

LES MARQUEURS MOLECULAIRES : Technique RAPD

(Random Amplified Polymorphic DNA)

M'déré Ali(27004059), Daoud Hadiati (27004064)

Université de la Réunion, L3 BOP, Avril 2012



Résumé :

La vanille est principalement connue pour son aspect aromatique et culinaire. Il se trouve éparpiller dans différent écosystème de la planète sans son pollinisateur naturel. Les vanilles sauvages sont concentrées en Amérique alors que les vanilles cultivées sont distribuées dans les zones tempérées de la Terre. Pour conserver le génome et améliorer la qualité de vanilles, la diversité génétique existante doit être mieux connue. Dans cette étude nous avons utilisé 4 accessions de différents individus de l'espèce *vanilla planifolia* cultivé originaire du Mexique et 4 individus de l'espèce sauvage *vanilla bahiana* originaire du Brésil. Nous avons étudié la diversité génétique des deux espèces de vanilla à l'aide du marqueur moléculaire RAPD avec l'amorce ABA-1 à 10 nucléotides. L'analyse des données a montré une très forte diversité interspécifique (92% de polymorphismes). La diversité intraspécifique des espèces cultivées *V. planifolia* est forte (90% de polymorphismes) par rapport *V.bahiana*. Cette différence est probablement due à l'accumulation de mutations somatiques ponctuelles particulières en fonction des zones d'intrusions pour l'espèce cultivée. L'autopolyploïdisation apparaît donc comme une voie probable de création de la diversité chez le vanillier. Des sous populations de *V. planifolia* ont été identifiés par une spéciation allopatrique et des sous espèces de *V.bahiana* par une spéciation sympatique.

Mots clefs : Marqueurs RAPD, Vanilla planifolia, Vanilla bahiana, Diversité génétique, Spéciation

1. Introduction

Le genre *Vanilla* appartient à la famille des Orchidées, il est composé de 110 espèces, parmi lesquelles 15 sont considérées comme aromatique. Les vanilles sont de grandes lianes à tige charnue et feuilles ovales grimpantes, grâce à leurs nombreuses adventives, sur les arbres du voisinage (Michel Botineau, 2010). Leur mode de reproduction se fait principalement par autofécondation (reproduction végétative). Pour fructifier la vanille exige une humidité constante et une température moyenne de 25° C et qui ne descend pas en dessous de 10°C. *Vanilla planifolia* est indigène dans l'Est du Mexique et le bassin des Caraïbes de l'Amérique Centrale. Pour cinq siècles, la vanille a été diffusée à partir de ces zones essentiellement par voie végétative (Miche Botineau, 2010). Cette plante est introduite en Europe. Ainsi la plante se trouve introduite dans de nombreuses régions chaudes. La vanille est principalement utilisée comme produit commercial à partir de matériel végétal appartenant à l'espèce *Vanilla planifolia*, cultivée dans les régions tropicales humides et en particulier dans l'océan Indien. Aujourd'hui, les principaux producteurs sont Madagascar, ainsi que les Comores et La Réunion. Afin de soulever l'existence ou non d'un polymorphisme génétique entre tous les 8 espèces étudiées, le

marqueurs nucléique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) a été choisi. En effet cette méthode permet de révéler les différences de séquence existant entre deux individus directement au niveau de leur ADN.

Existe-t-il des polymorphismes intra-spécifiques (entre individu d'une même espèce) et/ou interspécifiques (entre individu de différent espèce) ? Quels sont les individus génétiquement plus proches ? Quelles sont les causes de ces Variabilités génétiques ?

2. Etude de la diversité

2.1. Matériel et méthodes

2.1.1. Méthodologie

Nous disposons de 8 accessions du genre *Vanilla* qui appartiennent à l'espèce cultivée *Vanilla planifolia* syn. *fragrans* originaire du Mexique ; et l'espèce sauvage *V. bahiana* originaire du Brésil. Nous allons effectuer le RAPD afin d'observer le polymorphisme génétique qui se trouve entre les individus de ces deux espèces de vanilles. Quatre accessions ont été choisies pour chacune de ces deux espèces. L'amorce ABA-1 (5'-**CAGGCCCTTC-3'**) a été choisie pour l'étude du polymorphisme. Le tableau

suivant présente les différents échantillons de vanille utilisé lors de ce TP :

Numéro Individu	Accession	Espèce	Zone de culture
Sauvage et Originaire de Brésil			
1	CR0071	<i>V. bahiana</i>	Sauvage
2	CR0072	<i>V. bahiana</i>	
3	CR0074	<i>V. bahiana</i>	
4	CR0076	<i>V. bahiana</i>	
Cultivé et Originaire du Mexique			
5	CR0005	<i>V. planifolia</i>	Amérique centrale
6	CR0039	<i>V. planifolia</i>	Madagascar
7	CR0147	<i>V. planifolia</i>	Martinique
8	CR0676	<i>V. planifolia</i>	Fiji

Tableau 1 : Echantillon pour l'étude de la diversité interspécifique

2.2. Marqueur moléculaire RAPD

La RAPD est une méthode simple, rapide et peut couteuse avec une grande efficacité. A partir d'une amorce spécifique, il permet de révéler 5 à 20 fragments par amplification.

2.2.1. Extraction d'ADN

L'ADN des clones de vanille a déjà été extrait à partir de feuilles. Les extraits d'ADN résultants des 8 espèces de vanille sont misent dans des tubes à hématolyse ensuite conservés à 20 °C en présence de tampon TE (Tris EDTA) à une concentration d'environ 2,5ng/µg. Les solutions seront utilisées pour le PCR.

2.2.2. Amplification de l'ADN (PCR)

Pour la réalisation d'une PCR on a besoin de quatre éléments principaux (Tableau 2) :

- MIX (solution contenant les éléments nécessaires pour la réPLICATION)

- Amorce (Séquence de nucléotide qui permet l'initiation de la réPLICATION)
- ADN (ADN extrais des échantillons de vanille)
- TAQ (enzyme qui favorise la polymérisation)

➤Préparation du milieu réactionnel :

En vue de préparer un volume final de **Vf = 25 µl** pour le PCR, nous disposons des solutions suivantes : La solution "MIX" a déjà été préalablement préparée pour tous les ADN à étudiée.

Ayant en disposition toutes les solutions pour la réalisation du PCR, les volumes exacts à prélever (Tableau 2) ont été calculés à l'aide de la formule suivant :

$$Ci * Vi = Cf * Vf \Leftrightarrow Vf = \frac{Ci * Vi}{Cf}$$

Pour chaque échantillon, à l'aide d'une micropipette P20, 4 µl d'ADN ont été prélevé, ensuite versé dans un tube à PCR ; 18,6 µl de mix et 2 µl de l'amorce ont été rajouté. Pour finir 0,4µl de la Taq polymérase est mélangé au totale. Au final 8 tubes de PCR ont été préparés avec un volume finale de 25µl.

Les tubes sont placés dans la machine PCR qui a été préchauffé et réglé à une température de 95°C.

Des précautions ont été mise en place pour éviter les risques d'erreur avec la PCR, la contamination par un ADN étranger et les erreurs de pipetage : Pour chaque prélèvement, les pipettes sont choisies en fonction du volume à prélever ensuite réglées minutieusement au volume exact. Le pipetage ce fait avec précaution en utilisant des tubes propres, sans oublier de changer les embouts des pipettes entre chaque pipetage. Il faut être précis car la moindre erreur peut modifier la concentration des différents réactifs de ce fait la manipulation sera échouée. Toutes les manipulations se font avec des gants. Pendant les manipulations, les solutions non utilisées sont placées dans un bac à glace à une température de 4°C.

		Concentration solution stock Ci	Concentration dans tube PCR Cf	Volume à ajouter dans tube PCR	Volume finale à prélevé pour le PCR : Vf
MIX	H2O			12,1 µl	18,6 µl
	PCR buffer	X 10	X 1	2,5 µl	
	dNTP Mix	2,5 Mm	0,2 Mm	2 µl	
	MgCl2	25 Mm	2 mM	2 µl	
Amorce	Amorce RAPD	15 ng/µl	1,2 ng/µl	2 µl	4 µl
ADN	ADN vanille	2,5 ng/µl	0,4 ng/µl	4 µl	4 µl
TAQ	Taq (red hot)	5 unités /	0,8 unités/µl	0,4 µl	0,4 µl

Tableau 2 : tableau résumé les volumes à prélever pour le PCR

2.2.2.1. La réaction PCR

À partir d'un échantillon complexe et peu abondant, cette technique permet d'obtenir rapidement une quantité importante et exploitable d'un fragment précis d'ADN. La multiplication des fragments permet l'observation des bandes lors de l'électrophorèse.

La réaction PCR se déroule principalement en trois étapes principales, en présence de l'ADN génomique, des amorces, des nucléotides et une polymérase :

- Dénaturation de l'ADN (rupture de liaison hydrogène conduisant à la séparation des deux brins)
- Hybridation du primer sur l'ADN (les amorces ont la même température d'hybridation qui dépendent des bases purique et pyrimidique)
 $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$.
- Synthèse d'ADN

C'est trois étapes répétées une fois correspond à un cycle de PCR. Pour le PCR, l'amplification consiste à effectuer plusieurs cycles, ce qui permet d'obtenir une grande quantité du fragment d'intérêt (fragment à étudier).

Les microtubes PCR ont été placés dans le thermocycleur, ensuite le programme RAPD a été sélectionné (à environ 2h de temps). 40 cycles PCR, précédés d'une pré-dénaturation, ont été effectués. L'amplification finale la synthèse de l'ADN se fait pendant 5 minutes à 72 °C. Après le PCR les solutions sont conservées à une température de 4°C.

Etape	Temps (min)	Température (°C)
Pré-dénaturation	1	95
Dénaturation	1	94
Hybridation du Primer	1	36
Synthèse d'ADN	1	72
Amplification finale	5	72

Tableau 3 : Les températures de dénaturation/renaturation

2.2.3. Electrophorèse

L'électrophorèse est une technique qui permet la séparation des fragments d'un ADN. Elle est utilisée le plus souvent pour différent analyse, mais également parfois pour purifier des molécules solubles sur différent gel. Le principe consiste à soumettre un mélange de molécules à un champ

électrique ce qui entraîne la migration des molécules chargées. En fonction de différents paramètres (charge, masse, forme, nature du support, conditions physico-chimiques) la vitesse de migration va être variable, ce qui permet la séparation des différentes molécules. Les fragments d'ADN migreront de l'anode vers la cathode. Les petits fragments migreront plus vite par rapport aux grands, de ce fait ils seront les plus éloignés aux puits.

2.2.3.1. Préparation de gel

Pour la préparation du gel nous utiliserons la solution Tampon TBE (Tris-borate-EDTA) qui est une solution tampon de migration utilisée en électrophorèse.

(Le **TBE** fournit une solution ionique qui permet le passage du courant à travers l'eau. Le **Tris** permet de maintenir l'ADN dé-protoné en solution. **EDTA** protège les acides nucléiques de la dégradation en supprimant certains ions métalliques et désactivant les enzymes qui détruisent l'acide nucléique.)

Deux grammes d'agarose sont pesés ensuite introduits dans un erlenmeyer contenant 100 ml de TBE (Tampon Tris-borate-EDTA) et 900 ml d'eau distillée. Afin de dissoudre complètement l'agarose dans le tampon, le mélange est bien homogénéisé ensuite placé à la micro-onde pendant quelques minutes à ébullition. Pour maintenir la solution homogène, cette dernière est agitée après l'ébullition.

(L'agarose est considéré totalement dissout lorsque les grains, initialement visibles sous forme de petites lentilles, ont complètement disparu.)

A l'aide d'un gant épais, la solution est sorti de la micro-onde, ensuite placée sous le robinet afin d'accélérer le refroidissement à environ 50°C. Une fois la solution refroidit, 10 µl du Gel Red sont prélevés à l'aide d'une pipette (P20) ensuite ajoutés à 100 ml du mélange précédent (le **Gel Red** permet la révélation des bandes aux rayons ultra-violet après migration sur le gel). Le tout est bien mélangé jusqu'à l'obtention d'un gel homogène.

Le support de gel est préparé, déposé horizontalement, ensuite réglé en positionnant les peignes de manière à obtenir 10 puits (2 puits pour les laideurs et 8 puits pour les 8 échantillons de vanille à étudier). Le support de gel est placé horizontalement puis le gel est versé délicatement

dans un coin du support (*les bulles d'air peuvent provoquer la déformation du bande lors de la migration, à éviter*). Pour finir le gel est laissé environ 30 min pour se solidifier (*Un gel froid (ou figé) prêt à être utilisé se reconnaît par son apparence opalescente lorsqu'il est observé par la tranche, alors qu'un gel encore liquide est parfaitement translucide.*)

Remarque :

Le Gel Red permet la révélation aux rayons ultra-violets.

Le TBE fournit une solution ionique qui permet le passage du courant à travers l'eau.

Le Tris permet de maintenir l'ADN déprotoné en solution.

EDTA protège les acides nucléiques de la dégradation en supprimant certains ions métalliques et désactivant les enzymes qui détruisent l'acide nucléique.)

2.2.3.2. La migration

A l'aide d'une micropipette, 17 µl de produit PCR est prélevé ensuite introduit dans un autre tube PCR propre en y ajoutant 2,5 µl du bleu stop. C'est le LADDEUR.

*Remarque : **Laddeur** composé de 100 pb sert de témoin de migration, la taille de ces fragments est préalablement connue sur.*

Avant d'effectuer l'électrophorèse, les peignes et les baguettes de coulage sont retirés puis le support de gel est placé dans une cuve recouverte de tampon TBE à environ 1cm au dessus du gel et en positionnant les puits du côté de l'anode. A l'aide d'une micropipette, 15 µl de l'échantillon 1 sont prélevés pour remplir le puits numéro 3 du gel, au lieu de 17µl (seulement 15 µl

car les puits étaient petits). Le même protocole a été adopté pour les autres puits sans oublier d'ajouter du Bleu stop par puits et changer de cône à chaque prélèvement. Les dépôts sont réalisés délicatement en évitant d'introduire des bulles voire mélanger les solutions dans les puits.

Après dépôts des échantillons, la cuve est fermée, le générateur est branché à une tension de 100V. La migration se fait pendant environ 1 heure de temps (*La vitesse de migration des acides nucléiques dépend du champ électrique*). Au bout de 1 heure de temps, le gel est transféré sur le trans-illuminateur UV pour observer la migration des bandes révélées. Pour finir une photo est prise pour des analyses (Figure n°1, Résultat).

2.2.4. Dendrogramme

Afin de connaître la distance génétique (D) entre deux individus, nous avons effectué les calculs entre tous les individus pris deux à deux à l'aide de la formule suivante (Tableau 6, Résultat):

$$D_{AB} = 1 - [(2 * n_{11}) / (2 * n_{11} + n_{10} + n_{01})]$$

Avec :

D_{AB}= représente la distance génétique entre deux individus A et B

n₁₁ = nombre de fragments communs entre les individus A et B

n₁₀ = nombre de fragments présents seulement chez A

n₀₁ = nombre de fragments présents seulement chez B

A partir des distances génétiques, un dendrogramme est construit en regroupant les individus qui ont des petites distances génétiques.

3. Résultat

3.1. Electrophorèse

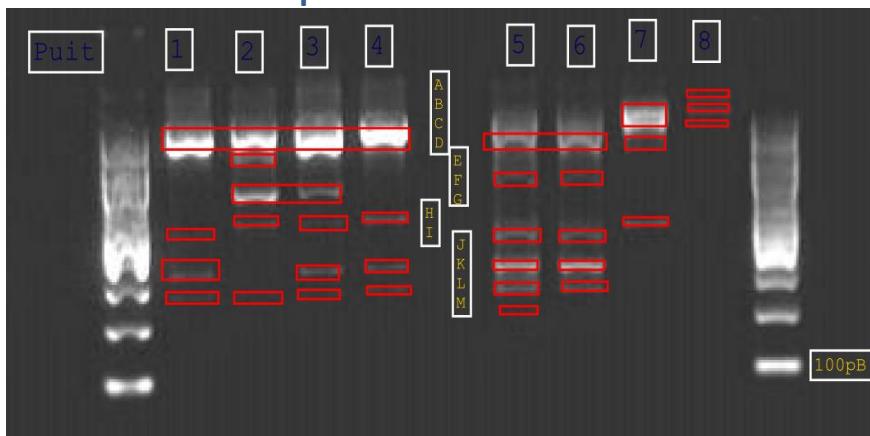


Figure 1a : Electrophorèse sur gel d'agarose (Révélation des fragments amplifiés pour les 8 individus)

Figure 1b : Fréquence de bande par individu (présence=1, absence=0)

Les chiffres sur l'électrophorèse représente la position des puits pour les 8 espèces étudiées, on trouve : les individus 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 qui correspondent successivement aux accessions CR0071, CR0072, CR0074, CR0076, CR0005, CR0039, CR0147 et CR0676 des deux espèces.

3.1.1. Lecture des bandes

L'électrophorèse montre la révélation de 13 bandes nommées de A à M (figure 1) sur les 8 individus de *vanilla s.p* étudiées, dont 12 sont polymorphes (seulement un fragment est présent sur tous les individus). Le nombre moyen de bande par individu est de $5 \pm 1,46$, cependant le polymorphisme est de 92%. La migration des bandes est repartie presque sur tous les différents niveaux. Les bandes A, B, F, J et M sont propres au *vanilla planifolia* de même les bandes E, G et H sont présentes que chez le *vanilla bahiana*. Les autres bandes sont partagées aléatoirement entre les deux individus.

3.1.2. Polymorphisme

		Totale	V.bahiana	V.planifolia
Fragment	Totale	13	8	10
	Polymorphe	12	5	9
	Moyenne	5	6	5
	Ecartype	1,46	0,58	2,06
	% Polymorphisme	92%	63%	90%

Tableau 4 : Pourcentage de polymorphisme sur l'électrophorèse

V.bahiana montre en moyenne $6 \pm 0,58$ fragments par individu dont deux sont polymorphes, d'où un polymorphisme de 63 %. *V.planifolia* montre en moyenne $5 \pm 2,6$ fragments par individu, dont 3 sont polymorphes, d'où un polymorphisme de 90%.

Bande	Individu							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0	0	0	0	0	0	0	1
B	0	0	0	0	0	0	1	1
C	1	1	1	1	1	1	1	1
D	1	1	1	1	1	1	0	0
E	0	1	0	0	0	0	0	0
F	0	0	0	0	1	1	0	0
G	0	1	1	0	0	0	0	0
H	0	1	1	1	0	0	0	0
I	1	0	0	0	0	0	1	0
J	0	0	0	0	1	1	0	0
K	1	0	1	1	1	1	0	0
L	1	1	1	1	1	1	0	0
M	0	0	0	0	1	0	0	0
totale	5	6	6	5	7	6	3	3

3.2. Distance génétique

3.2.1. Distance génétique

	n11	n10	n01	D
1-2	3	2	3	0,45
1-3	4	1	2	0,27
1-4	4	1	1	0,20
1-5	4	1	3	0,33
1-6	4	1	1	0,20
1-7	2	3	1	0,50
2-3	5	1	1	0,17
2-4	4	1	1	0,20
2-5	3	3	4	0,54
2-6	3	3	3	0,50
2-7	1	5	2	0,78
3-4	5	1	0	0,09
3-5	4	2	3	0,38
3-6	4	2	2	0,33
3-7	1	5	2	0,78
4-5	4	1	3	0,33
4-6	4	1	2	0,27
4-7	1	4	2	0,75
5-6	6	1	0	0,08
5-7	1	6	2	0,80
6-7	1	5	2	0,78

Tableau 5 : Distance génétique entre deux individus

On trouve des distances génétiques (D) qui varient entre 0,08 à 0,80 ; or en moyenne $D_m = 0,42 \pm 0,24$.

¹ $D_m =$ Distance génétique moyenne

Nombreux individus de la même espèce présentent une distance génétique plus faible ($D \leq 0,5$). Tous les individus originaires du Brésil ont une faible distance génétique ($D \leq 0,50$). On observe des grandes distances génétiques ($D \geq 0,78$) entre quelques individus de *V.planifolia* (individu 5 et 6 par rapport à l'individu 7) et entre les individus de différente espèce (individus 3 et 2 par rapport à l'individu 7). Les plus petites distances génétiques ($D = 0,85 \pm 0,5$) se trouvent entre individu de même espèce (Individu 3 et 4) et (individu 5 et 6).

N°1	1	2	3	4	5	6	7
1	0						
2	0,45	0					
3	0,27	0,17	0				
4	0,2	0,2	0,09	0			
5	0,33	0,54	0,38	0,33	0		
6	0,2	0,5	0,33	0,27	0,08	0	
7	0,5	0,78	0,78	0,75	0,8	0,78	0
N°2	1	2	3	4	5-6	7	
1	0						
2	0,45	0					
3	0,27	0,17	0				
4	0,2	0,2	0,09	0			
5-6	0,265	0,52	0,355	0,3	0		
7	0,5	0,78	0,78	0,75	0,79	0	
N°3	1	2	3-4	56	7		
1	0,00						
2	0,45	0,00					
3-4	0,24	0,19	0,00				
56	0,27	0,52	0,33	0,00			
7	0,50	0,78	0,77	0,79	0,00		
N°4	1	2-34	56	7			
1	0,00						
2-34	0,34	0,00					
56	0,27	0,42	0,00				
7	0,50	0,77	0,79	0,00			
N°5	1-56	234	7				
1-56	0,00						
234	0,4	0					
7	0,65	0,77	0				
N°6	156,234	7					
156-234		0					
7	0,7	0					

Tableau 6 : Résultat pour la construction du dendrogramme

Le dendrogramme construit selon la méthode UPGMA, montre deux groupes distincts (CR0071/CR005/CR0039) et (CR0076/CR0074/CR0072) avec une distance génétique de 0,4 (=2*0,2); ces deux groupes partagent des similitudes avec CR0147 avec une distance génétique de 0,70 (=2*0,35). Ces deux Groupes sont constitués de deux sous groupes avec un $D = 0,18$; les groupes sont constitués de deux individus d'une même espèce (avec $D \geq 0,8$) et d'un individu de la même espèce ($D_1=0,18, V.bahiana$) ou de l'autre espèce ($D_2=0,26, V.planifolia$) (avec D_1 et D_2 = distance

génétique de l'individu unique du groupe avec les deux autres individus).

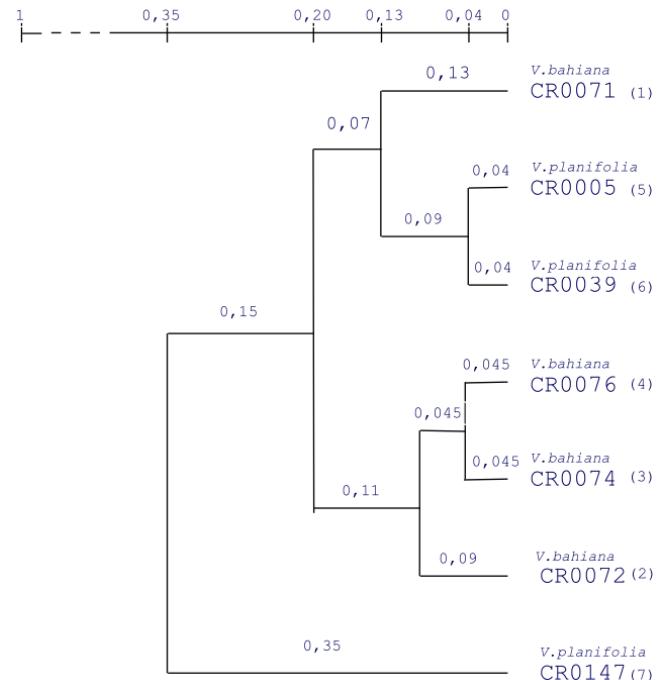


Figure 2 : Dendrogramme

4. Interprétation

4.1. Le PCR et l'électrophorèse

A partir de l'amorce ABA-1 à dix nucléotides, le PCR a permis d'amplifier 18 fragments d'ADN pour la totalité du génome des 8 espèces de vanille. Les autres fragments qui n'ont pas été amplifiés soient par cause de non fixation des amores due à des mutations ponctuelles ou simplement par une disfonctionnement des amores. Les laideurs n'ont pas très bien fonctionnés, on ne peut donc pas distinguer voire estimer la taille des fragments; ce problème peut résulter d'une erreur de préparation, de dépôt sur le gel voire même d'une disfonctionnement par usure d'utilisations (laideur très ancien). Ce pendant l'électrophorèse a confirmé ces résultats et montre que les fragments révélés ont des tailles, différentes et regroupées (Figure 1a). L'individu 8 ne montre presque pas de bandes sur l'électrophorèse (Figure 1a,1b) peut-être cet individu ne possède aucun des fragments révélés par cause de mutation, or comme on a eu révélation de plusieurs bandes sur l'électrophorèse pour les trois autres individus de la même espèce, l'hypothèse la plus probable serait une erreur de manipulation, de ce fait il ne sera pas considéré dans la suite de l'analyse.

4.2. Les distances génétiques et polymorphisme moléculaire

Les deux espèces étudiées sont génétiquement très proches avec une distance génétique moyenne $D_m \leq 0,42 \pm 0,24$ (Figure 3). Le grand écart des Distances génétiques ($0,08 \leq D \leq 0,80$) montre que il ya une très grande variabilité génétique entre *V.bahiana* et *V.planifolia* (Polymorphisme Interspécifique). L'électrophorèse confirme un polymorphisme interspécifique de 92% avec 12 fragments polymorphes sur 13 (Tableau 4).

Le dendrogramme obtenu montre une nette interconnexion entre les deux espèces, avec une séparation en deux groupes dont un formé de *V.bahiana* alors que le deuxième est une mélange de deux espèces : ¼ des individus de *V.bahiana* ont une très grande similarité génétique avec $D \leq 0,18 = 2 * 0,09$, dont 2/4 ont une $D \leq 0,09 = 2 * 0,045$; Alors que seulement 2/3 des individus de *V.planifolia* ($D \leq 0,08 = 2 * 0,04$) partagent une grande similitude avec 1/3 de *V.bahiana* avec $D \leq 0,26 = 2 * 0,13$ (Figure 2). Les deux espèces montrent beaucoup de polymorphismes génétiques entre les individus de même espèces.

4.3. Le polymorphisme moléculaire

V. planifolia montre un polymorphisme intraspécifique plus grand (90%) par rapport à *V.bahiana* (63%) (Tableau 4)

Un grand polymorphisme moléculaire (P.M) est observé chez le *V.planifolia*, or ils sont tous originaire du Mexique. Ce polymorphisme interspécifique est dû à une mutation suite à une adaptation, en effet tous les *V.planifolia* sont tous originaire du Mexique mais introduit et cultivée dans différent endroit de la planète tel-que Amérique centrale, Madagascar, Martinique et Fiji d'où un problème d'isolement reproducteur. Dans son pays d'origine, le vanillier sauvage pouvait se resserrer spontanément à partir de graine en raison de la présence de Mélipones, insecte Hyménoptères assez proche des abeilles qui fécondent les plantes et assurent la reproduction sexuée croisée (Botineau M, 2010); alors que les vanilliers introduits ont besoin de l'intervention de l'homme pour sa pollinisation et sa plantation par bouturage (Severine B, 2007)

D'où les vanilles sauvages devraient avoir une grande diversité génétique due aux panmixies lors

des croisements entre différent individu, ce qui est pas le cas pour *V.bahiana*.

En outre, on observe une grande diversité génétique entre espèces cultivées (*V.planifolia*) par rapport à l'espèce sauvage (*V.bahiana*). En effet les échantillons pour les espèces cultivées sont récoltés dans des écosystèmes différents et très éloignés (océan Indien (Madagascar), Atlantique (Martinique et Amérique centrale), pacifique (Fiji); la combinaison de l'absence du pollinisateur et de l'adaptation au nouveau écosystème ont conduit à des mutations spontanées, d'où les grands polymorphismes. En effet l'introduction des vanilliers sauvages dans d'autres territoires comme la Réunion (au début du XIX^e siècle), entraîne la stérilisation de ceux-ci en absence de ses pollinisateurs sur place et n'ont donc pas donné de fruits. On peut supposer qu'avant la découverte de la pollinisation par l'homme, il ya eu des mutations ponctuelles sans panmixie, en fonction de l'écosystème d'intrusion, pour les vanilles cultivées, alors que la richesse génétique augmentait par panmixie chez les vanilles sauvages.

De plus les échantillons de *V.bahiana* proviennent d'un même lieu (Brésil), on peut supposer qu'ils sont récoltés sur une même sous population, d'où un plus faible polymorphisme génétique.

5. Conclusion

Tous les individus des deux espèces montrent un polymorphisme génétique plus grand par rapport à ceux des individus de la même espèce de vanille, on a donc une diversité interspécifique qui est très grande par rapport à la diversité intraspécifique.

L'introduction, l'absence du pollinisateur et les mutations ont conduit à une grande diversité intraspécifique pour *V.planifolia* cultivé par rapport à *V.bahiana* qui a majoritairement connu que la panmixie et ou la mutation.

Cette étude a permis de montrer que différents sous espèces de *V.bahiana.sp* vivent dans la nature et partagent une même aire de répartition en Amérique (brésil), ils résulteraient donc d'une spéciation sympatique. Alors que différents sous espèces de *V.planifolia.sp* vivent dans des différentes aires de répartitions, ils résultent d'une spéciation allopatrique.

6. Bibliographie

Botineau M., Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, Michel Botineau, Lavoisier, 2010

Duval M.-F., et all, BRG, Diversité génétique des vanilliers dans leurs zones de dispersion secondaire, 6 2006.6 : p 181-196

Séverine B., Divercité de *vanilla planifolia* G.jackson dans l'Océan Indien et des espèces apparentées : aspects génétiques, cytologiques et épigénétiques, 2007