

Contrôle génétique de l'hydroxylation en 5' des anthocyanes dans les fleurs d'*Hedysarum coronarium* L et *H capitatum* Desf, Asch et Gr

A Chriki

École normale supérieure de bizerte, 7021 Zarzouna, Tunisie

(Reçu le 6 février 1990; accepté le 11 juin 1990)

Résumé — L'analyse génétique et chromatographique de la pigmentation florale chez *H coronarium* et *H capitatum* montre que l'introduction du groupement hydroxyle en position 5' de la molécule anthocyanique est déterminée par deux gènes indépendants V et R. Les allèles dominants de ces gènes contrôlent la synthèse de la malvidine. Cependant, l'action du gène R est moins prononcée, de sorte que :

- dans les lignées VVRR (ou VVrr), l'hydroxylation quasi totale en 5' des anthocyanidines détermine l'accumulation de la malvidine et l'expression du phénotype violet;
- dans les lignées vvRR, l'hydroxylation partielle en 5' des anthocyanidines entraîne l'accumulation simultanée de la malvidine et de la paeonidine, déterminant le phénotype rouge-violacé;
- dans les lignées homozygotes récessives (vrrr), l'hydroxylation en 5' des anthocyanidines n'a pas lieu et la paeonidine est synthétisée en abondance dans les fleurs rouges.

contrôle génétique / anthocyane / hydroxylation en 5' / *Hedysarum*

Summary — The genetic control of anthocyanin 5' hydroxylation in flowers of *Hedysarum coronarium* L and *H capitatum* Desf, Asch et Gr. The results of chemogenetic studies on flower pigmentation in *Hedysarum coronarium* and *H capitatum* are reported. Using thin-layer chromatography for the identification of anthocyanidins in parental strains with different flower colorations, 3 phenotypes were clearly defined (table II) :

- The red phenotype is determined by the accumulation of paeonidin, a pigment derived from cyanidin (3'-hydroxylated: fig 1).
- The purple flowers accumulate malvidin derived from delphinidin (3', 5'-dihydroxylated : fig 1).
- The purplish-red phenotype results from the simultaneous accumulation of malvidin and paeonidin.

The chromatographic study of pigments in different colored strains was confirmed by semi-quantitative determination of anthocyanidins in defined phenotypes (table III). We concluded that the flower color type in *Hedysarum* was correlated with flavonoid 5'-hydroxylation activity.

Segregation analysis of flower colors in F_2 (table VI), showed that the introduction of the 5'-hydroxyl group of the anthocyanidin molecule was determined by 2 particular genes, V and R (table VII). Dominant alleles of these genes control the synthesis of malvidin. However, the action of the gene R is less pronounced, so that :

- In lines VVRR (or VVrr), the quasi-total anthocyanidin 5'-hydroxylation determines the accumulation of malvidin and the expression of purple phenotype.
- In lines vvRR, the partial anthocyanidin 5'-hydroxylation is correlated with the simultaneous accumulation of malvidin and paeonidin, determining the purplish-red phenotype.
- In homozygous recessive lines (vrrr), anthocyanidin 5'-hydroxylation does not occur and paeonidin is abundantly synthesized in red flowers.

genetic control / anthocyanin / 5'-hydroxylation / *Hedysarum*

INTRODUCTION

Depuis quelques années, des espèces du genre *Hedysarum* (légumineuses, papilionacées) poussant dans le bassin méditerranéen et en particulier en Afrique du Nord, font l'objet de différentes recherches. Ces travaux ont porté essentiellement sur l'étude de la biologie de la reproduction (Chriki *et al*, 1984) ainsi que sur la variabilité tant morphologique (Combes *et al*, 1975; Figier *et al*, 1978) qu'enzymatique (Trifi-Farah *et al*, 1989a, b). Le polymorphisme de l'ADN chloroplastique et mitochondrial a été également analysé dans le genre *Hedysarum* (Baatout *et al*, 1985). Une analyse cytogénétique préliminaire (Combes *et al*, 1975; Baatout *et al*, 1985) montre qu'à l'exception d'*H pallidum* (tétraploïde), les espèces d'*Hedysarum* étudiées sont diploïdes ($2n = 16$).

Par ailleurs, des études de variabilité, d'*H coronarium* notamment, ont porté sur des caractères agronomiques, afin de créer de nouveaux cultivars (Monotti, 1975; Sarno *et al*, 1978). La valeur nutritive d'*H coronarium* a été étudiée, entre autres, par Cenni *et al* (1968) et Ballatore (1972). Ces travaux ont montré que l'espèce *H coronarium* présentait des qualités fourragères équivalentes à celles du trèfle violet et de la luzerne et ont permis la création de variétés cultivées.

Cependant, la digestibilité et la valeur nutritive des écotypes spontanés d'*Hedysarum* paraissent meilleures que celles des variétés cultivées (Cenni *et al*, 1968). C'est pourquoi, la plupart des travaux effectués et ceux en cours de réalisation en Tunisie sont axés sur les types sauvages afin d'inventorier les ressources génétiques des espèces du genre *Hedysarum*. Dans ce cadre, une étude détaillée des populations naturelles en vue de leur évaluation s'est avérée nécessaire tant du point de vue fondamental que du point de vue agronomique. Pour réaliser cet objectif, il était important d'identifier des marqueurs génétiques, tels que ceux liés à la coloration anthocyanique des fleurs.

De nombreuses prospections effectuées en Tunisie (1975, 1981, 1983), au Sud de la France (1976), au Maroc (1977), en Algérie (1981), en Sardaigne et à Malte (1983) ont montré que les populations naturelles d'*H coronarium* et d'*H capitatum* offraient une diversité de coloration des fleurs allant du rouge au violet, en passant par le rouge-violacé.

C'est à partir de graines récoltées dans les populations naturelles que nous avons constitué,

par des autofécondations répétées, diverses lignées, à fleurs rouges ou violettes chez *H coronarium*, à fleurs rouge-violacées ou violettes chez *H capitatum*. L'obtention de telles lignées stables quant à leur pigmentation florale a nécessité, au moins, trois générations successives d'autofécondation. Ces lignées ont été utilisées dans l'étude de l'hérédité de la pigmentation anthocyanique chez ces deux taxons.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les lignées

Les principales caractéristiques des lignées utilisées dans cette étude sont indiquées dans le tableau I. Les autofécondations et les croisements ont été réalisés selon les techniques habituelles, adaptées à la biologie florale d'*Hedysarum* (Chriki *et al*, 1982 et 1984).

Appréciation quantitative des anthocyanidines

Comme la plupart des flavonoïdes, les anthocyanes se trouvent dans la vacuole sous forme hétérosidique. Leur hydrolyse acide libère le (ou les) sucre(s) et l'aglycone ou anthocyanidine (Harbone, 1973). Les principaux flavonoïdes non colorés (flavones et flavonols) et les anthocyanes ont été déjà identifiés chez *Hedysarum* (Chriki *et al*, 1982; Chriki et Harbone, 1983; Chriki *et al*, 1986).

Tableau I. Origine et phénotype des lignées utilisées dans l'étude de la pigmentation florale chez *H coronarium* et *H capitatum*.

Taxon	Population d'origine	Désignation	Phénotype
<i>Hedysarum coronarium</i>	Makthar	Mk	Violet
	Tadjerouin	Tadj	Violet
	Campus (Tunis)	C	Rouge
	Forêt Aïn-Djemala	Fad	Rouge
<i>H capitatum</i>	Djebel Zit	Zt	Rouge
	Sousse	Sv	Violet
	Algérie	AI025	Rouge-violacé
	Algérie	AI031	Rouge-violacé

Pour connaître la constitution pigmentaire des fleurs des différentes lignées utilisées dans cette analyse, nous nous sommes bornés à la détermination des anthocyanidines et des flavonols-aglycones. Pour cela, nous avons appliqué la technique de chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de cellulose (Merck), déjà décrite par Nybom (1964) et légèrement modifiée par Farcy et Cornu (1979).

Les solvants utilisés sont pour la première dimension : acide formique / HCl conc / eau (40/1/15), en volume; pour la deuxième dimension : alcool amylique / acide acétique / eau (2/1/1) en volume.

Cette technique, nous a permis d'une part, de séparer les composants des mélanges pigmentaires les plus complexes, et d'autre part, d'apprécier, par notation visuelle des plaques, les quantités relatives des différents pigments présents dans un même génotype. Cette appréciation a été confirmée, pour certaines lignées, par une détermination semi-quantitative des pigments floraux, réalisée dans le laboratoire du Professeur Cornu (INRA, Dijon), à l'aide d'un densitomètre (Vitatron).

RÉSULTATS

Caractérisation biochimique des lignées parentales chez *H coronarium*

L'application de la technique de chromatographie en deux dimensions nous a permis de définir la composition en flavonols et en anthocyanidines des deux phénotypes de base : fleurs violettes et fleurs rouges, rencontrés chez cette espèce (tableau II). Cinq pigments anthocyaniques ont été mis en évidence : la delphinidine, la pétunidine, la cyanidine, la malvidine et la paeonidine (fig 1). Trois types de flavonols ont été repérés : le kaempférol, la quercétine et la myricétine. Toutefois, la teneur des extraits en quercétine est nettement plus élevée que leur teneur en kaempférol; la myricétine étant à l'état de traces. La différence phénotypique observée est due à une différence quantitative en anthocyanidines :

Les plantes à fleurs rouges se caractérisent par l'abondance de la paeonidine, la présence, en quantités plus faibles, de la cyanidine et de la malvidine, et, à l'état de traces, de la delphinidine et de la pétunidine.

Les plantes à fleurs violettes se caractérisent par la prédominance de la malvidine, à des concentrations nettement plus faibles, de la paeonidine et de la pétunidine, et, à l'état de traces, de la delphinidine et de la cyanidine.

Tableau II. Composition des fleurs en flavonols et en anthocyanidines chez *H coronarium* et *H capitatum*. km : kaempférol, Qu : quercétine, My : myricétine, Dp : delphinidine, Pt : pétunidine, Mv : malvidine, Cy : cyanidine, Pn : paeonidine. Le chiffre donné correspond à une appréciation visuelle quantitative de la tache obtenue (intensité et surface); la quantité la plus faible étant tr (traces) et la plus forte 5.

Lignée	Phénotype	Flavonols			Anthocyanidines				
		Km	Qu	My	Dp	Pt	Mv	Cy	Pn
					Tri-OH			Di-OH	
<i>H coronarium</i>									
Mk	Violet	1	4	tr	tr	1	5	tr	1
Tadj	Violet	1	3	tr	tr	1	4	tr	1
C	Rouge	1	3	tr	tr	tr	1	1	5
Fad	Rouge	1	3	tr	tr	tr	1	2	5
Zt	Rouge	1	3	tr	tr	tr	1	2	5
<i>H capitatum</i>									
Sv	Violet	1	4	tr	tr	1	5	tr	1
Al0258	Rouge-violacé	1	3	tr	0,5	1	4	0,5	3,5
Al031	Rouge-violacé	1	3	tr	0,5	1	4	0,5	3,5

Il existe donc, chez *H coronarium*, un certain équilibre entre les pigments non substitués en 5' (paeonidine, cyanidine) et les pigments substitués en 5' (malvidine, pétunidine); la delphinidine étant toujours à l'état de traces. L'obtention du phénotype rouge serait le résultat du déplacement de cet équilibre vers le groupe d'anthocyanidines non substituées en 5'; alors que le phénotype violet serait la conséquence du déplacement de cet équilibre vers le groupe d'anthocyanidines substituées en 5'.

Caractérisation biochimique des lignées parentales chez *H capitatum*

Trois lignées ont été analysées (tableau II): la lignée Sv, à fleurs violettes; les lignées Al025 et Al031, à fleurs rouge-violacées.

On constate que, pour les trois lignées utilisées, la classe des flavonols est représentée, comme c'est le cas pour *H coronarium*, par le kaempférol (quantité faible), la quercétine (abondante) et la myricétine (à l'état de traces).

La composition des pétales en flavonols est donc la même quel que soit le phénotype. La différence entre phénotypes est plutôt due à une

différence de composition quantitative en anthocyanidines :

- le phénotype violet se caractérise surtout par l'abondance de la malvidine; alors que les autres anthocyanidines, plus particulièrement la paeonidine et la cyanidine, sont nettement minoritaires;
- le phénotype rouge-violet correspond à une synthèse en quantités importantes et sensiblement égales de deux pigments anthocyaniques : la malvidine et la paeonidine. Les trois anthocyanidines identifiées à la delphinidine, à la pétunidine et à la cyanidine, sont là aussi minoritaires.

L'investigation des pigments floraux nous a ainsi permis de définir chimiquement les trois phénotypes de base, rencontrés chez les deux taxons : *H coronarium* et *H capitatum*. Tout en présentant la même composition qualitative en anthocyanidines, ces trois phénotypes se distinguent entre eux par la nature du (ou des) pigment(s) prépondérant(s). Le phénotype rouge se caractérise par l'abondance de la paeonidine, le rouge-violet par l'abondance simultanée de la paeonidine et de la malvidine, enfin le violet par la présence de la malvidine en quantité notable.

La distinction entre ces trois formes phénotypiques, notamment entre le violet et le rouge-violacé, a été confirmée par une analyse semi-quantitative densitométrique des différents pigments présents (tableau III).

Si l'on tient compte de la structure moléculaire des différentes anthocyanidines mises en évidence chez *Hedysarum* (fig 1), on constate que la différence structurale majeure entre la malvidine et la paeonidine réside essentiellement dans la présence ou l'absence d'un groupement méthoxyle en 5' au niveau du noyau benzénique latéral B.

Or, il est actuellement admis que la substitution en 5' des flavonoïdes est progressive (Braun, 1976; Kho, 1978; Jonsson *et al*, 1983;

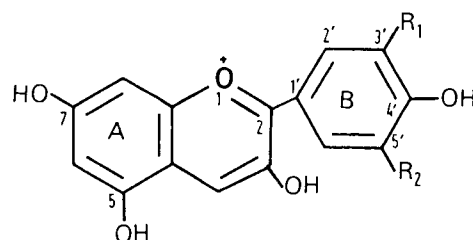


Fig 1. Anthocyanidines de *H coronarium* et *H capitatum*. Cyanidine ($R_1 = OH, R_2 = H$); Delphinidine ($R_1 = R_2 = OH$); Paeonidine ($R_1 = OCH_3, R_2 = H$); Pétunidine ($R_1 = OCH_3, R_2 = OH$); Malvidine ($R_1 = R_2 = OCH_3$).

Cornu et Maizonnier, 1984) : l'hydroxylation en 5' intervient au niveau des dihydroflavonols, alors que les méthylations se produisent en fin de biosynthèse des molécules anthocyaniques.

Par conséquent, l'accumulation de pigments méthoxylés (paeonidine et malvidine) et la présence de la pétunidine en quantités faibles, aussi bien dans le phénotype violet que dans les phénotypes rouge ou rouge-violet, indiquent que les gènes contrôlant la méthylation fonctionnent efficacement dans les lignées parentales utilisées dans cette étude.

Ainsi, la diversité de la coloration florale observée chez *Hedysarum* est liée à une expression différentielle de gènes d'hydroxylation en 5'. Le blocage de cette étape entraîne forcément celui de la méthylation en 5' des molécules anthocyaniques. Si l'hydroxylation en 5' est bloquée, la dihydroquercétine (= dihydroflavonol dihydroxylé) se convertit en cyanidine, puis, par méthylation en 3', en paeonidine. Si l'hydroxylation en 5' se réalise, la dihydroquercétine donne la dihydromyricétine (Kho, 1978). Ce flavonoïde trihydroxylé se convertit tout d'abord en delphinidine, puis, par méthylation en 3', en pétunidine. Par méthylation en 5', cette anthocyanidine se transforme en malvidine.

Tableau III. Détermination semi-quantitative des anthocyanidines dans quelques lignées d'*Hedysarum*.

Taxon	Lignée	Phénotype	Anthocyanidines en %				
			Dp	Pt	Mv	Cy	Pn
<i>H coronarium</i>	Mk	Violet	1,95	12,53	69,65	3,13	12,74
<i>H capitatum</i>	AI025	Rouge-violet	6,20	17,00	39,20	8,50	29,10
<i>H capitatum</i>	AI031	Rouge-violet	5,42	15,86	38,11	12,16	28,44

Résultats des croisements rouge-violet x violet chez *H capitatum*

Nous avons réalisé deux types de croisements Al031 x Sv et Al025 x Sv. Les hybrides F₁ issus de ces croisements sont homogènes et de phénotype violet; le pigment floral majeur étant la malvidine (tableau IV). Le caractère violet domine donc le caractère rouge-violet et l'abondance de la malvidine est due à un ou plusieurs gènes dominants.

En F₂, issue de l'autofécondation des individus F₁, les deux seuls phénotypes parentaux rouge-violet et violet sont observés. Les proportions relatives à chacune des deux formes phénotypiques sont assez semblables d'un type de croisement à l'autre.

Nous avons vérifié que, dans les différentes F₂ obtenues, les plantes de phénotype violet accumulent la malvidine, et celles de phénotype rouge-violet la malvidine et la paeonidine à la fois (tableau IV). Ceci prouve l'existence d'une corrélation très étroite entre la nature du pigment anthocyanique majeur et la coloration florale observée.

Résultats des croisements rouge x violet chez *H coronarium*

Quatre types de croisements rouge x violet ont été effectués (tableau V) dont trois ont servi également pour l'analyse biochimique des pigments floraux majeurs. Les résultats obtenus montrent que :

Tableau IV. Résultats des croisements violet x rouge-violet chez *H capitatum*.

Les résultats entre parenthèses indiquent le nombre de plantes dont la composition en anthocyanidines a été déterminée.

Croisement	Phénotype en F ₁		Ségrégation phénotypique en F ₂	
	Coloration	Pigment majeur	Violet ¹	Rouge-violacé ²
Al031 x Sv	Violet	Mv	69 (27)	24 (5)
Al025 x Sv	Violet	Mv	113 (41)	26 (10)

¹ malvidine (Mv) accumulée; ² malvidine et paeonidine accumulées

– la F₁ est homogène et de phénotype violet caractérisé par l'accumulation de la malvidine; la synthèse de cette anthocyanidine est donc contrôlée par un ou plusieurs gènes dominants;

– la F₂ comporte trois phénotypes distinguables sans aucune ambiguïté : rouge, violet, et rouge-violet, respectivement caractérisés par l'accumulation de la paeonidine, de la malvidine et des deux pigments à la fois.

Parallèlement à ces expériences d'hybridation, des croisements entre lignées de même phénotype ont été réalisés. Nous avons constaté que les croisements rouge x rouge ou violet x violet donnent lieu, en F₁ et en F₂, à des plantes à fleurs rouges ou violettes, respectivement.

DISCUSSION

Les principales caractéristiques des lignées utilisées dans cette analyse peuvent se résumer en deux alternatives : fleurs violettes / fleurs rouge-violacées, chez *H capitatum*; fleurs violettes / fleurs rouges, chez *H coronarium*.

L'observation des hybrides issus de croisements entre des lignées d'une même espèce montre que, dans chacune de ces alternatives, le caractère violet se transmettait comme un caractère dominant. Les nombreuses autofécondations des individus F₁ qui ont été effectuées nous permettront de préciser le déterminisme génétique des caractères fleurs violettes – fleurs rouge-violacées chez *H capitatum* et fleurs violettes – fleurs rouges chez *H coronarium*.

Tableau V. Résultats des croisements rouge x violet chez *H coronarium*.

Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de plantes dont la composition en anthocyanidines a été déterminée.

Croisement	Phénotype en F ₁	Ségrégation phénotypique en F ₂		
		Violet ¹	Rouge violacé ²	Rouge ³
Fad x Mk	Violet1	196(58)	48(9)	24(8)
Mk x Zt	Violet1	116	29	14
C x Mk	Violet1	168(73)	34(13)	13(6)
Tadj x C	Violet1	173(67)	47(21)	18(7)

¹ malvidine majeure; ² malvidine et paeonidine majeures; ³ paeonidine majeure

Hérédité de la coloration florale chez *H capitatum*

Chacune des F_2 , issues des croisements rouge-violet x violet effectués chez ce taxon, montre une ségrégation phénotypique qui ne s'écarte pas significativement de la disjonction 3/1 (tableau VI). Ceci suggère que la souche à fleurs violettes diffère de chacune des souches à fleurs rouge-violacées par un seul couple d'allèles. L'allèle sauvage, dominant, doit entraîner une synthèse accrue de la malvidine seulement et détermine alors le phénotype violet. Par contre, l'allèle mutant, récessif, correspondrait à un équilibre malvidine paeonidine, déterminant ainsi le phénotype récessif rouge-violet.

Étant donné que la F_1 issue du croisement Al 025 x Al031, montrait le phénotype rouge-violet (Baatout, communication personnelle), les mutations récessives impliquées seraient allèles.

En désignant par V/v , le couple d'allèles contrôlant l'hydroxylation en 5' des anthocyanidines chez *H capitatum*, il devient clair que :

- le phénotype violet est dû à la présence du gène V , responsable d'une hydroxylation quasi-totale en 5' de la dihydroquercétine qui se convertit alors en dihydromyricétine, d'où l'accumulation de la malvidine;
- le phénotype rouge-violacée est dû à la présence, à l'état homozygote, du gène v qui déterminerait une conversion partielle de la dihydroquercétine en dihydromyricétine. Ceci entraîne l'abondance simultanée de la paeonidine et de la malvidine.

Hérédité de la coloration florale chez *H coronarium*

L'observation des hybrides F_1 issus des croisements rouge x violet (tableau V) montre que le phénotype violet, accumulant la malvidine, est déterminé par un ou plusieurs gènes dominants. Par ailleurs, l'absence de complémentation entre les lignées à fleurs rouges montre qu'elles sont homozygotes récessives pour les mêmes gènes.

En plus des phénotypes parentaux (rouge et violet), les différentes F_2 , issues des croisements rouge x violet réalisés chez *H coronarium*, montrent le phénotype rouge-violacé. Ceci nous amène à envisager l'intervention de deux couples d'allèles que nous pouvons désigner par V/v et R/r . Dans ce cas, et étant donné que chacune de ces F_2 ne comprend que trois phénotypes seulement (tableau VI), les gènes V et R doivent présenter une interaction de nature épistatique. Il s'agit d'un cas d'épistasie dominante. En effet, les nombres observés dans ces F_2 peuvent être ajustés à la ségrégation théorique du type 12/3/1 (tableau VI).

En appelant V , le gène épistatique dominant et R , l'autre gène, les formules géniques seraient alors : ($V - R$ ou $V - rr$) déterminant le phénotype violet; ($vvR-$) déterminant le phénotype rouge-violacé; ($vv rr$) déterminant le phénotype rouge.

Étant donné que le croisement violet x violet fournit une F_2 sans ségrégation, les lignées à fleurs violettes doivent être homozygotes (VV).

Comme la F_2 issue des croisements rouge x violet renferme des individus à fleurs rouge-

Tableau VI. Résultats des différents croisements et leur ajustement aux ségrégations théoriques. V : violet, RV : rouge-violet, R = rouge.

Croisement	Ségrégation en F_2			Rapport théorique	Probabilité du χ^2			
	V	RV	R					
<i>H capitatum</i>								
Al025 x Sv	113	26	–	3 / 1	0,05	<	P	< 0,10
Al031 x Sv	69	24	–	3 / 1	0,75	<	P	< 0,90
<i>H coronarium</i>								
C x Mk	168	34	13	12 / 3 / 1	0,50	<	P	< 0,75
Mk x Zt	116	29	14	12 / 3 / 1	0,25	<	P	< 0,50
Tadj x C	173	47	18	12 / 3 / 1	0,50	<	P	< 0,75
Fad x Mk	196	48	24	12 / 3 / 1	0,10	<	P	< 0,25

violacées comportant, par conséquent, l'allèle R qui ne peut provenir que des lignées à fleurs violettes, nous pouvons admettre les génotypes parentaux suivants : (vv rr) : génotype des lignées parentales à fleurs rouges; (VV RR) : génotype des lignées parentales à fleurs violettes.

Remarquons que l'hypothèse faisant intervenir deux gènes V et R dans le contrôle de l'hydroxylation en 5' des anthocyanes chez *H coronarium*, peut également être formulée pour expliquer les résultats observés chez *H capitatum*. Dans ces conditions, on doit admettre les génotypes suivants : (VV RR) pour la souche Sv, à fleurs violettes; (vv RR) pour les souches à fleurs rouge-violacées, AI025 et AI031.

CONCLUSION

L'étude de l'hérédité des anthocyanes florales chez *H coronarium* et *H capitatum* nous a permis de montrer que les couleurs rouge, rouge-violacée et violette des fleurs dépendent essentiellement des concentrations relatives des deux pigments : la paeonidine et la malvidine. D'autre part, cette analyse a prouvé l'intervention de deux gènes V-v et R-r dans le contrôle génétique de la pigmentation florale chez ces deux taxons. En combinant les résultats génétiques et biochimiques obtenus, nous pouvons faire correspondre à chaque lignée son génotype, sa composition en anthocyanidines et enfin sa coloration florale (tableau VII).

Le gène V a une action sur la pigmentation des pétales en gouvernant la synthèse d'une

Tableau VII. Génotype, composition en anthocyanidines et phénotype des lignées utilisées dans l'étude de l'hérédité de la coloration florale chez *H coronarium* et *H capitatum*. Dp : delphinidine, Pt : pétunidine, Mv : malvidine, Cy : cyanidine, Pn : paeonidine.

Lignée	Génotype	Composition en anthocyanidines					Coloration florale
		Dp	Pt	Mv	Cy	Pn	
<i>H coronarium</i>							
C Fad Zt	vrr	tr	tr	1	1,5	5	rouge
Mk Tadj	VVRR	tr	1	5	tr	1	violet
<i>H capitatum</i>							
Sv	VVRR	tr	1	5	tr	1	violet
AI025, AI031	vvRR	0,5	1	4	0,5	3,5	rouge-violacé

grande quantité de malvidine. Ainsi, nous pouvons penser que ce gène, en contrôlant l'hydroxylation en 5' d'un flavonoïde précurseur, de la classe des dihydroflavonols (Harrison et Stickland, 1978; Kho, 1978), détermine la synthèse d'une anthocyanidine intermédiaire (= la pétunidine) qui se transforme en malvidine par méthylation en 5'. Étant donné que la pétunidine est invariablement détectée en faibles quantités en présence ou en absence de V, nous pouvons admettre que la formation de la malvidine est le résultat de l'activité d'un ou de plusieurs gènes supplémentaires favorisant la méthylation en 5' de la pétunidine.

Quant au gène R, responsable du phénotype rouge-violet, il ne s'exprime qu'en l'absence du gène V, en l'occurrence dans les plantes de génotype vv (tableau VII). Le gène R est donc hypostatique par rapport à V; son action se traduit, dans les plantes de génotype (vv), par une synthèse assez limitée de malvidine. On aboutit alors dans ce phénotype rouge-violet à un équilibre entre les productions de paeonidine (non hydroxylée en 5') et de malvidine (hydroxylée puis méthylée en 5'). La fonction du gène R est donc une fonction hydroxylante (en position 5') comme c'est le cas du gène V, mais moins importante. En présence de V, son activité n'est pratiquement pas décelable.

Ce gène V, par sa fonction hydroxylante en position 5', nous rappelle des situations analogues décrites chez plusieurs espèces, notamment les gènes R et V respectivement de *Salvia horminum* (Cornu et Paynot, 1969) et *Salvia splendens* (Hendrychova-Tomkova, 1964), le gène Hf1 et *Petunia hybrida* (Meynet et al, 1971; Wiering et al, 1979; Cornu et Maizonnier, 1984) et le gène L de *Campanula medium* (Braun, 1976). Par sa fonction, le gène R, identifié chez les taxons *H coronarium* et *H capitatum*, rappelle également le gène Hf2 de *Petunia hybrida* (Meynet et al, 1971; Wiering et al, 1979).

Bien que la fonction principale des gènes V et R soit une fonction d'hydroxylation en 5', les anthocyanidines majeures mises en évidence dans les lignées à fleurs colorées utilisées dans cette étude sont la paeonidine, méthylée en 3', et la malvidine, diméthylée en 3' et 5'. Ceci nous amène à admettre que les gènes contrôlant la méthylation, aussi bien en position 3' qu'en position 5', soient dominants. Le contrôle génétique de la méthylation des anthocyanes mérite donc d'être analysé chez *Hedysarum*, en se basant notamment sur des mutants de gènes de méthylation. Il est à signaler que, chez *H coronarium*,

des mutants à fleurs roses, accumulant la cyanidine, ont été repérés dans la population Fad (à fleurs rouges). En disposant actuellement de graines de ces mutants, il est possible d'étudier, entre autres, le contrôle génétique de la méthylation en 3' des anthocyanes chez cette espèce.

REMERCIEMENTS

A Cornu (INRA, Dijon) et M Marrakechi (Faculté des Sciences de Tunis) sont vivement remerciés pour leur fructueuse collaboration.

RÉFÉRENCES

- Baatout H, Marrakechi M, Mathieu C, Vedel F (1985) Variation of plastid and mitochondrial DNAs in the genus *Hedysarum*. *Theor Appl Genet* 70, 577-584
- Ballatore GP (1972) La produzione foraggera negli ambienti semiaridi, con particolare riferimento alla Sicilia. *Inf Agraria* 27, 7453-7464
- Braun A (1976) L'hérédité des anthocyanes florales. *Ann Biol* 15, 293-328
- Cenni B, Jannella GG, Colombani N (1968) Chemical composition, digestibility and nutritive value of Sulla (*Hedysarum coronarium* L) hay produced in Volterra district. *Ann Fac Med Vet Univ Pisa* 20, 155-168
- Chriki A, Harborne JB (1983) Anthocyanins of *Hedysarum coronarium* L and their contribution to flower colour variation. *Phytochemistry (Oxf)* 22, 2322-2323
- Chriki A, Combes D, Marrakechi M (1982) Hérodité et analyse chromatographique de la pigmentation des fleurs chez l'espèce *Hedysarum coronarium* L. *Agronomie* 2, 915-922
- Chriki A, Combes D, Marrakechi M (1984) Étude de la compétition pollinique chez le Sulla (*Hedysarum coronarium* L). *Agronomie* 4, 155-159
- Chriki A, Combes D, Marrakechi M (1986) Contrôle génétique de la conversion des dihydroflavonols en anthocyanes chez l'*Hedysarum coronarium* Desf. *CR Acad Sci* 16, 585-588
- Combes D, Espagnac H, Figier J (1975) Étude de populations naturelles d'*Hedysarum coronarium* L du Nord de la Tunisie. *Bull Soc Hist Nat Afr Nord* 66, 107-122
- Cornu A, Maizonnier D (1984) The genetics of *Petunia*. *Plant Breed Rev* 1, 11-58
- Cornu A, Paynot M (1969) Hérodité et analyse chromatographique de la pigmentation anthocyanique des fleurs et bractées de *Salvia horminum* L. *Ann Amélior Plant* 19, 5-13
- Farcy E, Cornu A (1979) Isolation and characterization of anthocyanin variants originating from the unstable system an2.1 in *Petunia hybrida* (Hort). *Theor Appl Genet* 55, 273-278
- Figier J, Espagnac H, Combes D, Francillon G (1978) Mise en évidence de types morphologiques dans les populations naturelles de l'*Hedysarum coronarium* L en Tunisie par analyse multivariable. *Rev Gén Bot* 85, 21-62
- Harborne JB (1973) *Phytochemical methods*. Chapman and Hall, London
- Harrison BJ, Stickland RG (1978) Precursors and the genetic control of pigmentation. IV. Hydroxylation and methoxylation stages in anthocyanidin synthesis. *Heredity* 40, 127-132
- Hendrychova-Tomkova J (1964) Genetic analysis of colour mutants in *Salvia splendens*. *Preslia (Prague)* 36, 217-225
- Jonsson LMV, de Vlaming P, Wiering H, Aarsman MEG, Schram AW (1983) Genetic control of anthocyanin-o-methyltransferase activity in flowers of *Petunia hybrida*. *Theor Appl Genet* 66, 349-355
- Kho KFF (1978) Conversion of hydroxylated and methylated dihydroflavonols into anthocyanins in a white flowering mutants of *Petunia hybrida*. *Phytochemistry (Oxf)* 17, 245-248
- Meynet J, Cornu A, Paynot M (1971) Analyse du fonctionnement des gènes majeurs impliqués dans la pigmentation florale du *Petunia*. *Ann Amélior Plant* 21, 103-116
- Monotti M (1975) Variabilità fenotipica tra ecotipi di Sulla (*Hedysarum coronarium* L). *Genet Agrar* 29, 163-178
- Nybor N (1964) Thin layer chromatographic analysis of anthocyanidins. *Physiol Plant* 17, 154-164
- Sarno R, Stringi L, Burgio G (1978) Relazioni intercorrenti tra alcuni caratteri biogranomici della Sulla (*Hedysarum coronarium* L). *Quad Agron* 9, 170-209
- Trifi-Farah N, Chatti WS, Marrakechi M, Pernès J (1989a) Déterminisme génétique de dix systèmes enzymatiques chez *Hedysarum coronarium* L. *Agronomie* 9, 503-510
- Trifi-Farah N, Chatti WS, Marrakechi M, Pernès J (1989b) Analyse de la variabilité morphologique et enzymatique des formes cultivées et spontanées d'*Hedysarum coronarium* L en Tunisie. *Agronomie* 9, 591-598
- Wiering H, de Vlaming P, Cornu A, Maizonnier D (1979) *Petunia* genetics. I. List of genes. *Ann Amélior Plant* 29, 611-622