR sont placés dans un thermocycleur (Biometra Uno II). L'amplification PCR est effectuée selon un programme composé d'une pré-dénaturation à 94°C pendant 3 min, suivie de 35 cycles comportant chacun une étape de dénaturation à 94°C pendant 1min, une étape d'hybridation à T_a pendant 1min, et une étape d'élongation à 72 °C pendant 2 min. La dernière étape de la réaction d'amplification consiste en une extension finale à 72 °C pendant 2 min.

2.6 ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats de l'amplification ISSR sont lus sur les photos des gels, et seules les bandes nettes et visibles ont été comptées. Les profils électrophorétiques sont transformés en matrices binaires portant en lignes les accessions testées, et en colonnes, les marqueurs générés par les différentes amorces ISSR. Nous avons attribué le score 1 pour la présence de bandes, et le score 0 pour l'absence de bandes.

La matrice des données obtenues, a été analysée par le programme Treecon for Windows (version 1.3b) selon la méthode UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic Average) de Nei, (1978) [13], ce qui a permis d'avoir un dendrogramme de dissimilarité et une matrice des distances génétiques.

3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 RÉALISATION DES CROISEMENTS INTRA ACCESSIONS

Pour confirmer que l'*Oxalis* a un mode de reproduction sexué, nous avons réalisé une simple expérience consistant à faire un croisement artificiel entre une plante mère, dont on a castré la fleur, et le pollen d'une autre fleur provenant d'une autre accession d'*Oxalis*. Le résultat est l'obtention d'une capsule contenant 2 graines de semence qui pourraient être disséminées et contribuer à la diversification génétique de l'*Oxalis* (photo 1).



Photo 1: Graine d'*Oxalis* après fécondation

Ce résultat obtenu est conforme à celui qui a été observé depuis for longtemps par Chabrolin (http://bibdigital.rjb.csic.es/Imagenes/P0063_10/P0063_10_0434.pdf), professeur à l'Ecole Coloniale d'Agriculture (ECA: actuellement nommée: Institut National Agronomique de Tunisie: INAT), détaché au service botanique et agronomique de Tunisie (SBAT: actuellement nommé Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie: INRAT). Cet ancien enseignant-chercheur a mentionné en 1933 et 1934 que, «dans les peuplements d'*Oxalis* de la région de Tunis, les graines de cette plante ont été régulièrement trouvées». Il a ajouté que «cette fructification d'*Oxalis* paraît être un fait régulier dans la région de Tunis, bien qu'elle passe en général inaperçue».

Nos résultats ainsi que les constatations ci-haut indiquées confirment que l'*Oxalis* pourrait se multiplier aussi par voie sexuée, ce qui pourrait expliquer la diversité génétique obtenue puisque la fécondation sexuée pourrait être réalisée soit par autogamie soit par allogamie, par des pollens transportés par les insectes ou le vent.

3.2 OBSERVATIONS SUR LA VARIABILITÉ MORPHOLOGIQUE DES OXALIS

A coté des croisements que nous avons réalisés entre accessions, nous avons aussi effectué des observations sur l'aspect morphologique (longueur des pétioles et pigmentation des feuilles) dans les différentes régions du Cap Bon (photos 2). Ces observations ont montré une grande diversité de pigmentation au niveau des feuilles de l'*Oxalis* allant de zéro pigmentation jusqu'à une couverture totale des feuilles (feuilles pourpres).



A : feuilles sans pigmentations



B : feuilles avec pigmentation légère



C : feuilles avec pigmentation plus accentuée



D : feuilles avec pigmentations encore plus intenses



E : Pigmentations couvrant la totalité des feuilles



Photo 2: Variabilité de la pigmentation des feuilles d'*Oxalis pes-caprea*

Une autre hypothèse pourrait expliquer la grande variabilité de *Oxalis* dans la région du Cap Bon de la Tunisie est l'effet humain. En effet, cette région est particulièrement riche en pépinière de plantes florales. Les fleuristes de cette région font souvent recours à l'amendement de leurs sols qui présentent rarement une composition idéale. Les substrats apportés de différentes régions pourraient porter des bulbes d'une région à une autre, ce qui expliquerait la variabilité d'*Oxalis* entre les différentes régions.

3.3 CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DES ACCESSIONS D'*Oxalis*

Les profils ISSR obtenus (figure 1) ont permis de réaliser la matrice de dissimilarité génétique entre les différents échantillons d'*Oxalis*. Cette matrice nous a permis de réaliser le dendrogramme de dissimilarité génétique en utilisant le logiciel Treecon for Windows version 1.3.b. Les constructions phylogénétiques ont été basées sur la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average). L'analyse de cette matrice montre que les coefficients de dissimilarité génétique varient de 0,2 à 0,941, avec une moyenne de 0,793 (Tableau 3)

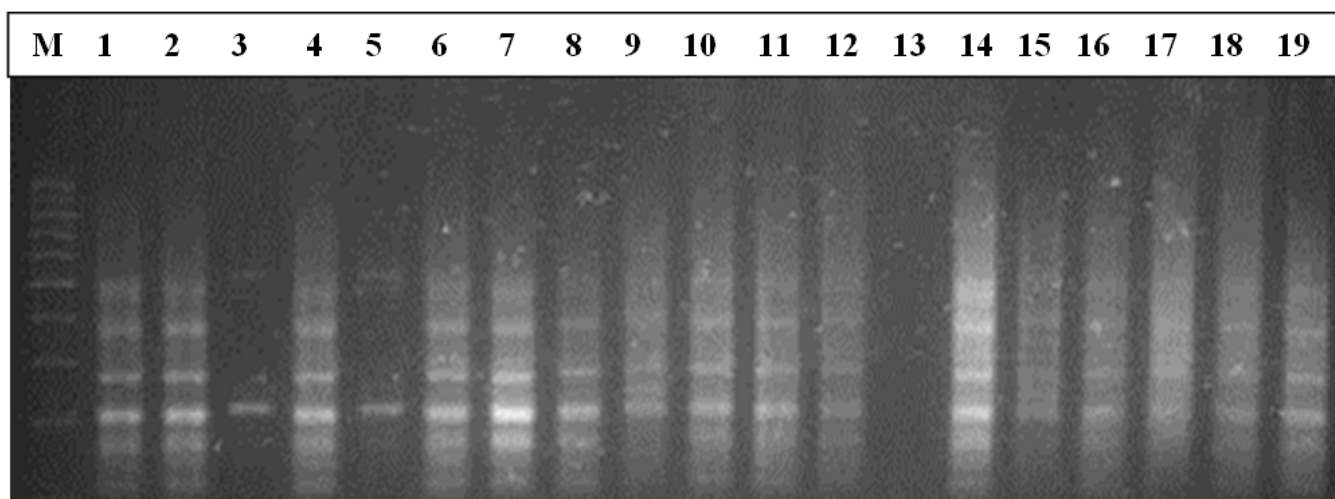


Figure 1: Un exemple de profil électrophorétique d'*Oxalis* du Cap Bon obtenu par l'amorce (GA)8-A.

Légende: 1 Soliman; 2 Mraysa ; 3 Takelsa; 4 Sidi Daoud; 5 Saheb Jebel; 6 Hawarya; 7 Grombalia; 8 Bou Argoub; 9 Bir Bouragba; 10 Hammamet; 11 Nabeul; 12 Beni Khia; 13 Korba; 14 Menzel Horr; 15 Menzel Temim; 16 Tazarka; 17 Kelibya; 18 Menzel Bou Zelfa; 19 Beni Khaled.

Tableau 3: Matrice de dissimilarité génétique entre les échantillons d'Oxalis du Cap Bon, estimée selon la formule de Nei, (1978) [13], basée sur les marqueurs ISSR.

A 1	0																		
A 2	7	0																	
A 3	81	83	0																
A 4	16	8	81	0															
A 5	57	56	67	58	0														
A 6	14	6	82	2	59	0													
A 7	10	10	82	8	54	7	0												
A 8	16	9	89	11	63	9	9	0											
A 9	27	25	85	28	64	26	22	21	0										
A 10	19	14	88	17	65	15	18	17	27	0									
A 11	12	15	81	21	68	19	15	14	25	17	0								
A 12	17	16	89	25	66	23	19	18	32	11	18	0							
A 13	75	78	71	82	54	82	76	84	71	83	82	83	0						
A 14	24	23	88	22	69	20	20	16	33	15	19	13	94	0					
A 15	39	36	75	40	67	37	37	35	29	38	32	40	68	37	0				
A 16	23	19	89	18	71	16	19	12	25	17	18	16	89	10	32	0			
A 17	23	21	85	17	76	15	19	21	21	24	21	32	79	26	29	18	0		
A 18	17	12	83	15	71	13	16	12	21	8	11	16	83	13	32	12	19	0	
A 19	20	15	80	7	56	9	12	18	29	14	25	22	81	19	37	19	18	15	0
	A 1	A 2	A 3	A 4	A 5	A 6	A 7	A 8	A 9	A 10	A 11	A 12	A 13	A 14	A 15	A 16	A 17	A 18	A 19

Légende: A1) Soliman; A2) Mraysa ; A3) Takelsa ; A4) Sidi Daoud ; A5) Saheb Jebel; A6) Hawarya; A7) Grombalia; A8) Bou Argoub; A9) Bir Bouragba; A10) Hammamet; A11) Nabeul; A12) Beni Khiair; A13) Korba; A14) Menzel Horr; A15) Menzel Temim; A16) Tazarka; A17) Kelibya; A18) Menzel Bou Zelfa; A19) Beni Khaled.

Le dendrogramme obtenu à partir des échantillons d'Oxalis du Cap Bon (Figure 2) montre clairement 4 groupes plus ou moins séparés:

- **G1** subdivisé en 3 sous groupes: **SG1** constitué de A15 et **SG2** constitué de A9 et A17 alors que le **SG3** est constitué de A4, A6, A7, A19, A8, A1, A2, A11, A14, A16, A12, A10 et A18,;
- **G2** constitué d'A3;
- **G3** constitué d'A5;
- **G4** constitué d'A13.

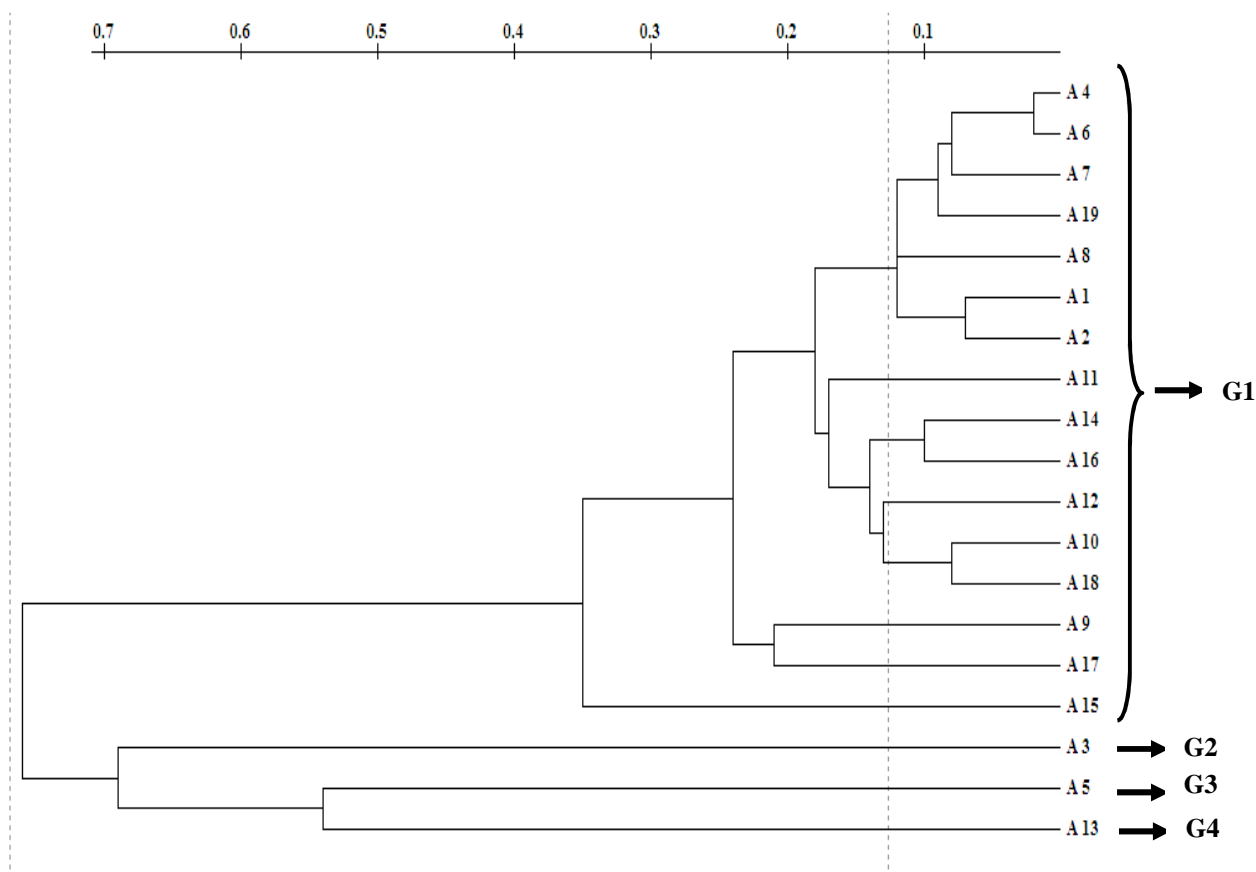


Figure 2: Dendrogramme regroupant les échantillons d'*Oxalis* du Cap Bon, établi par les marqueurs ISSR et la méthode UPGMA à partir de la matrice dissimilarité.

Légende: A1) Soliman; A2) Ferme Mraysa ; A3) Takelsa ; A4) Sidi Daoud ; A5) Saheb Jebel; A6) Hawarya; A7) Grombalia; A8) Bou Argoub; A9) Bir Bouragba; A10) Hammamet; A11) Nabeul; A12) Beni Khiar; A13) Korba; A14) Menzel Horr; A15) Menzel Temim; A16) Tazarka; A17) Kelibya; A18) Menzel Bou Zelfa; A19) Beni Khaled.

Par ailleurs, les dissimilarités les plus faibles ont été observées entre les échantillons suivants (A2-A6 et A6-A4, avec des coefficients de dissimilarité de 6 et 2% respectivement), ce qui traduit une forte ressemblance entre elles. Par contre, les dissimilarités les plus élevées ont été observées entre les échantillons (A3-A8; A3-A16; A13-A16 et A13-A14 avec des coefficients de dissimilarité de 89; 89; 89 et 94% respectivement).

3.4 DISCUSSION DE L'ASPECT MOLÉCULAIRE

Les amorces ISSR ancrées en 5' ou en 3' reposent sur un certain degré de connaissance au niveau des séquences puisqu'elles amplifient des séquences intermicrosatellites. Cette technique a l'avantage particulier, d'être plus reproductibles, à cause des séquences d'amorces ancrées et plus longues utilisées que celle d'autres méthodes telles que la RAPD. Pour assurer une netteté des bandes amplifiées, nous étions contraints d'utiliser une concentration d'amorces de 2,5µM, contrairement à ce que [14] ont utilisé en travaillaient sur *Oxalis tuberosa* Mol. où ils ont mentionné qu'une concentration de 0,4 µM est suffisante pour la réaction PCR.

En testant les amorces, nous avons obtenu une première classe d'amorces ne générant aucune amplification. Cela pourrait être expliqué par l'absence totale de complémentarité entre les ADN matrices et les amorces utilisées et/ou par l'éloignement des sites d'hybridation. La deuxième classe d'amorces a généré des bandes, ce qui explique clairement que les ADN ayant généré des bandes sont les ADN présentant des sites d'hybridation rapprochés, et que les amorces pointent l'une vers l'autre. Dans ce cas, des produits d'amplification de tailles variables sont alors générés.

Quoiqu'il en soit, les résultats obtenus montrent clairement l'intérêt de l'utilisation de cette technique pour la caractérisation moléculaire des échantillons d'*Oxalis* étudiés. L'analyse des profils électrophorétiques montre que le nombre

de fragments amplifiés varie en fonction de l'amorce et de l'accession. Pour une même amorce, le nombre de bandes polymorphes générées est différent d'une accession à une autre mais, dans certains cas, avec un profil de migration similaire, donc, le taux du polymorphisme révélé est étroitement lié à l'amorce. A ce sujet, plusieurs auteurs signalent l'existence d'une relation entre le degré du polymorphisme et la séquence des amorces ([15]; [16]). L'exploitation de ces marqueurs moléculaires moyennant des analyses statistiques appropriées, a permis de construire l'arbre phylogénique. L'analyse de cet arbre montre que les échantillons du Cap Bon sont répartis en 4 groupes

Les amorces ISSR utilisées dans ce travail sont ancrées et donc, ne permettent pas d'amplifications non spécifiques et de ce fait, (i) sont efficaces malgré qu'elles engendrent des groupes inférieurs à ceux engendrés par d'autres méthodes telles que la RAPD (travail non publié) (ii) les *Oxalis* sont relativement diversifiés si bien que, même dans une région géographiquement limitée telle que le Cap Bon, jusqu'à 4 groupes distincts sont présents. (iii) la diversité des groupes obtenue serait due à la pollinisation parfois allogames qui pourrait se produire entre accessions et donc contrairement à ce que certains auteurs pensent, l'*Oxalis* ne se multiplie pas uniquement par bulbes ou par rhizomes, mais aussi un pourcentage non négligeable est généré par voie sexuée. Cette conclusion est basée sur les résultats de nos expériences et sur ceux d'autres travaux réalisés aussi bien sur le plan de la biologie florale que sur le plan moléculaire. En effet, les travaux de [17] ont prouvé que la biologie florale de l'*Oxalis* montre 3 cas possibles: un cas où l'autogamie est impossible vue la position des étamines courtes par rapport au stigmate haut, un cas où l'autopollinisation est très possible car le stigmate est situé en dessous des étamines et un cas intermédiaire où l'autogamie et l'allogamie sont tous les deux possibles.

REFERENCES

- [1] Ould El Hadj M. D, Hadj-Mahammed M., Zabeirou H., (2003). Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouergla (sahara septentrionale Est). Courrier du Savoir – N°03, Janvier 2003, pp. 47-51
- [2] El Hamrouni, A., (2001). Projet de Conservation des Zones Humides Littorales et des Ecosystèmes côtiers du Cap-Bon. Rapport de diagnostic des sites. 38 pages.
- [3] Boulet, C., Tanji, A et A. Taleb., 1989. Index synonymique des taxons présents dans les milieux cultivés ou artificialisés du Maroc occidental et central. Actes Inst. Agron. Vét. 9: 65-98.
- [4] Taleb, A et J. Maillat., 1994. Mauvaises herbes des céréales de la Chaouia (Maroc). I Aspect floristique. *Weed Research* 34: 353-360.
- [5] Bensellam, E., Bouhache, H. M. et A. Taleb., 1997. Etude des adventices des vergers d'agrumes dans le Gharb (Maroc): aspects floristique, agronomique et écologique. *Weed Research*. 37: 201-210.
- [6] Ornduff, R., 1987. Reproductive systems and chromosome races of *Oxalis pes-caprae* L. and their bearing on the genesis of a Noxious Weed. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 74: 79-84.
- [7] Castro, S., Loureiro, J., Ater, M., Ayensal, G and L. Navarro, 2007. Distribution of flower morphs, ploidy level and sexual reproduction of the invasive Weed *Oxalis pes-caprae* in the western area of the Mediterranean region. *Oxford Journals, life sciences, Annals of Botany.* 99 (3): 507-517.
- [8] Mabberley, D. J., 1987. The plant book. Cambridge University Press. 707 pp
- [9] Baril, C., 2001. Caractérisation Variétale. Les marqueurs moléculaires: un nouvel outil pour l'inscription et la protection variétale ? Oléagineux, Corps Gras, Lipides, (8), 5: 502-5.
- [10] Watson, L and M.J. Dallwitz., 1992. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval (<http://delta-intkey.com>).
- [11] Borner, B and M. Branchard., 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19:209-215.
- [12] Malice, M., 2009. Genetic diversity and structure of three Andean tubers: *Oxalis tuberosa* Molina, *Ullucus tuberosus* Caldas and *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique), 185 p.
- [13] Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590
- [14] Pissard, A. Ghislain, M. et P. Bertin., 2006. Genetic diversity of the Andean tuber-bearing species, oca (*Oxalis tuberosa* Mol.), investigated by inter-simple sequence repeats. *Genome*, 49 (1): 8–16.
- [15] Stiti, K., 1995. Utilisation des marqueurs moléculaire de type RAPD pour la différenciation de cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Projet Fin Etude, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique. 73 p.
- [16] Casas, A.M., Igartua, E., Balagueur, G. and Moreno, M.A., 1999. Genetic diversity of Prunus rootstocks analysed by RAPD markers. *Euphytica*. 110, p. 139-149.
- [17] Abid, R., 2010. Floral morphs and mode of pollination in *Oxalis corniculata* L, from Pakistan. *Pak.J. Bot.* 42 (6): 4027-4033.