

## Les terpènes du pin maritime : aspects biologiques et génétiques

### V. - Hérité de la teneur en limonène

A. MARPEAU-BEZARD, Ph. BARADAT \* et C. BERNARD-DAGAN

*Laboratoire de Physiologie cellulaire végétale de l'Université de Bordeaux I,  
avenue des Facultés, F 33405 Talence  
E.R.A. de C.N.R.S. N° 403*

*\* I.N.R.A., Laboratoire d'Amélioration des Arbres forestiers,  
F 33610 Pierroton-Cestas*

#### Résumé

Chez le pin maritime, la concentration en limonène dans les tissus corticaux est contrôlée par un gène majeur.

Les allèles de richesse et de pauvreté sont pratiquement codominants.

Le locus contrôlant la synthèse du limonène (L) est étroitement lié au locus M (myrcène) avec un taux de recombinaison de 0,12.

La liaison avec le locus C (3-carène) est plus lâche : le taux de recombinaison est de 0,20.

Compte tenu des résultats déjà acquis sur la liaison entre C et M on a pu établir une carte factorielle des 3 locus.

Une étude préliminaire de corrélation jeune-adulte montre que ces résultats, établis sur des familles de 7 ou 8 ans, sont transposables à des arbres plus âgés.

#### 1. Introduction

Le contrôle monogénique de la synthèse du  $\Delta_3$ -carène, du myrcène, du longifolène et du caryophyllène a été prouvé chez le pin maritime sur des échantillons de tissus extérieurs au bois (BARADAT *et al.*, 1972 et 1975 ; MARPEAU *et al.*, 1975). L'étude de l'hérité de la concentration en limonène, menée conjointement selon la même méthodologie, n'avait pu aboutir à des résultats suffisamment probants. Cependant la forme des histogrammes de la concentration en ce terpène pour des arbres échantillonnés sur l'ensemble de l'aire naturelle suggérait un déterminisme monogénique : les peuplements corses montrent notamment une distribution nettement trimodale.

Ce type de distribution avait été rencontré par ZAVARIN (1970) sur *Abies lasiocarpa*, par GANSEL & SQUILLACE (1977) sur *Pinus elliottii*. Chez *Pinus taeda*, SQUILLACE *et al.* (1980) ont pu montrer que l'aptitude à la synthèse du limonène est contrôlée par un seul gène assez étroitement lié avec le locus M (myrcène) : taux de recombinaison de 0,17.

Sur des descendances de 2<sup>e</sup> génération (*Mentha aquatica*, *Mentha citrata*), MURRAY & HEFENDEHL (1973) concluent à l'existence de 2 loci très liés qui déterminent le niveau de ce monoterpène, en empêchant sa conversion en cétone. Sur l'un d'eux, un gène dominant L<sub>m</sub> bloquerait la transformation du limonène en isopipériténone, sur l'autre locus, un gène c, récessif, empêcherait à l'état homozygote la transformation du limonène en carvone.

Dans le cas du pin maritime, l'étude de l'hérédité du limonène sur des familles issues de croisements contrôlés entre arbres de provenance landaise était rendue difficile par l'existence de chevauchements importants entre les pics que l'on pouvait attribuer aux hétérozygotes et aux deux homozygotes. Ces chevauchements peuvent sans doute être dus, pour une grande part, à des modifications incontrôlables des conditions analytiques (usure des colonnes, réponse du détecteur...) ainsi qu'à l'influence des autres terpènes dont le niveau peut être très différent d'une famille à l'autre.

La méthode exposée ci-dessous s'efforce de déterminer sans biais l'appartenance des individus à l'une des 3 classes génotypiques en situant au mieux le niveau du (ou des) points de troncature pour chaque famille. Il est à remarquer que les auteurs déjà cités ont rencontré des difficultés du même ordre pour l'interprétation de leurs résultats.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Prélèvement et analyse

Les prélèvements des tissus extérieurs au bois des pousses de un an ont été effectués sur des arbres issus de croisements contrôlés et âgés de 7 ans au moins. Prélèvement, préparation du matériel et analyse des extraits ont été conduits selon la méthode décrite antérieurement (MARPEAU *et al.*, 1975).

### 2.2. Matériel végétal

Nous avons étudié 17 familles de pleins-frères (comprenant de 9 à 65 individus) issues de 18 parents dont la liste est donnée dans le tableau 1. En regard de chaque clone sont portés sa teneur en limonène et son génotype pour la synthèse de ce terpène. La détermination de ce génotype a été vérifiée par l'étude de la ségrégation des descendants de ce clone.

Le tableau 2 présente les 6 combinaisons génotypiques possibles ; elles ont toutes été rencontrées. Les types (1), (3) et (6) qui correspondent à des familles composées d'un seul génotype ont servi à déterminer les points de troncature entre génotypes pour chaque famille suivant le modèle exposé ci-après.

TABLEAU 1

*Teneur en limonène dans les tissus extérieurs au bois et génotype des parents des 17 familles étudiées.*  
*Limonene concentration in cortical tissues and genotypes of parents of the 17 studied families.*

Clone	Teneur en limonène p. 100	Génotype	Clone	Teneur en limonène p. 100	Génotype
0001	1,12 p. 100	L <sup>-</sup> /L <sup>-</sup>	1301	9,69 p. 100	L <sup>+</sup> /L <sup>+</sup>
0003	1,36 p. 100	L <sup>-</sup> /L <sup>-</sup>	1305	1,00 p. 100	L <sup>-</sup> /L <sup>-</sup>
0005	1,36 p. 100	L <sup>-</sup> /L <sup>-</sup>	1307	1,18 p. 100	L <sup>+</sup> /L <sup>-</sup>
0007	7,26 p. 100	L <sup>+</sup> /L <sup>-</sup>	1308	25,79 p. 100	L <sup>+</sup> /L <sup>+</sup>
0011	14,27 p. 100	L <sup>+</sup> /L <sup>+</sup>	3115	18,90 p. 100	L <sup>+</sup> /L <sup>+</sup>
0014	7,15 p. 100	L <sup>+</sup> /L <sup>-</sup>	3808	8,87 p. 100	L <sup>+</sup> /L <sup>-</sup>
0146	0,96 p. 100	L <sup>-</sup> /L <sup>-</sup>	3812	2,11 p. 100	L <sup>+</sup> /L <sup>-</sup>
0147	1,59 p. 100	L <sup>-</sup> /L <sup>-</sup>	3816	24,90 p. 100	L <sup>+</sup> /L <sup>+</sup>
0235	5,54 p. 100	L <sup>+</sup> /L <sup>-</sup>	5307	1,28 p. 100	L <sup>+</sup> /L <sup>-</sup>

TABLEAU 2

*Types de croisements possibles. Proportions théoriques de génotypes au locus L.*  
*Kinds of possible crosses. Theoretical proportions of genotypes for L locus.*

	L <sup>-</sup> /L <sup>-</sup>	L <sup>+</sup> /L <sup>-</sup>	L <sup>+</sup> /L <sup>+</sup>
L <sup>-</sup> /L <sup>-</sup>	(1) L <sup>-</sup> /L <sup>-</sup>	(2) $\frac{1}{2}$ L <sup>+</sup> /L <sup>-</sup> $\frac{1}{2}$ L <sup>-</sup> /L <sup>-</sup>	(3) L <sup>+</sup> /L <sup>-</sup>
L <sup>+</sup> /L <sup>-</sup>	—	(4) $\frac{1}{4}$ L <sup>+</sup> /L <sup>+</sup> $\frac{1}{2}$ L <sup>+</sup> /L <sup>-</sup> $\frac{1}{4}$ L <sup>-</sup> /L <sup>-</sup>	(5) $\frac{1}{2}$ L <sup>+</sup> /L <sup>+</sup> $\frac{1}{2}$ L <sup>+</sup> /L <sup>-</sup>
L <sup>+</sup> /L <sup>+</sup>	—	—	(6) L <sup>+</sup> /L <sup>+</sup>

Les croisements de type (1), (3) et (6) ont servi à estimer les moyennes et les écarts-types des 3 génotypes, L<sup>-</sup>/L<sup>-</sup>, L<sup>+</sup>/L<sup>-</sup> et L<sup>+</sup>/L<sup>+</sup> pour la concentration en limonène.

Type (1) :  $\hat{\mu}_1 = 1,45$ ,  $\hat{\sigma}_1 = 0,85$  (2 familles, 32 individus).

Type (3) :  $\hat{\mu}_2 = 7,71$ ,  $\hat{\sigma}_2 = 3,01$  (2 familles, 104 individus).

Type (6) :  $\hat{\mu}_3 = 17,55$ ,  $\hat{\sigma}_3 = 4,50$  (1 famille, 64 individus).

### 2.3. Détermination des points de troncature entre génotypes pour chaque famille

Les développements qui suivent supposent que les distributions des concentrations des génotypes  $L^-/L^-$ ,  $L^+/L^-$  et  $L^+/L^+$  sont normales, du moins approximativement.

La figure 1 représente les histogrammes de ces distributions avec, en superposition, le tracé des distributions normales de même moyenne et de même variance. Pour disposer d'effectifs suffisants nous avons utilisé l'ensemble des familles analysées, après détermination des points de troncature entre génotypes.

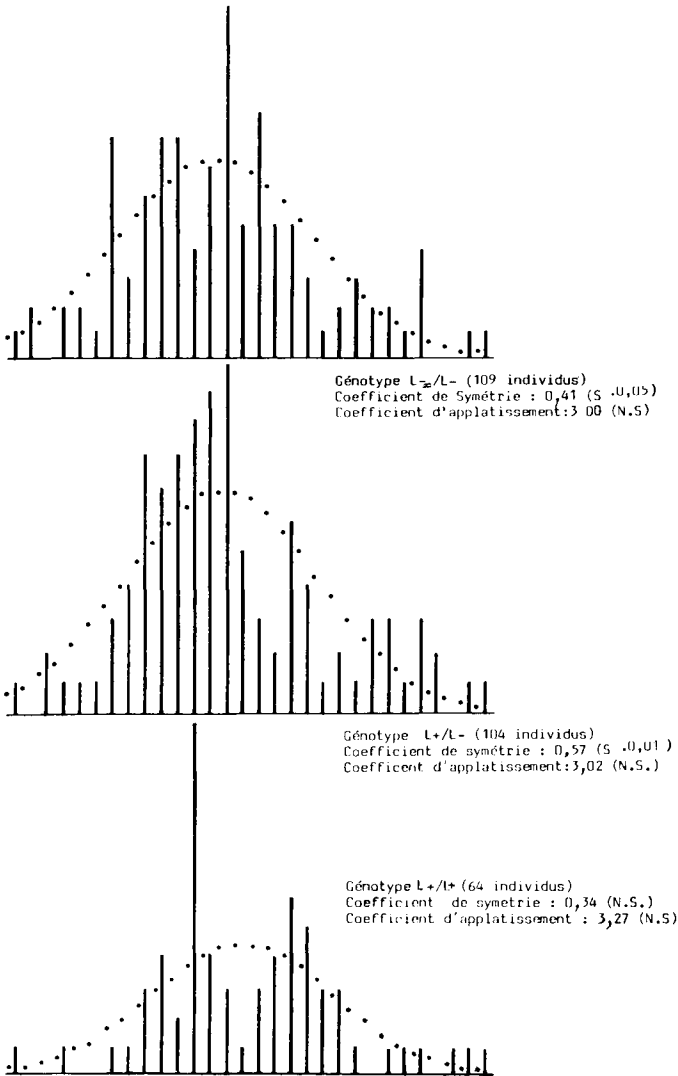


FIG. 1

*Histogrammes de concentrations en limonène des 3 génotypes  $L^-/L^-$ ,  $L^+/L^-$  et  $L^+/L^+$ .  
Histograms of limonene concentrations of the genotypes  $L^-/L^-$ ,  $L^+/L^-$  and  $L^+/L^+$ .*

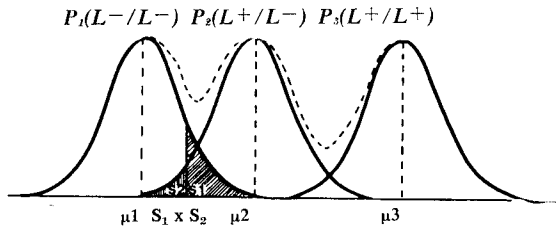


FIG. 2

*Distribution théorique d'un mélange en proportions égales des 3 génotypes L-/L-, L+/L-, L+/L+ : les variances des 3 génotypes sont supposées égales.*

*Theoretical distribution of a mixture in equal proportions of the 3 genotypes L-/L-, L+/L-, L+/L+ : the variances of the 3 genotypes are supposed to be equal.*

Les pointillés indiquent la distribution observée qui résulte de la superposition de deux populations de génotypes.

Les coefficients d'aplatissement, très voisins de 3, sont tout à fait compatibles avec une distribution normale, il existe par contre une légère disymétrie dans la distribution des génotypes L-/L- et L+/L-. Bien que significatif, l'écart à la distribution normale n'est toutefois pas très important.

La figure 2 schématise la distribution phénotypique d'un mélange de 3 génotypes (que nous appellerons P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> et P<sub>3</sub>) en proportions égales. Si l'on considère un individu de phénotype X tel que  $\mu_1 < X < \mu_2$ , les probabilités d'erreur de type 1 si l'individu x provient effectivement de P<sub>1</sub> ou s'il provient de P<sub>2</sub> sont mesurées respectivement par S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub>, surfaces des distributions normales réduites de P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub> « à l'extérieur » de l'abscisse X :

$$S_1 = \int_{Z_1}^{\infty} \frac{e^{-Z^2/2}}{\sqrt{2\pi}} dZ \text{ avec } Z_1 = \frac{X - \mu_1}{\sigma_1}$$

$$S_2 = \int_{-\infty}^{Z_2} \frac{e^{-Z^2/2}}{\sqrt{2\pi}} dZ \text{ avec } Z_2 = \frac{X - \mu_2}{\sigma_2}$$

Si l'on cherche le point C<sub>1</sub> tel que S<sub>1</sub> = S<sub>2</sub> il est immédiat que :

$$\frac{C_1 - \mu_1}{\sigma_1} = \frac{\mu_2 - C_1}{\sigma_2},$$

ce qui donne :

$$(1) \quad C_1 = \frac{\sigma_2 \mu_1 + \sigma_1 \mu_2}{\sigma_1 + \sigma_2}$$

Le choix de  $C_1$  comme point de troncature rend donc égales les probabilités d'erreur de type 1 (mauvaise classification d'un individu appartenant à  $P_1$  ou d'un individu appartenant à  $P_2$ ).

Un raisonnement identique permettrait de définir le point de troncature entre  $P_2$  et  $P_3$ .

Dans le cas de 3 génotypes en proportions différentes, l'égalité des probabilités d'erreur de type 1 pour  $P_1$  et  $P_2$  donne en vertu du principe des probabilités composées :

$$\alpha_1 S_1 = \alpha_2 S_2$$

Toutefois, la détermination rigoureuse des points de troncature dans cette situation serait extrêmement fastidieuse (cf. annexe). Il est plus réaliste dans notre situation de calculer  $C_1$  sous l'hypothèse  $\alpha_1 = \alpha_2$ , d'évaluer le biais introduit par ce mode de calcul si  $\alpha_2 = 2 \alpha_1$  (croisement entre 2 hétérozygotes) et de montrer qu'il est négligeable.

Définissons ce biais comme la différence de fréquence des individus de  $P_1$  attribués à  $P_2$  ( $B_1$ ) et de  $P_2$  attribués à  $P_1$  ( $B_2$ ). On a, en désignant par  $S$  la valeur commune à  $S_1$  et  $S_2$  :

$$(2) \quad B_1 = - B_2 = S (\alpha_1 - \alpha_2)$$

Par ailleurs,  $S$  correspond à un écart réduit de  $C_1$  par rapport à  $\mu_1$  :

$$(3) \quad E_1 = \frac{C_1 - \mu_1}{\sigma_1} = \frac{\mu_2 - \mu_1}{\sigma_1 + \sigma_2}$$

et, naturellement, l'écart réduit de  $C_1$  par rapport à  $\mu_2$  est :

$$E_2 = - E_1$$

A partir de (3), une table des aires de la distribution normale réduite donne la valeur de  $S$  que l'on reporte dans la formule (2). La détermination du biais entre  $P_2$  et  $P_3$  est bien entendu symétrique de celle qui vient d'être exposée.

Dans le cadre de ce travail, le biais moyen vaut 0,018 : c'est la fréquence dont seraient en moyenne majorées les classes d'homozygotes  $L^-/L^-$  et  $L^+/L^+$  issus du croisement entre 2 génotypes  $L^+/L^-$ , soit une erreur relative de 7,2 p. 100 par rapport à la valeur attendue de 0,25. Compte tenu des effectifs utilisés, ce biais est sans conséquences pratiques ; il vaut moins de la moitié de l'erreur standard d'échantillonnage sur l'estimation de la fréquence globale des génotypes  $L^-/L^-$  et  $L^+/L^+$  dans ce type de croisement.

$C_1$  et  $C_2$  peuvent donc être théoriquement déterminés en connaissant les moyennes et les écarts-types des 3 génotypes. Ces derniers paramètres sont donnés en bas du tableau 3.

Toutefois, les points de troncature, tels qu'ils viennent d'être définis, intègrent un « effet moyen » propre aux échantillons utilisés et indépendant du génotype au locus  $L$ . Cet effet moyen dépend partiellement de la préparation de la colonne de

chromatographie et du génotype des individus utilisés pour des locus autres que L (par le jeu des corrélations entre terpènes).

Si l'on suppose — ce qui semble raisonnable — que cet effet moyen est multiplicatif, il faut introduire un facteur de correction Co :

$$Co = \frac{m}{m_0}, \text{ m étant la moyenne observée de la famille pour laquelle on veut}$$

déterminer le point de troncature et  $m_0$  sa « moyenne théorique », c'est-à-dire la moyenne qu'elle aurait si, pour chacune des 2 ou 3 catégories génotypiques qu'elle comporte, les individus provenaient par tirage au hasard du lot témoin correspondant. On peut, pour chaque type de croisement, estimer  $m_0$  (cf. tabl. 3).

TABLEAU 3

*Seuils de troncature bruts ( $C_1$  et  $C_2$ ) et « moyennes théoriques » ( $m_0$ ) des 3 types de croisements donnant une ségrégation au locus L.*

*Rough truncature points ( $C_1$  and  $C_2$ ) and « theoretical means » ( $m_0$ ) of the 3 kinds of crosses which give a segregation for L locus.*

Croisements	Paramètres	
	Seuils de troncature bruts	Moyennes théoriques
L+/L- × L-/L-	$C_1 = 2,88$	$m_0 = \frac{\hat{\mu}_1 + \hat{\mu}_2}{2} = 4,58$
L+/L+ × L+/L-	$C_2 = 11,90$	$m_0 = \frac{\hat{\mu}_2 + \hat{\mu}_3}{2} = 12,63$
L+/L- × L+/L-	$C_1 = 2,88$ $C_2 = 11,90$	$m_0 = \frac{\hat{\mu}_1 + 2\hat{\mu}_2 + \hat{\mu}_3}{4} = 8,61$

$C_1$  et  $C_2$  sont respectivement les points de troncature entre les génotypes L-/L- et L+/L- d'une part, L+/L- et L+/L+ d'autre part.

$\hat{\mu}_1$ ,  $\hat{\mu}_2$  et  $\hat{\mu}_3$  sont les estimations des concentrations moyennes des génotypes L-/L-, L+/L- et L+/L+ sur les familles témoins.

Les seuils de troncature corrigés seront donc :

$$C'_1 = Co C_1$$

$$C'_2 = Co C_2$$

TABLEAU 4

*Estimation des paramètres génétiques pour la concentration en limonène à partir des analyses de variance des clones, de familles de demi-frères et de la régression descendants/clones.*

*Estimation of genetic parameters for limonene concentration from analysis of variance of clones, progenies and regression of progenies on clones.*

Variance, covariance ou carré moyen calculés	Signification génétique	Valeur	Estimation des paramètres génétiques
(a) Variance phénotypique (200 clones, 1 greffe/clone) .....	$V_{A2} + V_{D2} + V_E$	36,27	$V_{A2} = 23,24$ $V_{D2} = 12,08$
(b) Variance intra-clone (18 clones, 48 greffes) ....	$V_E$	0,95	$V_E = 0,95$
(c) Carré moyen calculé sur les moyennes de 32 familles, 10 individus par famille) .....	$0,321 V_{A1} + 0,096 V_{D1} + 0,100 V_E$	8,39	$V_{A1} = 22,30$
(d) Variance intra-famille. (16 familles, 10 individus par famille) .....	$0,71 V_{A1} + 0,96 V_{D1} + V_E$	28,16	$V_{D1} = 11,85$
(e) Covariance entre mères et moyennes de familles	$1/2 \text{Cov}(A_1, A_2)$	11,02	$\text{Cov}(A_1, A_2) = 22,04$

$V_{A1}$  = Variance génétique additive du caractère « jeune ».

$V_{D1}$  = Variance de dominance du caractère « jeune ».

$V_E$  = Variance « environnement ».

$V_{A2}$  = Variance génétique additive du caractère « adulte ».

$V_{D2}$  = Variance de dominance du caractère « adulte ».

$$r_a = \frac{\text{Cov}(A_1, A_2)}{\sqrt{V_{A1} \cdot V_{A2}}} = 0,97.$$

$$h_1^2 = \frac{V_{A1}}{V_{A1} + V_{D1} + V_E} = 0,66.$$

$$h_2^2 = \frac{V_{A2}}{V_{A2} + V_{D2} + V_E} = 0,64.$$

$$\text{CGP}(1, 2) = \frac{\text{Cov}(A_1, A_2)}{\sqrt{(V_{A1} + V_{D1} + V_E)(V_{A2} + V_{D2} + V_E)}} = 0,62.$$

$r_a$  = Coefficient de corrélation génétique jeune-adulte.

$h_1^2$  = Héritabilité « juvénile ».

$h_2^2$  = Héritabilité « adulte ».

CGP(1, 2) = Coefficient de prédiction génétique jeune-adulte.



### 3. Résultats

Avant de donner les résultats de l'étude du mécanisme de la transmission héréditaire de l'aptitude à la synthèse du limonène, nous montrerons que les plants utilisés dans ce travail exprimaient pleinement leur génotype au locus L.

#### 3.1. Estimation de l'héritabilité et de la corrélation génétique jeune-adulte de la concentration en limonène

De la même façon que nous l'avons fait dans le cas du myrcène (BARADAT *et al.*, 1975) nous avons déterminé les composantes de la variance phénotypique au stade jeune (32 familles de demi-frères polycross âgées de 7 ans) et au stade adulte (200 clones représentés chacun par une greffe d'au moins 8 ans). Nous nous sommes particulièrement intéressés à la détermination de la corrélation génétique additive jeune-adulte. La méthodologie suivie est exactement la même que dans l'article cité auquel nous renvoyons le lecteur.

La figure 3 donne la régression de la concentration moyenne des familles de demi-frères sur celle de leur mère. Le tableau 4 permet la détermination des paramètres génétiques à partir des analyses de variance des clones, des familles de demi-frères et de la régression descendants/clones. On constate que les héritabilités « juvénile » et « adulte » sont pratiquement égales. Le coefficient de prédiction génétique jeune-adulte (cf. BARADAT, 1976, pour la définition de ce paramètre) est également voisin de ces 2 valeurs. Le coefficient de corrélation génétique jeune-adulte vaut 0,97, valeur voisine de celle que nous avons décelée dans le cas du myrcène (0,96). Ceci montre qu'à l'âge de 7 ans le génotype pour l'aptitude à la synthèse du limonène s'exprime pleinement.

Les résultats qui suivent, établis à partir de plants âgés de 7 ans ou plus, sont donc parfaitement extrapolables à des pins maritimes adultes.

#### 3.2. Détermination des seuils de troncature bruts et des moyennes théoriques

Le tableau 4 donne pour les 3 types de croisements sur lesquels le test d'un contrôle monogénique est possible (types 2, 4 et 5 du tableau 2), les seuils de troncature bruts et les moyennes théoriques. Ces valeurs ont servi à établir les seuils de troncature corrigés. Ces seuils, qui figurent dans le tableau 5, ont permis de déterminer pour chaque famille l'effectif de chaque catégorie de génotypes.

#### 3.3. Test de l'hypothèse du contrôle monogénique

Nous avons regroupé dans le tableau 5 les résultats par type de croisement. Pour chaque groupe nous avons d'abord testé l'homogénéité des proportions des génotypes (test  $\chi^2$  d'hétérogénéité). Dans les 3 cas cette hypothèse est admissible. Nous avons ensuite testé la conformité des proportions observées avec les proportions théoriques : les valeurs des tests  $\chi^2$  de conformité sont compatibles avec un contrôle de type monogénique.

$$(Y - \bar{Y}) = 0,37(X - \bar{X}) \quad r = 0,70.$$

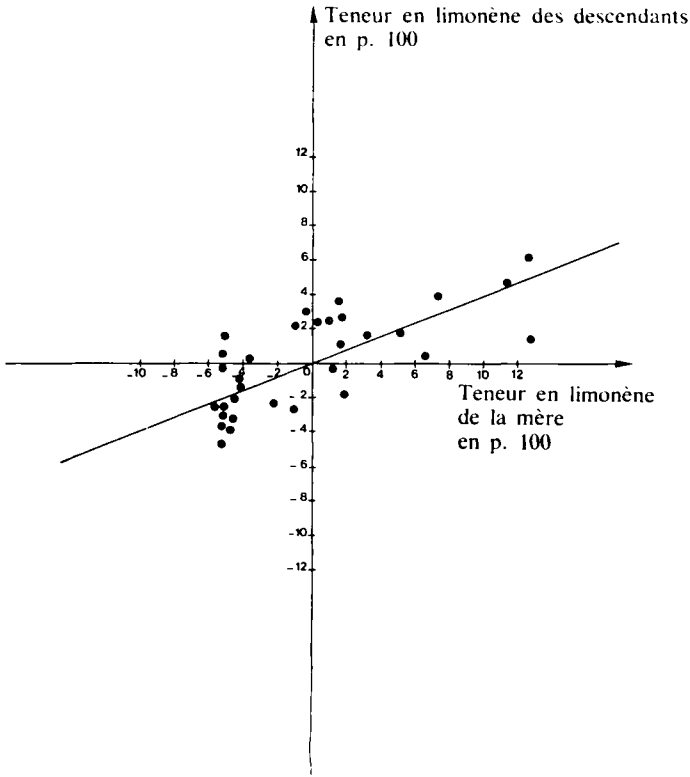


FIG. 3

*Régression de la concentration moyenne en limonène de familles demi-frères sur celle de leur mère (concentrations exprimées en p. 100 des monoterpènes).*

*Regression of mean limonene concentration of half sibs families on their mother's one (concentrations in p. 100 of monoterpènes).*

#### 3.4. Estimation de la dominance

Les valeurs moyennes des 3 génotypes  $L^-/L^-$ ,  $L^+/L^-$  et  $L^+/L^+$  ont été déterminées sur l'ensemble des 17 familles étudiées. L'effet additif moyen d'un allèle

a été estimé par :  $a = \frac{1}{2} ([L^+/L^+] - [L^-/L^-])$ . L'écart de dominance de l'hétéro-

zygote par :  $d = [L^+/L^-] - \frac{1}{2} ([L^+/L^+] + [L^-/L^-])$ .

TABLEAU 5

*Comparaison des fréquences théoriques et observées des génotypes pour les 3 types de croisements donnant une ségrégation au locus L.*

*Comparison of expected and observed frequencies of genotypes for the 3 kinds of crosses which give a segregation at L locus.*

L+/L- × L-/L- (2)	C' 1	C' 2	Nombres théoriques			Nombres observés		
			L-/L-	L+/L-	L+/L+	L-/L-	L+/L-	L+/L+
0146 × 5307	1,97	—	5	5	—	6	4	—
0014 × 0001	2,87	—	7,5	7,5	—	4	11	—
1305 × 1307	0,49	—	4,5	4,5	—	6	3	—
0003 × 3808	3,05	—	32,5	32,5	—	41	24	—
			49,5	49,5		57	42	

$\chi^2_{th}$  (3 D.L.) : 1,67 (P ≈ 0,65).

$\chi^2_c$  (1 D.L.) : 1,98 (P ≈ 0,15).

L+/L- × L+/L- (4)	C' 1	C' 2	Nombres théoriques			Nombres observés		
			L-/L-	L+/L-	L+/L+	L-/L-	L+/L-	L+/L+
0235 × 1307	2,18	9,03	16	32	16	15	31	18
1307 × 1307	1,73	7,16	12,5	25	12,5	12	26	12
0235 × 0235	2,01	8,33	5	10	5	4	12	4
5307 × 5307	1,32	5,48	5	10	5	3	14	3
			38,5	77	38,5	34	83	37

$\chi^2_{th}$  (3 D.L.)

L-/L- : 0,78 (P ≈ 0,85).

L+/L- : 3,21 (P ≈ 0,4).

L+/L+ : 1,67 (P ≈ 0,65).

$\chi^2_c$  (2 D.L.) : 1,30 (P ≈ 0,55).

L+/L+ × L+/L- (5)	C' 1	C' 2	Nombres théoriques			Nombres observés		
			L-/L-	L+/L-	L+/L+	L-/L-	L+/L-	L+/L+
0014 × 1308	—	16,73	—	32,5	32,5	—	32	33
1301 × 1307	—	7,12	—	12	12	—	14	10
3115 × 0007	—	15,30	—	16	16	—	16	16
3812 × 3816	—	12,09	—	11,5	11,5	—	10	13
				72	72		72	72

$\chi^2_{th}$  (3 D.L.) : 1,07 (P ≈ 0,8).

$\chi^2_c$  (1 D.L.) : 0.

$\chi^2_c$  = test  $\chi^2$  de conformité aux proportions théoriques des génotypes (1 : 1 ou 1 : 2 : 1).

C'1 et C'2 sont les seuils de troncature corrigés pour chaque famille entre les génotypes :

L-/L- et L+/L- (C'1).

L+/L- et L+/L+ (C'2).

$\chi^2_{th}$  = test  $\chi^2$  d'hétérogénéité.

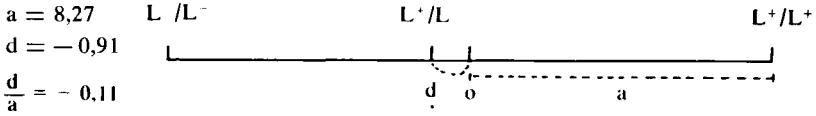


FIG. 4

Représentation de la valeur des 3 génotypes et des effets d'additivité (a) et de dominance (d).

Representation of the value of the 3 genotypes and of additive (a) and dominance (d) effects.

La figure 4 donne la représentation graphique conventionnelle de ces paramètres.

Comme pour le myrcène, le mode d'hérédité est presque complètement additif : le degré de dominance de l'allèle L<sup>-</sup> sur l'allèle L<sup>+</sup> n'est que de -0,10. Cette valeur est trop voisine de zéro pour pouvoir parler de dominance : les allèles L<sup>+</sup> et L<sup>-</sup> doivent être considérés comme codominants. Ce résultat est à première vue contradictoire avec les valeurs comparées de la variance additive et de la variance de dominance de la concentration en limonène présentées dans le tableau 3 : on a pratiquement

$$VD \simeq \frac{1}{2} VA, \text{ ce qui est loin d'être négligeable.}$$

En fait l'analyse de variance ne sépare pas les effets de dominance des effets d'épistasie ; ces derniers, dus aux corrélations entre terpènes, majorent la composante de dominance. Nous avons rencontré la même contradiction apparente dans le cadre de l'étude du mode d'hérédité du myrcène.

### 3.5. Etude du linkage entre le locus L (limonène) et les locus déjà mis en évidence pour le contrôle d'autres terpènes

Nous avons déjà montré (BARADAT *et al.*, 1975) que le locus C ( $\Delta_3$ -carène) et le locus M (myrcène) sont étroitement liés avec un taux de recombinaison de 0,10. Par ailleurs (MARPEAU *et al.*, 1975) nous avons aussi établi l'indépendance de la ségrégation entre les locus C ( $\Delta_3$ -carène) et ceux qui sont impliqués dans la synthèse des 2 sesquiterpènes à hérédité monogénique : Lo (longifolène) et Ca (caryophyllène).

Les combinaisons génotypiques analysées permettent de tester l'existence d'un linkage entre le locus L et le locus C, M et Lo et de calculer le taux de recombinaison dans les cas où la liaison existe.

#### 3.51. Relation entre les locus M et L

Dans le croisement 3115  $\times$  0007, la mère 3115 est de génotype  $\frac{M^- L^+}{M^- L^+}$ , le

père 0007 est double hétérozygote. Les 4 combinaisons géniques possibles sont données dans le tableau 6. On constate dans la descendance (32 individus) que les génotypes M<sup>-</sup>/M<sup>-</sup> tendent à être associés aux génotypes L<sup>+</sup>/L<sup>+</sup> ; symétriquement les géno-

types M<sup>+</sup>/M<sup>-</sup> sont associés aux génotypes L<sup>+</sup>/L<sup>-</sup> : tableau 7. En regard des effectifs observés (No) sont donnés les effectifs dans l'hypothèse de linkage total (N<sub>C1</sub>) ou d'indépendance (N<sub>C2</sub>). L'hypothèse d'indépendance doit être rejetée ( $\chi^2_3 = 18$ ). Ceci

conduit à attribuer au parent 0007 le génotype  $\frac{M^+ L^-}{M^- L^+}$ . Le tableau 7 donne les

proportions des 4 catégories de génotypes possibles en fonction du taux de recombinaison p entre M et L. La confrontation des tableaux 6 et 7 conduit à l'estimation :

$$\hat{p} = \frac{4}{32} = 0,125 \pm 0,05$$

TABLEAU 6

Tableau des gamètes de la famille 3115 × 0007 pour les locus M et L.  
Gametic array for family 3115 × 0007 for M and L locus.

♀	♂			
	$\frac{1-p}{2}$	$\frac{1-p}{2}$	p/2	p/2
M <sup>-</sup> L <sup>+</sup>	M <sup>+</sup> L <sup>-</sup>	M <sup>-</sup> L <sup>+</sup>	M <sup>+</sup> L <sup>+</sup>	M <sup>-</sup> L <sup>-</sup>
	[RM], L <sup>+</sup> /L <sup>-</sup>	[PM], L <sup>+</sup> /L <sup>+</sup>	[RM], L <sup>+</sup> /L <sup>+</sup>	[PM], L <sup>+</sup> /L <sup>-</sup>

TABLEAU 7

Comparaison des effectifs de génotypes observés dans la famille 3115 × 0007 (No) à leurs fréquences théoriques en cas de linkage total (N<sub>C1</sub>) ou d'indépendance (N<sub>C2</sub>) entre les locus M et L.

Comparison of observed numbers of genotypes in family 3115 × 0007 (No) with theoretical ones in the case of complete linkage (N<sub>C1</sub>) or independancy (N<sub>C2</sub>) between M and L locus.

	N <sub>C1</sub> (p = 0)	N <sub>C2</sub> (p = 1/2)	No
M <sup>+</sup> /M <sup>-</sup> , L <sup>+</sup> /L <sup>-</sup>	16	8	14
M <sup>-</sup> /M <sup>-</sup> , L <sup>+</sup> /L <sup>+</sup>	16	8	14
M <sup>+</sup> /M <sup>-</sup> , L <sup>+</sup> /L <sup>+</sup>	0	8	2
M <sup>-</sup> /M <sup>-</sup> , L <sup>+</sup> /L <sup>-</sup>	0	8	2

Test de l'hypothèse d'indépendance :

$$\chi^2_3 = 18 (p < 0,01).$$

$$\hat{p} = 4/32 = 0,125 \pm 0,05.$$

3.52. *Relations entre les locus C et L*

Les parents 0235 et 1307 sont doubles hétérozygotes. Ils sont représentés dans 3 familles différentes : 0235 × 0235, 0235 × 1307 et 1307 × 1307. La famille 0235 × 1307 ne comporte aucun individu double homozygote pour C<sup>-</sup> et L<sup>-</sup> sur

un effectif de 64. Ceci conduit à attribuer à ces 2 parents le génotype  $\frac{C+L-}{C-L+}$  : l'association des allèles + est en répulsion comme dans le cas précédent.

Nous pouvons donc regrouper les 3 familles (134 individus). Le tableau 8 donne les 16 combinaisons géniques possibles et permet le calcul des effectifs des 4 phénotypes pauvres (P) ou riches (R) en  $\Delta_3$ -carène et limonène que l'on doit attendre en fonction de la valeur de p. A partir de ce tableau on obtient les fréquences suivantes pour les 4 phénotypes :

$$\begin{aligned}
 (1) \quad [RC], [RL] &= \frac{2 + p^2}{4} \quad \left| \begin{array}{l} 1/2 \text{ si } p = 0 \\ 9/16 \text{ si } p = 1/2 \end{array} \right. \\
 (2) \quad [RC], [PL] &= \frac{1 - p^2}{4} \quad \left| \begin{array}{l} 1/4 \text{ si } p = 0 \\ 3/16 \text{ si } p = 1/2 \end{array} \right. \\
 (3) \quad [PC], [RL] &= \frac{1 - p^2}{4} \quad \left| \begin{array}{l} 1/4 \text{ si } p = 0 \\ 3/16 \text{ si } p = 1/2 \end{array} \right. \\
 (4) \quad [PC], [PL] &= \frac{p^2}{4} \quad \left| \begin{array}{l} 0 \text{ si } p = 0 \\ 1/16 \text{ si } p = 1/2 \end{array} \right.
 \end{aligned}$$

TABLEAU 8

*Tableau des gamètes des familles 0235 × 0235, 0235 × 1307 et 1307 × 1307 pour les locus C et L.*

*Gametic array of families 0235 × 0235, 0235 × 1307 and 1307 × 1307 for C and L locus.*

♀		♂			
		$\frac{1-p}{2}$ C+ L <sup>-</sup>	$\frac{1-p}{2}$ C- L <sup>+</sup>	p/2 C+ L <sup>+</sup>	p/2 C- L <sup>-</sup>
$\frac{1-p}{2}$ C+ L <sup>-</sup>	[RC], [PL]	[RC], [RL]	[RC], [RL]	[RC], [PL]	
$\frac{1-p}{2}$ C- L <sup>+</sup>	[RC], [RL]	[PC], [RL]	[RC], [RL]	[PC], [RL]	
p/2 C+ L <sup>+</sup>	[RC], [RL]	[RC], [RL]	[RC], [RL]	[RC], [RL]	
p/2 C- L <sup>-</sup>	[RC], [PL]	[PC], [RL]	[RC], [RL]	[PC], [PL]	

On peut regrouper (2) et (3) qui représentent des recombinaisons symétriques et l'on obtient alors les 3 catégories présentes dans le tableau 9. Le test de l'hypothèse d'indépendance donne une valeur de  $\chi^2_2$  très significative. Il est donc licite de calculer le taux de recombinaison par la méthode du maximum de vraisemblance (BARADAT *et al.*, 1975).

TABLEAU 9

*Comparaison des effectifs des phénotypes riches ou pauvres en  $\Delta_3$ -carène et limonène dans les familles 0235  $\times$  0235, 0235  $\times$  1307 et 1307  $\times$  1307 (No) à leurs fréquences théoriques en cas de linkage total ( $N_{Cl}$ ) ou d'indépendance ( $N_{Cz}$ ) entre les locus C et L.*

*Comparison of numbers of rich and poor phenotypes for 3-carene and limonene in families 0235  $\times$  0235, 0235  $\times$  1307 and 1307  $\times$  1307 (No) with theoretical ones in the case of complete linkage ( $N_{Cl}$ ) or independancy ( $N_{Cz}$ ) between C and L locus.*

	$N_{Cl} (p = 0)$	$N_{Cz} (p = 1/2)$	No
[RC], [RL]	67	75,375	74 ( $n_1$ )
[RC], [PL] & [PC], [RL]	67	50,25	59 ( $n_2$ )
[PC], [PL]	0	8,375	1 ( $n_3$ )

Test de l'indépendance :  $\chi^2_2 = 7,01 (P \approx 0,03)$ .

Le vecteur des observations des 3 combinaisons de phénotypes ( $n_1, n_2$  et  $n_3$ ) suit une distribution multinomiale et sa probabilité est donnée par :

$$\text{Prob} (n_1, n_2, n_3) = P^* = \frac{n!}{n_1! n_2! n_3!} \left( \frac{2 + p^2}{4} \right)^{n_1} \left( \frac{1 - p^2}{2} \right)^{n_2} \left( \frac{p^2}{4} \right)^{n_3}$$

où n désigne le nombre total d'observations =  $n_1 + n_2 + n_3$ .

L'équation du maximum de vraisemblance est :

$$\frac{d \ln (P^*)}{dp} = 2 p \left( \frac{n_1}{2 + p^2} - \frac{n_2}{1 - p^2} + \frac{n_3}{p^2} \right) = 0$$

On doit donc rechercher la solution de :

$$\frac{n_1}{2 + p^2} - \frac{n_2}{1 - p^2} + \frac{n_3}{p^2} = 0$$

avec la condition  $0 < p < 1/2$

soit  $-p^4 (n_1 + n_2 + n_3) + p^2 (n_1 - 2n_2 + n_3) + 2n_3 = 0$  et en remplaçant  $n_1, n_2, n_3$  par leurs valeurs :  
 $-134 p^4 - 43 p^2 + 2 = 0$   
 en posant  $u = p^2$  :

$$u = \frac{43 \pm \sqrt{1849 + 1072}}{-268}$$

soit en prenant la racine positive :  $u = 0,0412$  et  $\hat{p} = \sqrt{u} = 0,203 \# 0,20 \pm 0,03$ .

### 3.53. Relation entre le locus *L* et les locus des gènes contrôlant la synthèse des sesquiterpènes

Il n'a pas été possible de trouver des parents doubles hétérozygotes pour les locus *L* et *Ca* (caryophyllène). Par contre la relation entre les locus *L* et *Lo* (longifolène) peut être étudiée sur une famille : 0235  $\times$  1307 (64 individus). Ce croisement s'écrit :

$$0235 \frac{L^+}{L^-} \frac{Lo^-}{Lo^-} \times 1307 \frac{L^+}{L^-} \frac{Lo^+}{Lo^-}$$

Le tableau 10 donne les 8 combinaisons gamétiques possibles et les phénotypes correspondants. Les fréquences des 4 catégories de gamètes du parent 1307 sont données sous l'hypothèse d'indépendance que nous allons tester. Dans cette hypothèse les fréquences attendues des 4 phénotypes sont :

$$\begin{aligned} [RL] [RLo] &= 3/8 \\ [RL] [PLo] &= 3/8 \\ [PL] [RLo] &= 1/8 \\ [PL] [PLo] &= 1/8 \end{aligned}$$

TABLEAU 10

Tableau des gamètes de la famille 0235  $\times$  1307 pour les locus *L* et *Lo*.  
 Gametic array of family 0235  $\times$  1307 for *L* and *Lo* locus.

	$\frac{1}{4}$ L <sup>+</sup> Lo <sup>+</sup>	$\frac{1}{4}$ L <sup>+</sup> Lo <sup>-</sup>	$\frac{1}{4}$ L <sup>-</sup> Lo <sup>+</sup>	$\frac{1}{4}$ L <sup>-</sup> Lo <sup>-</sup>
$\frac{1}{2}$ L <sup>+</sup> Lo <sup>-</sup>	[RL], [RLo]	[RL], [PLo]	[RL], [RLo]	[RL], [PLo]
$\frac{1}{2}$ L <sup>-</sup> Lo <sup>-</sup>	[RL], [RLo]	[RL], [PLo]	[PL], [RLo]	[PL], [PLo]



Le tableau 11 donne les effectifs observés et les effectifs théoriques en cas de ségrégation indépendante. L'hypothèse d'indépendance est vérifiée : le test  $\chi^2_3$  correspond à une probabilité très élevée.

Ce résultat pouvait être logiquement attendu puisque nous avons montré que le locus C est lié au locus L et qu'il présente une ségrégation indépendante avec les locus Lo et Ca (MARPEAU *et al.*, 1975).

TABLEAU 11

*Comparaison des effectifs des phénotypes riches et pauvres en limonène et longifolène dans la famille 0235 × 1307*

*(No = fréquence observée, N<sub>c2</sub> = fréquence théorique dans l'hypothèse d'indépendance).*

*Comparison of numbers of rich and poor phenotypes for limonene and longifolene in family 0235 × 1307*

*(No = observed frequency, N<sub>c2</sub> = theoretical frequency in case of independancy).*

	N <sub>c2</sub>	No
[RL] [RLo]	24	26
[RL] [PLo]	24	23
[PL] [RLo]	8	7
[PL] [PLo]	8	8

Test de l'indépendance :  $\chi^2_3 = 0,333$  (P ≈ 0,95).

3.54. Carte factorielle des 3 locus liés entre eux

Les 3 valeurs des taux de recombinaisons entre les locus C, M et L nous permettent de définir l'ordre de leur succession sur le chromosome qui les porte. La figure 5 représente leur position probable et leurs distances (exprimées en taux de recombinaison).

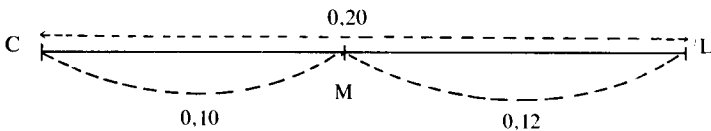


FIG. 5

*Positions probables et distances pour les 3 locus C, M et L.  
Likely positions and distances for the 3 locus C, M and L.*

Les erreurs d'échantillonnage dont sont affectées les estimations des taux de recombinaison suffisent à expliquer que la distance entre C et L ne soit pas exactement égale à la somme des distances C — M et M — L.

#### 4. Conclusions

L'aptitude à la synthèse du limonène chez le pin maritime est contrôlée par un gène majeur comme chez *Pinus elliotti* et *Pinus taeda*. Toutefois les relations de dominance entre allèles sont différentes pour le pin maritime et ces 2 espèces subtropicales pour lesquelles la dominance de l'allèle de richesse sur l'allèle de pauvreté est forte (0,90 pour *Pinus taeda*). Ces allèles sont pratiquement codominants chez le pin maritime.

Les relations de linkage trouvées entre les 3 monoterpènes dont nous avons pu étudier l'hérédité peuvent traduire l'appartenance à un même système de biosynthèse. A l'inverse toutes les relations que nous avons pu étudier entre monoterpènes et sesquiterpènes ont abouti à la conclusion d'une ségrégation indépendante. Ce fait est à rapprocher des résultats d'expériences d'incorporation de précurseurs radioactifs dans diverses conditions physiologiques qui tendent à prouver 2 sites de biosynthèse distincts pour ces 2 classes de composé, (BERNARD-DAGAN *et al.*, 1982).

*Reçu pour publication le 30 juin 1982.*

#### Summary

*Biology and genetics of terpenes in maritime pine.*

*V. — Heredity of limonene concentration*

In maritime pine, limonene concentration in cortical tissues is controlled in a monogenetic way.

Locus which controls limonene synthesis (L) is closely linked to M locus (myrcene) with a recombination rate of 0.12. Linkage with C locus (3-carene) is less narrow : the recombination rate is 0.20.

Taking in account the already results about linkage between C and M locus, it was possible to draw the factorial map of the 3 loci.

A preliminary study of juvenile-mature correlation shows that these results obtained on 7 or 8 years old progenies are still valuable for mature trees.

#### Zusammenfassung

*Biologie und Genetic von Terpenen in Pinus pinaster Ait.*

*V. — Erbllichkeit vom Gehalt in Limonen*

Bei *Pinus pinaster* ist der Gehalt in Limonen der kortikalen Geweben des Holzes von einem Hauptgen kontrolliert.

Die Allele, die für höhe und schwache Gehalte in Limonen verantwortlich sind, sind beide fast dominant.

Der Locus, der die Synthese des Limonens (L) kontrolliert, ist mit dem Locus M (Myrcen) eng verbunden : der Koeffizient der Verbindung ist 0.12. Die Verbindung mit dem Locus C (3-Karen) ist schwacher. Der Verbindungskoeffizient ist 0.20.

Mit den früheren Resultaten, die M und C betreffen, war es möglich eine factorielle Karte zu bilden.

Eine vorläufige Untersuchung der jung alt Korrelation zeigt, daß diese Resultate, die von 7 bis 8 Jahre alten Bäumen herkommen, auch für ältere Bäume gültig sind.

**Références bibliographiques**

BARADAT Ph., BERNARD-DAGAN C., FILLON C., MARPEAU A., PAULY G., 1972. Les terpènes du Pin maritime : aspects biologiques et génétiques. II. - Hérité de la teneur en monoterpènes. *Ann. Sci. for.*, **29** (3), 307-334.

BARADAT Ph., BERNARD-DAGAN C., PAULY G., 1975. Les terpènes du pin maritime : aspects biologiques et génétiques. III. - Hérité de la teneur en myrcène. *Ann. Sci. for.*, **31** (1), 29-54.

BARADAT Ph., 1976. Juvenile-mature relationships in individual selection, including information from relatives. Advanced generation breeding. *Proc. I.U.F.R.O. Joint Meeting*, Bordeaux, June 14-18, 121-137.

BERNARD-DAGAN C., PAULY G., MARPEAU A., GLEIZES M., CARDE J.P., BARADAT Ph., 1982. Control and compartmentation of terpene biosynthesis in leaves of *Pinus pinaster*. *Physiol. Vég.*, **20** (4), 775-795.

GANSEL Ch.R., SQUILLACE A.E., 1977. Geographic variation of monoterpenes in cortical oleoresin of slash pine. *Silvae Genet.*, **25** (5-6), 150-154.

MARPEAU A., BARADAT Ph., BERNARD-DAGAN C., 1975. Les terpènes du pin maritime : aspects biologiques et génétiques. IV. - Hérité de la teneur en deux sesquiterpènes : le longifolène et le caryophyllène. *Ann. Sci. for.*, **32** (4), 185-203.

MURRAY M.J., HEFENDEHL F.W., 1973. Changes in monoterpene composition of *Mentha aquatica* produced by gene substitution from high limonene strain of *M. citrata*. *Phytochemistry*, **12** (8), 1875-1880.

SQUILLACE A.E., WELLS O.O., ROCKWOOD D.L., 1980. Inheritance of monoterpene composition in cortical oleoresin of loblolly pine. *Silvae Genet.*, **29** (3-4), 141-152.

ZAVARIN E., SNAJBERK K., REICHERT T., TSIEN E., 1970. On the geographical variability of the monoterpenes from the cortical blister oleoresin of *Abies lasiocarpa*. *Phytochemistry*, **9** (2), 377-395.

**Annexe**

Après simplification, la condition  $\alpha_1 S1 = \alpha_2 S2$  peut s'écrire :

$$(1) \quad \alpha_1 \int_{z_1}^{\infty} e^{-Z^2} dZ = \alpha_2 \int_{-\infty}^{z_2} e^{-Z^2} dZ$$

Si l'on développe  $e^{-Z^2}$  en série de Mac. Laurin, on obtient :

$$(2) \quad e^{-Z^2} = 1 - Z^2 + \frac{z^4}{2!} - \frac{z^6}{3!} + \dots + (-1)^{i+1} \frac{z^{2(i-1)}}{(i-1)!}$$

où i est le numéro d'ordre du terme général de la série.

L'intégration terme à terme de l'expression (1) en utilisant la décomposition (2) donne :

$$(3) \quad \alpha_1 \sum_{i=1}^{\infty} (-1)^{i+1} \frac{Z_1^{2i-1}}{(2i-1)(i-1)!} = \alpha_2 \sum_{i=1}^{\infty} (-1)^{i+1} \frac{Z_2^{2i-1}}{(2i-1)(i-1)!}$$

comme par ailleurs  $Z_1$  et  $Z_2$  sont liés par la relation :

(4)  $\sigma_1 Z_1 - \sigma_2 Z_2 = \mu_2 - \mu_1$ , on peut exprimer  $Z_2$  en fonction de  $Z_1$ , soit :

$$(5) \quad Z_2 = \frac{\mu_1 - \mu_2 + \sigma_1 Z_1}{\sigma_2} = \frac{d + \sigma_1 Z_1}{\sigma_2},$$

en posant  $d = \mu_1 - \mu_2$ .

En reportant dans (3) cette expression de  $Z_2$  en fonction de  $Z_1$ , on obtient l'équation :

$$(6) \quad \sum_{i=1}^{\infty} \frac{(-1)^{i+1}}{(2i-1)(i-1)!} \left[ \alpha_1 Z_1^{2i-1} - \frac{\alpha_2}{\sigma_2^{2i-1}} (d + \sigma_1 Z_1)^{2i-1} \right] = 0$$

Pour calculer  $Z_1$  (et donc  $C_1$ ) avec une précision raisonnable, il faudrait résoudre l'équation (6) en retenant les 9 ou 10 premiers termes de la série, ce qui donne une équation du 17<sup>e</sup> ou du 19<sup>e</sup> degré en  $Z_1$ .