

Développement d'un outil de phénotypage intra- et interspécifique dans le genre Phoenix (Arecaceae) par spectrométrie proche infrarouge (SPIR) sur échantillons de poudres de feuilles.

Flavie BIDEL *

(*) Flavie BIDEL a publié les résultats détaillés de cette recherche dans le cadre d'un mémoire de stage (Institut Universitaire de Technologie de Caen - Département Génie Biologique), dont cet article est une synthèse.

ABSTRACT

Nowadays, fast and cheap phenotyping methods are under consideration to complement time-consuming and costly molecular typing methods. From this perspective, Near Infrared Spectroscopy (NIRS) has been applied to a sampling of palms belonging to the genus Phoenix (6 species studied), using dry leaf powder. The first hypothesis tested is that the spectrum integrates a large part of the biochemical information so it can be considered as a « fingerprint ». In total, 98 spectra were collected, allowing to study inter- and intraspecific (in *P. dactylifera*) variation in Phoenix. Through statistical tests, we showed that the NIR spectrum from 1100 to 2500 nm was the best-suited wavelength range for our purpose. In contrast, the visible spectrum gave spurious results. At the intraspecific level, the results showed that NIRS pair wise squared Euclidian distances were not correlated with the corresponding genetic distances calculated from microsatellite genotyping data. Moreover, different NIR spectra were obtained from the same individuals in 2008 and 2009. These results indicate that the genetic signal is too weak at the intraspecific level compared to the variability generated by environmental factors. On the other hand, we showed that the stage of leaf development had little influence on the comparison of spectra obtained in NIR among individuals, provided all leaves were collected at the same stage of maturity. At the interspecific level, exploratory statistical methods (Principal Component Analysis -PCA and Hierarchical Ascending Classification -HAC) separated a group of Mediterranean sclerophyll species (*P. canariensis*, *P. dactylifera*, *P. theophrasti*) from a group of tropical leptophyll species (*P. reclinata*, *P. roebelenii*, *P. rupicola*). Supervised statistical methods (Discriminant Factorial Analysis and Canonical Analysis) recovered the same partitioning but also were able to separate all six taxa. In conclusion, SPIR phenotyping looks promising to identify species and probably also their hybrids in the genus Phoenix but not to depict fine-scale differentiation at the intraspecific level. In order to optimize the resolution of the method, it is necessary to minimize environmental variation, ie collect the same kind of samples at the same time from individuals growing in similar conditions.

SOMMAIRE

1. PROJET PALM-SPIR (Spectrométrie Proche Infra Rouge)
2. SPIR Phase 1 (approche exploratoire)
3. SPIR Phase 2 (protocole d'échantillonnage)
4. SPIR Phase 3 (échantillonnage in situ)



1. Le projet Palm-Spir

Cette recherche vise à mettre au point des méthodes de phénotypage rapides et peu coûteuses, destinées à diminuer le coût en temps et en argent que demandent les méthodes de caractérisation moléculaire. Dans cette optique, l'utilisation de la spectro-photométrie proche infrarouge (SPIR) a été testée sur des échantillons de poudre de feuilles de palmiers appartenant au genre

Phoenix. L'hypothèse de départ est que le spectre intègre une grande partie de l'information biochimique et qu'il peut ainsi être considéré comme une sorte d'« empreinte digitale ».



2. Phase 1 (2009) : compte-rendu de l'approche exploratoire

Un total de 98 spectres ont été acquis en 2009 et des études ont pu être réalisées au niveau intra-spécifique (33 individus de *Phoenix dactylifera*) et interspécifique (6 espèces de Phoenix). Par l'intermédiaire de tests statistiques, il a pu être montré qu'il est préférable de ne prendre en compte que le proche infrarouge (1100-2500

nm), à l'exclusion du spectre visible.

Au niveau intra-spécifique, les résultats ont montré que les distances euclidiennes au carré obtenues entre individus ne sont pas corrélées aux distances génétiques calculées entre ces mêmes individus à partir de données de génotypage microsatellite. De plus, des spectres différents ont été obtenus à partir des échantillons récoltés en 2008 et en 2009 pour un même individu, indiquant que la variation des facteurs environnementaux surpasse le signal lié à l'origine génétique. Il a par contre été montré que les études peuvent être réalisées aussi bien sur des feuilles jeunes que matures, du moment que l'on ait un même degré de maturité pour tous les échantillons.

Au niveau interspécifique, deux méthodes ont été expérimentées : les méthodes non supervisées (ACP et CAH), qui ont montré des représentations peu cohérentes avec uniquement un regroupement entre espèces méditerranéennes sclérophylles (*P. canariensis*, *P. dactylifera*, *P. theophrasti*) versus tropicales leptophylles (*P. reclinata*, *P. roebelenii*, *P. rupicola*), et les méthodes supervisées (AFD et analyse canonique), qui ont correctement circonscrit les six espèces étudiées.

En conclusion, il est apparu que le phénotypage par SPIR était prometteur pour identifier des espèces du genre Phoenix, et probablement aussi leurs hybrides, mais pas pour détecter de structuration génétique fine au niveau intra-spécifique. Afin d'optimiser les performances de la méthode, il est apparu nécessaire de minimiser la variation environnementale, c'est-à-dire de collecter des échantillons de même nature, simultanément, et dans des conditions écologiques homogènes.



3. Phase 2 (2010) : élaboration d'un protocole d'échantillonnage et premiers résultats

L'échantillonnage réalisé pour cette seconde phase était composé uniquement de feuilles matures récoltées sur deux jours (les 11 et 12 mai 2010 par le CRSP et le CRA-FSO) afin de minimiser la variation environnementale. L'étude a porté sur 150 échantillons dont voici la composition:

ECHANTILLON SANREMO	ITALIE
<i>P. roebelenii</i>	20
<i>P. theophrasti</i>	9
<i>P. reclinata</i>	15
<i>P. dactylifera</i>	15
<i>P. canariensis</i>	15
Hybrides	15
TOTAL	89

Afin de vérifier la répétabilité de la SPIR, des clones cultivés sur de l'île de Porquerolles ont également été inclus à l'étude, soit : 10 individus échantillonnés le 25 mai 2009 (feuille jeune et feuille mature) pour deux variétés : Bousthami et Thori. Enfin, dans un but exploratoire, des échantillons de *P. dactylifera* provenant de divers cultivars des USA ont également été ajoutés à l'échantillon.



étape 1



étape 2

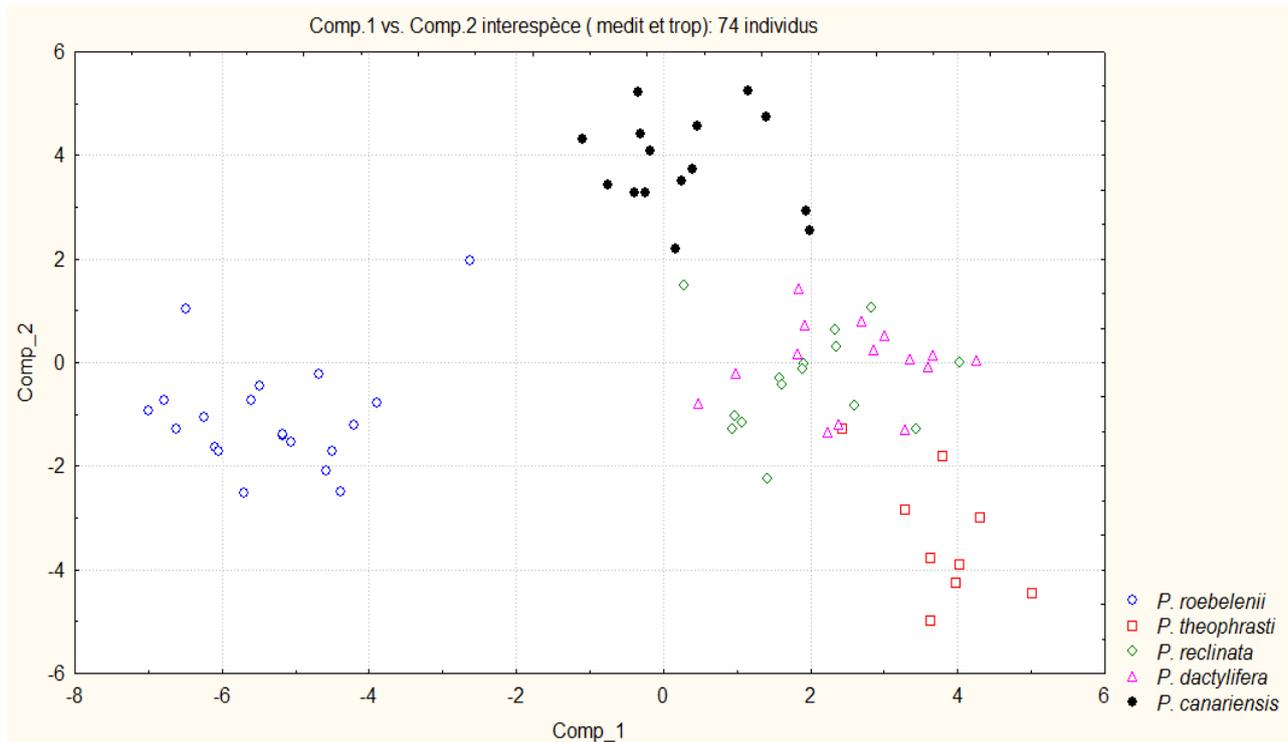


étape 3

Les échantillons ont été lyophilisés et broyés en fine poudre pour être ensuite analysés en SPIR (Spectrométrie Proche Infra Rouge) via Spectromètre XDS Foss NIR system. L'ensemble des spectres obtenus ont ensuite été traités par des méthodes statistiques non supervisées (Sans à priori) et supervisées (Avec à priori). Ces analyses ont été réalisées avec l'aide de Benoit Bertrand et Fabrice Davrieux (CIRAD).

Les premiers résultats de 2010 ont permis l'obtention d'un modèle graphique regroupant les 74 individus *Phoenix sp.* de Sanremo selon leurs espèces d'appartenance. Par validation croisée, il a été montré que ce modèle obtenu par analyse discriminante permet une classification correcte de 95,95% des individus et qu'il peut être considéré comme un

modèle robuste dans lequel les regroupements entre individus ne sont pas fortuits.



Le modèle obtenu, représenté ci-dessus, semble montrer une faible distinction entre les *P. dactylifera* (violet) et *P. reclinata* (vert). Cependant, une représentation sur les composantes 1 et 3 permet d'observer la distinction entre ces deux espèces.

A la vue de ce modèle, il y a bon espoir de pouvoir obtenir de bons résultats quand à la détermination d'hybride par SPIR ; étant donné l'obtention de groupes (espèces) bien individualisés, il est possible de penser que par exemple un hybride *P.canariensis-P.dactylifera* viendra se placer graphiquement entre les 2 groupes. Aussi, en isolant les longueurs d'ondes intégrant les variations génétiques, et en retirant les longueurs d'ondes intégrant les variations environnementales, on espère que la SPIR permettra une distinction plus fine des espèces et surtout des hybrides. »



4. Phase 3 (2011-2012) : échantillonnage in situ

La dernière phase de ce projet devrait conduire à mettre au point un scanner portable, qui permettra un travail d'identification in-situ. Cet outil sera réalisé et expérimenté dans les espaces Verts de la Ville de Sanremo, qui finance et coordonne cette recherche et ses développements ultérieurs.

La ville de Sanremo est déjà en pointe au niveau de l'élagage des palmiers, avec la diffusion de la technique de la «bicyclette». Elle est aussi le siège du Projet italien DIPROPALM, qui coordonne au niveau national la lutte contre le ravageur du palmier, *Rhynchophorus ferrugineus*.

Cette nouvelle initiative est susceptible d'intéresser les jardins botaniques et les producteurs de palmes en général. Au travers de son soutien à ce projet, le CSRP souhaite affirmer sa vocation à développer la recherche expérimentale en matière de phéniculture, dans le souci de contribuer à la mise en valeur du riche patrimoine paysager de ses espaces verts, emblème touristique de l'ensemble de la région.

PARTENARIAT

IRD / CRA-FSO / CSRP

FINANCEMENT ET COORDINATION

Centro Studi e Ricerche per le Palme di Sanremo (CSRP)

DIRECTION SCIENTIFIQUE

Jean-Christophe PINTAUD (IRD-Montpellier), en collaboration avec Benoit BERTRAND et Fabrice DAVRIEUX (CIRAD-Montpellier), Antonio MERCURI et Marco BALLARDINI (CRA-FSO, Sanremo)