

POLYMORPHISME DES MÉTABOLITES SECONDAIRES DANS LE GROUPE DU LOTUS CORNICULATUS L.

S. BLAISE, A. LOUVEAUX, A. BAZIN,
D. CARTIER & J. P. BRIANE

Abstract

Frequencies of cyanogenic phenotypes and condensed tannins amounts are studied on different French populations of *L. corniculatus*. Two plain populations, very closed from each other were studied: one is a scorch lawn, the other one is a meadow. Meadow populations are monomorphic for cyanogenesis [AcLi] and have a little amount of tanins. Lawn populations are polymorphic, [acli] phenotype being dominant and they are tanin rich. Herbivore's pressure at the study site, had no measurable effect on phenotypic frequencies. This results are extendible to 13 species in the genera. In French Alps keel color polymorphism of *L. corniculatus* and *L. alpinus* was related to cyanogenic polymorphism.

Introduction

Le genre *Lotus* renferme de nombreuses espèces, les unes à $x = 6$ les autres à $x = 7$ chromosomes. Elles produisent soit des tanins condensés ou proanthocyanidols, soit des cyanoglucosides, soit les deux.

Certaines de ces espèces en particulier *L. corniculatus* L. et *L. alpinus* (DC.) Ramon présentent un polymorphisme polyphénolique intra ou inter-populations, qui se traduit par l'absence ou la présence des molécules précitées et plus particulièrement par l'émission ou non de gaz cyanhydrique (CNH) après lésion de l'individu, ainsi que par une coloration mauve ou brune de la pointe carénale, par opposition à une corolle totalement jaune.

Il est généralement admis qu'herbivores, pollinisateurs et facteurs abiotiques sélectionnent les individus au sein des populations et conduisent ainsi à l'établissement de ce polymorphisme.

Matériel et méthodes

Des tests semi - quantitatifs pour les tanins comme pour le cyanure sont effectués sur des individus *in situ* ou provenant d'herbier, d'un certain nombre d'espèces du groupe du *L. corniculatus* ($x=6$) ou d'autres groupes à $x=6$ ou 7.

Dans une approche couvrant la France, ont été étudiées la fréquence des phénotypes cyanogéniques de 14 populations et les quantités moyennes de tanins condensés de 10 populations de *L. corniculatus* L. de plaine (prairies ou pelouses sèches) et d'altitude.

Par ailleurs dans une étude stationnelle (Oulches-36) ont été comparées entre elles deux populations de plaine de ce même taxon différant par leur écologie (pelouse ou

prairie) et coexistant à faible distance l'une de l'autre (200 m). Sur la population de pelouse, une grille de 9m sur 9 à maille d'un m², a permis d'étudier la répartition spatiale des individus en relation avec la végétation et les herbivores.

En outre, le polymorphisme de la pointe carénale observé dans une station des Alpes françaises située au Col des Champs (04) à 2200 m. d'altitude où cohabitent *L. alpinus* et *L. corniculatus* est mis en relation avec le comportement cyanogénique.

Les cyanotypes CNH+, CNH- sont révélés par la méthode au picrate de sodium et deux tests complémentaires servent à différencier les quatre phénotypes [AcLi], [Acli], [acLi] et [acli].

Les tanins condensés sont dosés à chaud en milieu acide et en présence d'ions ferriques; l'absorbance est lue à 550 nanomètres (BATE-SMITH, 1973). Les valeurs sont données en mg/g de poids sec, équivalent anthocyanidines.

Résultats

Répartition des métabolites secondaires dans le genre

D'après le tableau 1, certaines espèces sont monomorphes pour la cyanogénèse (par exemple *L. glaber* Miller et *L. ornithopodioïdes* L.) d'autres, polymorphes (*L. corniculatus* et les espèces voisines *L. delortii* Timb. Lagr.; *L. alpinus*).

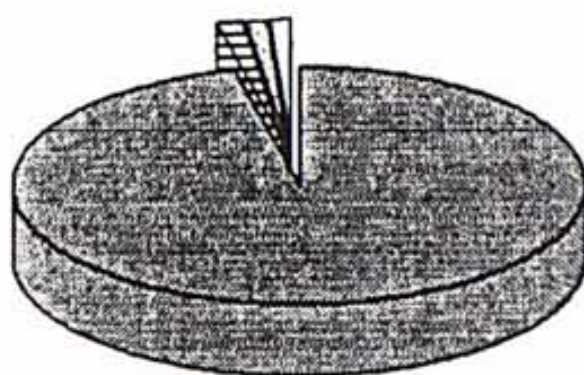
Il existe de même une grande variabilité inter- et intrapopulationnelle des quantités de tanins condensés.

Polymorphisme de la cyanogénèse chez *L. corniculatus*:

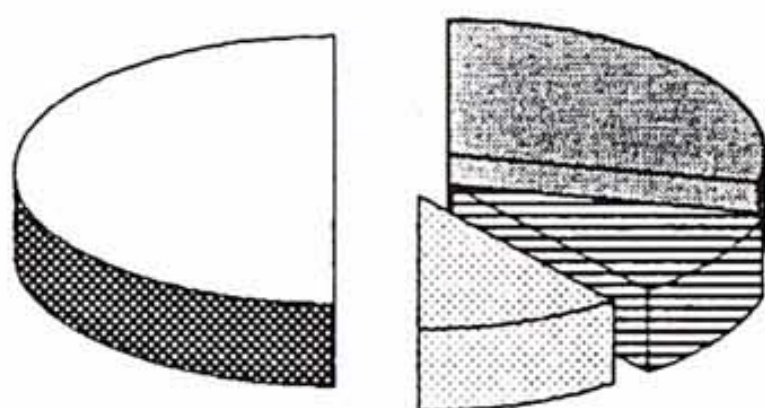
Comparaison de populations à l'échelle de la France.- En général, en plaine on constate une raréfaction voire une disparition des cyanotypes CNH- (JONES, 1973). Nous avons observé effectivement (Fig. 1) dans les groupements prairiaux soumis à compétition (sol eutrophe) des populations pratiquement monomorphes CNH+; par contre dès que l'on est en pelouses sèches (sol oligotrophe) le polymorphisme apparaît plus équilibré avec une fréquence relativement élevée de plantes [acli]. Le même phénomène s'observe en altitude, plus particulièrement dans les Alpes internes où un allèle (le plus souvent Ac) tend à se fixer. En général, le taux de plantes cyanogènes dépend en plaine du type de groupement (pelouse ou prairie) et en montagne, de l'altitude.

Etude approfondie de la station d'Oulches (Fig. 2).- Dans une pelouse où ont été étudiés en détail la répartition spatiale et le phénotype de 170 individus on constate que la population est très polymorphe avec une dominante de plantes [acli] (47%), tandis que dans une prairie distante de 200 m. les lotiers sont cyanogéniques à plus de 90% (LOUVEAUX & al., 1995). Dans ce dernier cas la couverture végétale est homogène et la multiplication végétative des individus semble importante puisque des taches de 10 brins et plus sont observées. La pelouse colonise un replat de carrière calcaire où le milieu est hétérogène. Il n'y a pas d'impact mesurable des herbivores (petits

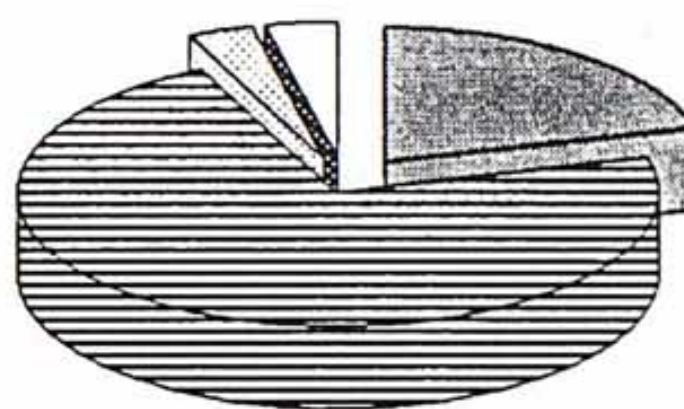
Plaine (sol eutrophe)



Plaine (sol oligotrophe)



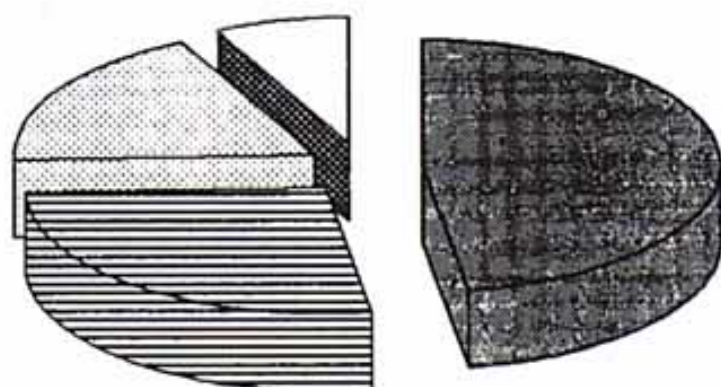
Montagne (1700 à 2200 m)



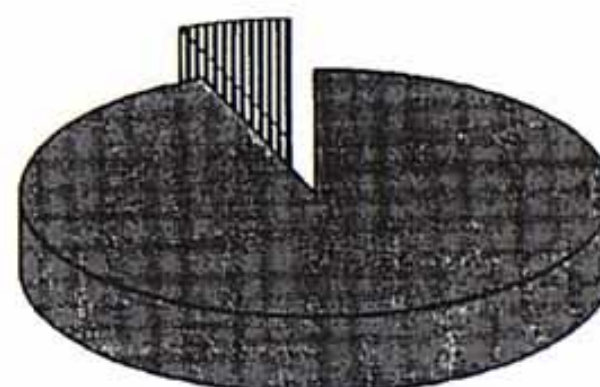
AcLi
 Acli
 acLi
 acli

Fig. 1: Fréquence moyenne des quatre phénotypes dans trois catégories de milieux : 5 stations eutrophes, 6 stations oligotrophes et 3 stations d'altitude.

Pelouse sèche



Prairie



AcLi
 Acli
 acLi
 acli
 HCN-

Fig. 2: Fréquence des phénotypes dans les deux stations d'Oulches; dans la prairie les trois cyanotypes CNH- ayant des fréquences très faibles ont été regroupés.

mollusques, criquets et chenilles de lycaenides) sur la phytomasse des lotiers. En effet, ceux-ci sont de petite taille, forment peu de brins et ne représentent que 1% de la biomasse aérienne. Par ailleurs, le fait que les quatre phénotypes puissent coexister dans un secteur restreint de la grille prouve que la reproduction sexuée y est le mode de propagation prépondérant contrairement à ce qui se passe en prairie. Le taux de plantes cyanogènes dépend non seulement du type de groupement mais également des caractères édaphiques de la station.

Variations de la quantité de tanins condensés chez *L.corniculatus*:

En plaine, dans les prairies les quantités de tanins condensés exprimées en mg.g^{-1} de poids sec sont plus faibles que dans les pelouses: soit sur 5 populations et 30 individus dans chaque cas, respectivement, $18,4 \pm 6,3$ et $31,81 \pm 5,9$ avec une différence significative à $p < 0,01$ (BAZIN & al., 1994). On remarque que les populations prairiales fortement cyanogéniques sont les moins riches en tanins (Fig. 3).

A Oulches les quantités sont de $34,5 \pm 8,5$ et de $14,4 \pm 6,6$ pour respectivement, 50 individus de pelouse et 50 de prairie (Bazin, com. orale).

Couleur de la pointe carénale

La couleur de la pointe carénale est contrôlée par une paire d'allèles B/b héritée tétrasomiquement chez les tétraploïdes, la couleur mauve étant dominante sur la couleur jaune (RAMNANI & JONES, 1984).

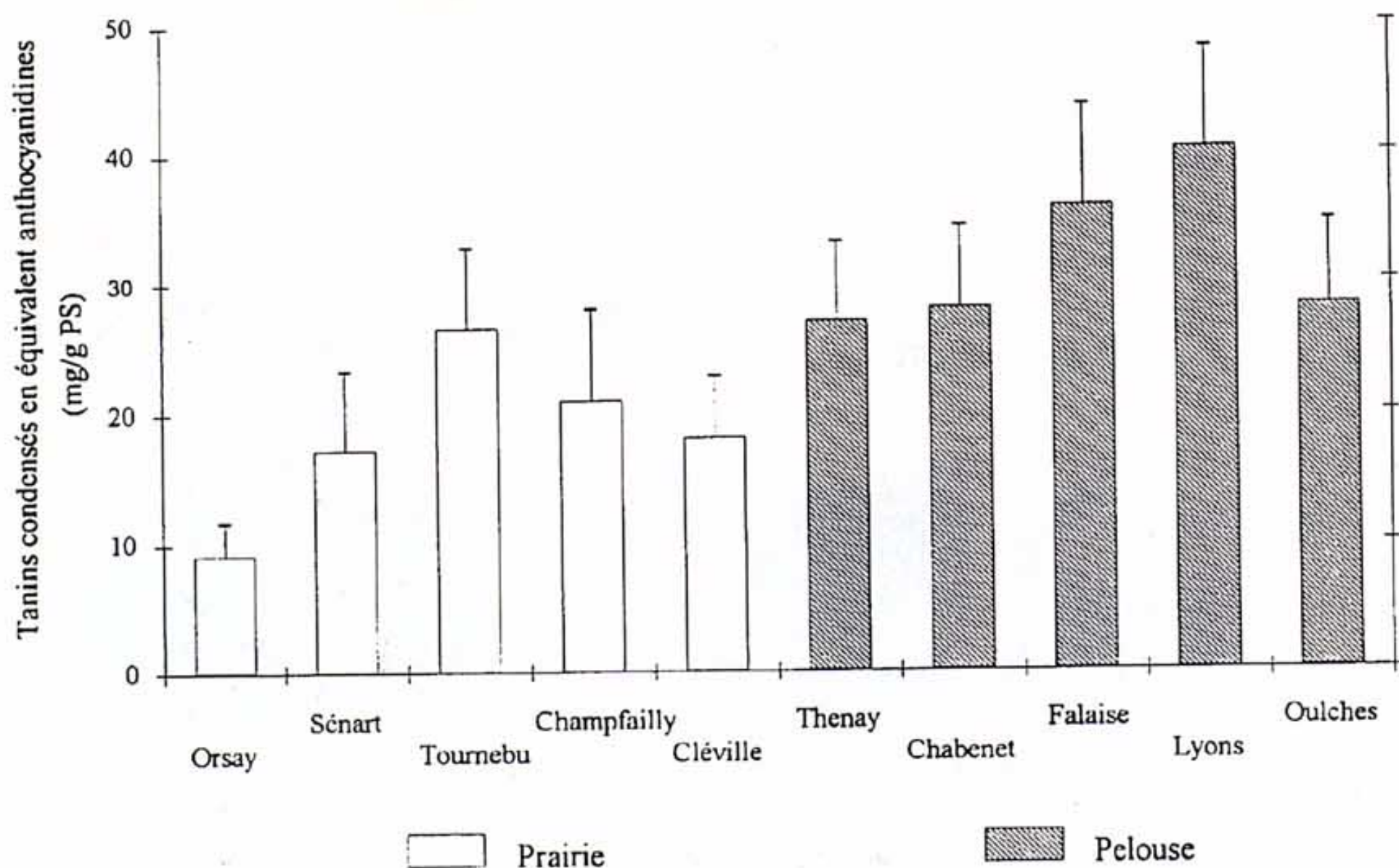


Fig. 3: Quantité moyenne en tanins condensés ($\text{mg g}^{-1} \pm \text{S.D.}$) de 10 populations de prairies et de pelouses (30 individus par population).

COMPTON & al. (1983) signalent que la couleur s'exprime en général indépendamment des deux gènes de la cyanogénèse.

Dans la population d'altitude étudiée, où poussent en mélange *L. alpinus* et *L. corniculatus*, il existe un polymorphisme pour la couleur de la pointe carénale. Les proportions d'individus à carène jaune ou mauve comme d'ailleurs celles des plantes cyanogéniques diffèrent selon les cytotypes.

Chez les diploïdes les individus CNH+ à carène mauve sont nombreux, alors que chez les 4x les deux types de carènes ainsi que les deux cyanotypes sont en proportions voisines (Fig. 4). Chez les premiers existe une liaison significative entre l'allèle Li et la couleur mauve de la carène laquelle est répartie indifféremment entre les cyanotypes CNH+/CNH- avec un léger déséquilibre vers le phénotype CNH-.

Discussion et conclusion

Dans toutes les espèces testées (Tableau 1) la présence de cyanure est en proportion inverse de celle des tanins condensés. Nos résultats ne sont cependant pas toujours en accord avec ceux de la bibliographie (par exemple *L. glaber* est parfois donné polymorphe alors que nos observations le montrent monomorphe). On retrouve ces mêmes caractéristiques dans les populations de *L. corniculatus* étudiées ici: sur sols riches les fréquences de plantes CNH + sont élevées et le taux moyen de tanins condensés faible tandis que l'inverse s'observe sur sols pauvres ; pour remarque, c'est dans les situations où les contraintes abiotiques (pauvreté du sol en nutriments, eau et température) sont prédominantes que les quatre phénotypes cyanogéniques sont les mieux représentés.

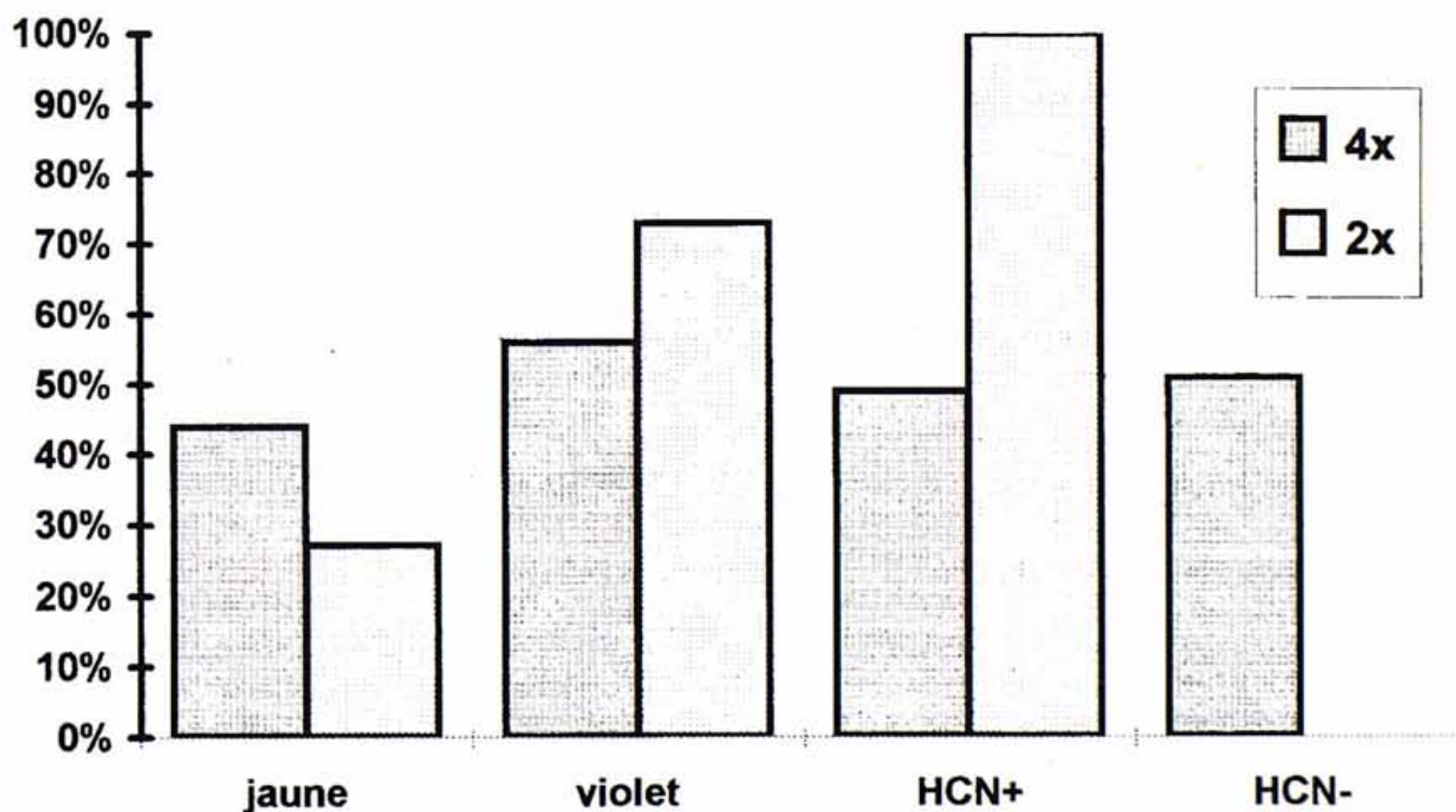


Fig. 4: Fréquence des individus 2x (*L. alpinus*) et 4x (*L. corniculatus*) à carène jaune ou violette et CNH+ ou CNH- dans une station au Col des Champs (Alpes de haute Provence).

Espèce		Origine	HCN	tanins
<i>L. creticus</i> L.	2n=28	H: Bonifacio (20)		+++
<i>L. cytisoides</i> L.	2n=14	H: Port-Cros (83) H: Cyaccio	+	- -
<i>L. drepanocarpus</i> Dur.	2n=14	H: Marseille (13)		+
<i>L. edulis</i> L.	2n=14	H: Sinfour F: Crête (2 populations)	+++	- -
<i>L. ornithopodioides</i> L.	2n=14	H: Alger H: Toulon (83) F: Castellar (06)	+++	+ + +
<i>L. corniculatus</i> L.	2n=24	F: jardin (91) F: Collias (30)	+++/- +++/-	++ ++
<i>L. delortii</i> Timb. Lagr.	2n=24	H: Toulon (83) H: St Etienne du gré (13) H: La Clape (11)	++/-	- - -
<i>L. alpinus</i> (D.C.) Ramon	2n=12	F: Mont Ventoux (84) F: Criou, Tralenta	++ +/-	+ +
<i>L. glaber</i> Mill.	2n=12	H: Hérault (34) H: Isère (38) F: Orsay (91)	+++ +++	- - -
<i>L. uliginosus</i> Schkuhr	2n=12	F: Orsay (91) F: Capelière (13) F: Jardin Pinçon (14)	- - -	+++ +++ +++
<i>L. preslii</i> Ten.	2n=24	H: Montpellier (34) F: Carnon (34)	-	+++ +++
<i>L. hispidus</i> Desf.	2n=24	H: Tunisie F: Pointe de Crozon (34)	-	+++ +++
<i>L. angustissimus</i> L.	2n=12	H: Montélimar (26) H: Hérault (34) F: Poulx (30)	-	+ +++ +

Tableau 1. Présence ou absence de deux métabolites secondaires HCN et tanins condensés: H = plantes provenant d'herbier, F= matériel frais. Le nombre de signes + ou - est proportionnel à l'intensité de la réaction photométrique. CNH est difficile à tester sur plantes d'herbier.

En conditions expérimentales, il est acquis que cyanure et tanins condensés sont des substances dissuadantes, voire toxiques à fortes doses, vis à vis des phytophages généralistes (ROSENTHAL & JANSEN, 1979). Au champ, il est beaucoup moins évident que la protection chimique soit suffisante pour modifier la structure polymorphique des populations de lotiers. HRUSKA (1988) dans une revue critique souligne des contradictions dans les résultats observés. D'après JONES (1966) la sélectivité semble dépendre pour beaucoup du phytophage testé.

Le facteur altitude, démontré comme déterminant la fréquence des individus cyanogéniques de *Trifolium repens* (DADAY, 1954), ne peut expliquer les variations du polymorphisme de *L. corniculatus* en plaine. D'autres facteurs abiotiques doivent avoir leur importance.

Comme le prouve l'étude de la pelouse d'Oulches, un habitat ouvert et hétérogène pourrait être favorable au maintien du polymorphisme. En effet, de nombreux auteurs (MAYNARD-SMITH, 1978 ; VERNET & al., 1987) ont montré que la diversité génétique était liée à l'hétérogénéité spatio-temporelle.

Les variations quantitatives et qualitatives de production de substances secondaires dépendent de facteurs internes (génétiques) et externes (biotiques et abiotiques), ces derniers agissant au niveau de la structure génétique ainsi qu'à celui du métabolisme même des individus.

Finalement, les comportements écologiques et biochimiques des populations d'une espèce apparaissent bien corrélés, ce qui souligne le rôle important des conditions environnementales.

Pour exemple, les espèces calcicoles (*L. glaber*) comme d'ailleurs les populations calcicoles d'espèces à grande amplitude édaphique (*L. corniculatus* dans les Préalpes, *L. alpinus* au Mont Ventoux) sont fortement cyanogéniques tandis que les espèces silicicoles ou de sol décalcifié (*L. uliginosus*) ainsi que les populations silicicoles de *L. corniculatus* et *L. alpinus* (sur granite alpin) sont plutôt riches en tanins.

Il ne faut pas négliger l'aspect phylogénique. Des études caryologiques ont montré les liens étroits entre *L. uliginosus* et *L. preslii* tous deux fortement taniques. Le polymorphisme intrapopulationnel des seuls *L. corniculatus* et *L. alpinus* ne fait qu'apporter un argument supplémentaire à leur filiation privilégiée.

Enfin, si des différences biochimiques entre espèces ou groupes d'espèces restent parfois difficiles à corrélérer avec leur écologie mal connue, ou encore à expliciter par la phylogénie, elles n'en constituent pas moins de très bons marqueurs dans la systématique parfois délicate de ces taxons.

Références

- BATE-SMITH, E. C. (1973). Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. *Phytochemistry*. **12**.
- BAZIN, A., S. BLAISE, & D. CARTIER (1994). Polymorphism of two defense mechanisms in French populations of *Lotus corniculatus* L.: cyanide and condensed tanins. *Proc. First Int. Lotus Symp.*: 193-197.
- COMPTON, S. G., D. NEWSOME, & D. A. JONES (1983). Selection for cyanogenesis in the leaves and petals of *Lotus corniculatus* L. at high latitudes. *Oecologia (Berlin)* **60**: 352-358.

- DADAY, H. (1954). Gene frequencies in wild populations of *Trifolium repens* L. I. Distribution by latitude. *Heredity*, **8**: 61-78.
- HRUSKA, A. J. (1988). Cyanogenic glucosides as defense compounds. A review of the evidence. *J. Chem. Ecol.* **14**: 2213-2217.
- JONES, D. A. (1966). On the polymorphism of cyanogenesis in *Lotus corniculatus* L. I. Selection by animals. *Can. J. genet. Cytol.* **8**: 556-567.
- (1973). Co-evolution and cyanogenesis. In V. H. HEYWOOD (ed.), *Taxonomy and Ecology*: 213-242. Systematics Association Special Volume N° 5. London and New York. Academic Press.
- LOUVEAUX, A., S. BLAISE, D. CARTIER & J.M. DREUILLAUD (1995). Biodiversité intraspécifique dans les formations prairiales. I- Recherche des causes de variation, à l'échelle locale, du polymorphisme cyanogénique chez *Lotus corniculatus* L. (Fabacées). *Acta Bot. Gall.* (sous presse).
- MAYNARD-SMITH, J. (1978). *The evolution of sex*. Cambridge University Press, Cambridge.
- RAMNANI, A. D. & D. A. JONES (1984). Inheritance of the brown keel tip character in *Lotus corniculatus* L. *Bangladesh J. Bot.* **13**(1): 52-59.
- ROSENTHAL, G. A. & D. H. JANZEN (eds.) (1979). *Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites*. Academic Press New York London.
- VERNET, P., A. DUCOUSSO, D. PETIT & M. VALERO (1987). Genetic structure and diversity patterns in adjacent populations: *Arrhenaterum elatius* (L.) Beauv. In K. URBANSKA (ed.) *Differentiation pattern in higher plants*. **7**: 131-152. Acad Press.

Adresses des auteurs:

Dr. S. Blaise, Dr. A. Bazin & Dr. J. P. Briane, Biologie Végétale, Populations et Communautés, Bâtiment 362, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France; Dr. A. Louveaux, Biologie Evolutive et Dynamique des Populations, Bâtiment 446, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France; Dr. D. Cartier, Evolution et Systématique, Bâtiment 362, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France.