

Marie-Louise AVANA^{1, 2}
Zacharie TCHOUNDJEU²
Joseph Martin BELL³
Alexandre VAILLANT⁴
Marie-Hélène CHEVALLIER⁵

¹ Université de Dschang
Faculté d'agronomie et des sciences
agricoles
Département de foresterie
BP 222, Dschang
Cameroun

² World Agroforestry Centre
Irad/Icraf Programme
PO Box 2067
Yaoundé
Cameroun

³ Université de Yaoundé I
Faculté des sciences
Département de biologie
et physiologie végétale
PO Box 822
Yaoundé
Cameroun

⁴ Cirad-forêt
Campus international de Baillarguet
TA 10/C
34398 Montpellier Cedex 5
France

⁵ Cefe
1919, route de Mende
34293 Montpellier Cedex 5
France

Diversité génétique du *Prunus africana* (Hook. f.) Kalkman au Cameroun

D'une analyse comparée de la diversité génétique de quatre populations camerounaises menacées de *Prunus africana*, il ressort que les marqueurs microsatellites montrent les indices de diversité les plus élevés. Cet outil apparaît le plus adéquat pour mener des études moléculaires plus fines qui visent à définir des stratégies efficaces de conservation de cette espèce.



Individu surexploité de *Prunus africana* en forêt naturelle.
An overexploited Prunus africana in natural forest.
Photo R. Nkuinkeu.

Marie-Louise AVANA,
Zacharie TCHOUNDJEU,
Joseph Martin BELL,
Alexandre VAILLANT,
Marie-Hélène CHEVALLIER

RÉSUMÉ

DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DU *PRUNUS AFRICANA* (HOOK. F.) KALKMAN AU CAMEROUN

Une analyse comparée de la diversité génétique de quatre populations camerounaises de *Prunus africana* – à partir des marqueurs moléculaires RApd, Aflp et microsatellites – a été menée dans le laboratoire de génétique du Cirad-forêt de Montpellier. Il ressort de cette étude que les trois marqueurs moléculaires permettent de regrouper les populations étudiées en deux groupes principaux qui correspondent à deux des massifs constitutifs de la dorsale camerounaise. Ce sont les marqueurs microsatellites qui montrent les indices de diversité les plus élevés. Ces microsatellites développés sur le pêcher (*Prunus persica*) ont été adaptés à *P. africana* avec conservation du polymorphisme. Ces marqueurs apparaissent ainsi comme étant financièrement et techniquement les plus adéquats pour les études moléculaires plus fines qui visent à définir des stratégies efficaces de conservation de cette espèce menacée d'extinction.

Mots-clés : diversité génétique, *Prunus africana*, Cameroun.

ABSTRACT

GENETIC DIVERSITY IN *PRUNUS AFRICANA* (HOOK. F.) KALKMAN, CAMEROON

A comparative analysis of genetic diversity in four Cameroonian populations of the species *Prunus africana* – using RApd, Aflp and microsatellite molecular markers – was undertaken in the CIRAD-Forêt genetics laboratory in Montpellier. The study has shown that all three molecular markers divide the populations studied into two main groups corresponding to two of the forest stands making up the Cameroonian ridge. The microsatellite markers show the highest indexes of diversity. The microsatellites were developed for peach trees (*Prunus persica*) and adapted to *P. africana* to preserve their polymorphism. These markers thus appear to be the most appropriate, both technically and financially, for more detailed molecular studies aiming to define effective conservation strategies for the species, which is currently under threat of extinction.

Keywords: genetic diversity, *Prunus africana*, Cameroon.

RESUMEN

DIVERSIDAD GENÉTICA DE *PRUNUS AFRICANA* (HOOK. F.) KALKMAN EN CAMERÚN

Se efectuó un análisis comparado de la diversidad genética de cuatro poblaciones camerunesas de *Prunus africana* – a partir de marcadores moleculares RAPD, AFLP y microsatélites – en el laboratorio de genética del CIRAD-Forêt de Montpellier. De este estudio se desprende que los tres marcadores moleculares permiten agrupar a las poblaciones estudiadas en dos grupos principales que corresponden a dos de las formaciones constitutivas del dorsal camerunés. Los microsatélites son los marcadores que muestran los mayores índices de diversidad. Estos microsatélites desarrollados en melocotonero (*Prunus persica*) se adaptaron a *P. africana* con conservación del polimorfismo. Estos marcadores se muestran, financiera y técnicamente, como los más convenientes para estudios moleculares más detallados destinados a definir estrategias eficaces de conservación de esta especie amenazada de extinción.

Palabras clave: diversidad genética, *Prunus africana*, Camerún.

Introduction

Prunus africana est une rosacée arborescente des forêts africaines d'altitude supérieure à 1 000 m. L'intérêt de *P. africana* réside dans les vertus curatives de ses extraits d'écorce utilisés pour la fabrication de plus de 19 médicaments, vendus par 23 compagnies européennes et américaines pour le traitement de l'hypertrophie bénigne de la prostate (CUNNINGHAM *et al.*, 2002). La demande mondiale est estimée à plus de 4 000 tonnes par an pour une valeur des produits finis évaluée à 220 millions de dollars américains (CUNNINGHAM *et al.*, 2002). La principale source pour satisfaire cette forte demande est constituée des populations naturelles du Cameroun et de Madagascar, qui sont soumises à une exploitation destructive avec abatage des arbres et écorçage jusqu'aux plus petites branches (CUNNINGHAM, MBENKUM, 1993). Par conséquent, les ressources génétiques de *P. africana* dans ces deux pays sont sérieusement menacées d'érosion et il devient urgent de définir des stratégies de conservation de cette espèce.

Parmi les facteurs déterminants pour une stratégie de conservation, l'évaluation de la diversité génétique des différentes populations de l'espèce est un élément important, car elle permet, entre autres, de définir les échelles spatiales auxquelles les stratégies doivent être élaborées. La discontinuité de l'aire de distribution de *P. africana* amène à prévoir une divergence conséquente dans la base génétique des populations (DAWSON *et al.*, 2000). Les études préliminaires, effectuées à l'aide des marqueurs moléculaires Rapd (*Random amplified polymorphic Dna*), révèlent l'existence d'une grande variation génétique d'un pays à l'autre, et entre les populations à l'intérieur des pays, d'où la nécessité d'envisager des approches régionale et nationale de conservation (BARKER *et al.*, 1994 ; DAWSON, POWELL, 1999 ; DAWSON *et al.*, 2000).

L'utilisation des marqueurs Rapd pour l'évaluation de la diversité et de la structure génétiques des populations des arbres forestiers est parfois remise en question à cause des faibles taux de polymorphisme produits et de la faible reproductibilité de cette technique (GILLET, 1999). Ce manque de fiabilité peut être pallié par l'utilisation des marqueurs moléculaires hautement polymorphes, reproductibles et précis, tels que les Aflp (*Amplified fragment length polymorphism*) et les microsatellites (GILLET, 1999).

Le niveau élevé de polymorphisme révélé par ces marqueurs permet la caractérisation des arbres individuels à partir de l'analyse de quelques locus (GILLET, 1999) et l'indexation d'allèles « spécifiques » à une seule ou quelques populations. Ces allèles spécifiques permettent d'évaluer précisément des flux de gènes intra- et interpopulations.

Malgré ces avantages, l'utilisation des marqueurs Aflp et microsatellites est limitée par certains problèmes pratiques, liés en particulier au coût de leur mise en œuvre. En effet, pour les Aflp, le criblage des enzymes, des adaptateurs et des amorces peut être très coûteux. Les microsatellites, quant à eux, requièrent une première étape de construction, de criblage de banques et de séquençage pour définir les amorces spécifiques de l'espèce étudiée. Ces problèmes peuvent être contournés par une adaptation des amorces définies et utilisées avec succès sur des espèces voisines. En effet, les travaux de CIPRIANI *et al.* (1999) ont montré que plus de la moitié des microsatellites développés sur l'espèce *Prunus persica*, sous-genre *Amygdalus*, amplifient correctement avec les espèces des sous-genres *Prunofora* et *Cerasus* testées dans leur étude. Il devient donc nécessaire d'évaluer la transportabilité de ces marqueurs sur *Prunus africana*, qui appartient au sous-genre *Laurocerasus* (LEE, WEN, 2001).

L'objectif de cette étude est de tester l'utilisation des marqueurs Aflp et des microsatellites pour les études génétiques de quatre populations camerounaises de *P. africana*, d'une part en évaluant l'adaptation des microsatellites développés sur le pêcher sur *P. africana*, d'autre part en testant des couples d'amorces Aflp.

Une analyse comparée de la variabilité obtenue à l'aide de ces marqueurs, auxquels nous avons associé quelques amorces Rapd, permettra de discuter de l'utilisation des différents types de marqueurs pour des études plus fines visant à définir des stratégies fiables de conservation des ressources génétiques de *P. africana* à des échelles locale, nationale ou régionale. Les populations camerounaises utilisées servent comme test d'efficacité des différentes techniques, car certaines d'entre elles ont déjà été échantillonnées dans les études antérieures (BARKER *et al.*, 1994 ; DAWSON, POWELL, 1999).



Plantation agroforestière de *Prunus africana*.
Agroforest plantation of *Prunus africana*.
Photo E. Asaah.

Matériels et méthodes

Matériel végétal

Les feuilles ont été collectées sur 46 individus appartenant à trois populations naturelles et une plantation de *P. africana* au Cameroun : Mapanja (18 individus), Kilum (9 individus), Moliwe (4 individus) et provenance non identifiée (15 individus). La provenance non identifiée correspond à un lot d'individus qui ont perdu leurs étiquettes au cours de la collecte. Les populations échantillonnées appartiennent à deux massifs camerounais où l'espèce a le plus subi des pressions d'exploitation (CUNNINGHAM, MBENKUM, 1993). La figure 1 montre la disposition des sites de collecte sur la carte du Cameroun. Les feuilles sont séchées à l'étuve à 40 °C pour les trois populations naturelles, et au gel de silice pour la plantation de Moliwe.

Extraction d'Adn

L'Adn a été extrait à partir de 150 mg d'échantillon sec, selon la méthode développée pour le cacao (RISTERUCCI *et al.*, 2000), puis purifié sur colonne Qiagen Tip 20. Les solutions stocks d'Adn pur obtenues sont dosées sur gel d'agarose 1 %.

Les marqueurs RApd

Un criblage de seize amorces a été fait sur un jeu de cinq échantillons. Seules les amorces amplifiées de manière satisfaisante (intensité des bandes et polymorphisme) pour ces individus ont été sélectionnées, testées sur l'ensemble des échantillons, et révélées sur gels d'agarose colorés au bromure d'éthidium. Les relevés de présence (1) ou d'absence (o) de bandes ont été faits sur les photos des gels et consignés dans un tableau logique pour des analyses.



Figure 1.

Localisation des populations naturelles (Mapanja et Kilum) et de la plantation (Moliwe) étudiées parmi les sites de distribution naturelle de *Prunus africana*, au Cameroun.

Location of natural populations (Mapanja and Kilum) and the plantation (Moliwe) studied, among sites of natural *Prunus africana* distribution in Cameroon.

Les marqueurs Aflp

Les analyses Aflp ont été effectuées suivant le protocole décrit par Vos *et al.* (1995) sur gels de polyacrylamide dénaturant colorés au nitrate d'argent. Le protocole exigeant une importante quantité d'Adn pur par échantillon, seuls 22 extraits ont été analysés. Trois couples d'amorces Aflp ont été testés, soit E-ACA/M-CTT, E-AAG/M-CAA, E-AGC/M-CTC. Les relevés de présence (1) et d'absence (o) de bandes ont été faits directement sur les gels et consignés dans un tableau logique pour les analyses.

Les microsatellites ou Ssr (single sequence repeat)

Huit couples d'amorces microsatellites clonées et séquencées à partir de deux banques génomiques du pêcher, *Prunus persica* (CIPRIANI *et al.*, 1999), ont été utilisés. Une mise au point de la température d'hybridation a permis d'amplifier de manière satisfaisante six couples d'amorces parmi lesquels deux (UDP98-405 et UDP98-406) ont été analysés sur 38 échantillons en gels de séquence révélés au nitrate d'argent. Les différents allèles ont été codés en fonction de leur taille.

Analyse des données

Les données Rapt et Aflp ont été soumises à l'analyse des indices de dissimilarité de Sokal et Michener, qui prennent en compte le nombre de marqueurs (présence ou absence du marqueur considéré) communs à deux individus. Les distances génétiques de Nei ont été calculées pour les microsatellites avec le logiciel Populations. Les dendrogrammes ont été construits par la méthode des moyennes non pondérées de *Neighbour Joining (Unweighted Neighbour-Joining)* à l'aide du logiciel DARwin 3.6. Le taux de polymorphisme (PI), le nombre d'allèles par locus (na) et la diversité génétique de Nei (H) ont été calculés pour chaque marqueur moléculaire à l'aide du logiciel Popgen 32.

Résultats

En raison de problèmes techniques, tous les individus n'ont pas été analysés pour tous les marqueurs moléculaires. Quinze des seize amorces Rapt criblées ont amplifié de huit à plus de trente bandes. Huit amorces, parmi les plus polymorphes et les plus reproductibles, ont été retenues pour l'analyse de 40 individus. Au total, 34 bandes polymorphes ont été produites par ces huit amorces. Les trois couples d'amorces Aflp testés sur 22 individus ont produit un total de 190 fragments, parmi lesquels 110 locus polymorphes ont été pris en compte. Les deux amorces microsatellites analysées sur 38 individus ont mis en évidence quatre allèles pour le locus UDP98-405 et onze allèles pour le locus UDP98-406.

Les populations de Kilum et Mapanja montrent des indices de diversité très semblables quel que soit le marqueur considéré (tableau I). La population de Moliwe, avec quatre individus seulement, présente la diversité génétique la plus faible alors que la population non identifiée est la plus diversifiée. Les indices de diversité génétique de Nei pour l'ensemble des populations étudiées sont de 0,365, 0,276 et 0,643 pour les Rapt, Aflp et microsatellites respectivement.



Fruits (à gauche) et graines (à droite) de *Prunus africana*.
Fruits (left) and seeds (right) of *Prunus africana*.
Photo M.-L. Avana.

Tableau I.
Paramètres de diversité génétique des populations camerounaises estimés à l'aide des marqueurs Rapt, Aflp et microsatellites.

Marqueurs	Populations				
	Kilum	Non identifiée	Mapanja	Moliwe	Cameroun
Rapt					
Nombre d'individus	9	13	14	4	40
Taux de polymorphisme (%)	91,2	94,2	85,3	29,4	100
Nombre d'allèles	1,9	1,9	1,8	1,3	2
Diversité génétique de Nei	0,324	0,334	0,316	0,130	0,365
Aflp					
Nombre d'individus	3	7	9	3	22
Taux de polymorphisme (%)	59,1	81,8	64,5	35,5	100
Nombre d'allèles	1,6	1,8	1,7	1,4	2
Diversité génétique de Nei	0,227	0,269	0,217	0,153	0,276
Microsatellites					
Nombre d'individus	5	12	14	4	35
Taux de polymorphisme (%)	100	100	50	50	100
Nombre d'allèles	6	11	10	5	15
Diversité génétique de Nei	0,480	0,682	0,421	0,361	0,643

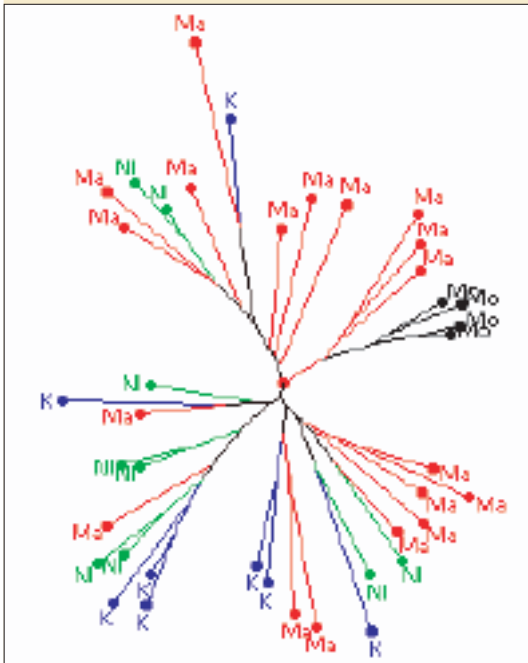


Figure 2.

Dendrogramme des distances de Sokal et Michener calculées à partir des Rapd (Ma : Mapanja ; K : Kilum ; NI : non identifiée ; Mo : Moliwe).
Dendrogramme of Sokal and Michener distances calculated from Rapd (Ma: Mapanja; K: Kilum; NI: non identified; Mo: Moliwe).

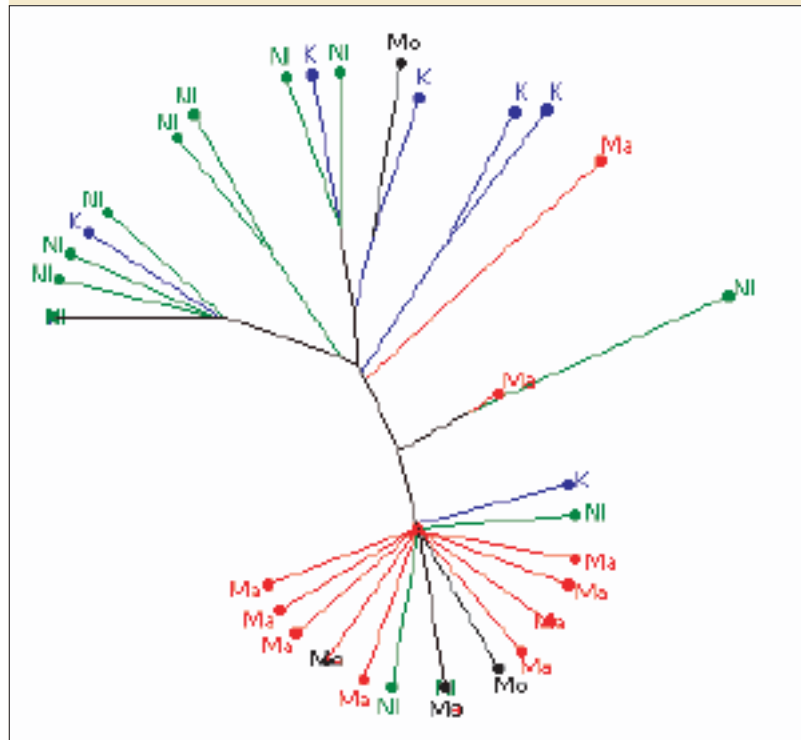


Figure 4.

Dendrogramme des distances de Nei calculées à partir des microsatellites (Ma : Mapanja ; K : Kilum ; NI : non identifiée ; Mo : Moliwe).
Dendrogramme of Nei distances calculated from microsatellites (Ma: Mapanja; K: Kilum; NI: non identified; Mo: Moliwe).

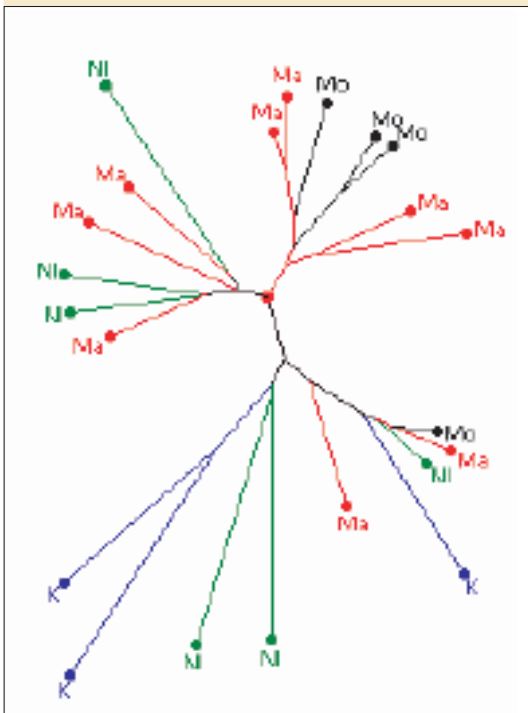


Figure 3.

Dendrogramme des distances de Sokal et Michener calculées à partir des Aflp (Ma : Mapanja ; K : Kilum ; NI : non identifiée ; Mo : Moliwe).
Dendrogramme of Sokal and Michener distances calculated from Aflp (Ma: Mapanja; K: Kilum; NI: non identified; Mo: Moliwe).

Discussion

Les dendrogrammes (figures 2 et 3) obtenus à partir des données Rapd et Aflp montrent une variabilité intrapopulation importante, où tous les individus présentent un génotype différent et une variabilité interpopulation structurée en trois groupes : le premier groupe est constitué en majorité par des individus de Mapanja et de Moliwe, le deuxième par des individus de Kilum et ceux de la provenance inconnue, le troisième groupe associe quelques individus de Mapanja et de la provenance non identifiée.

Le dendrogramme obtenu à partir des données microsatellites montre deux groupes assez hétérogènes : le premier formé des individus de Mapanja et de Moliwe, et le second rassemblant la population de Kilum et les individus de la population inconnue (figure 4). Ces résultats doivent être pris avec précaution étant donné le très faible nombre de locus étudiés.

Les analyses effectuées dans cette étude permettent de regrouper les populations testées en deux groupes principaux correspondant à deux des massifs constituant la dorsale camerounaise : le mont Cameroun et le mont Oku. Ce regroupement implique que la population dite inconnue a probablement été collectée au mont Oku. Cette différenciation génétique entre des populations par ailleurs géographiquement assez distantes a été déjà mise en évidence par DAWSON et POWELL (1999). Toutefois, l'hétérogénéité des groupes principaux et la formation d'un groupe intermédiaire pourraient s'expliquer par des flux de gènes d'origine ancienne entre ces deux massifs situés presque aux deux extrémités de la chaîne montagneuse traversant le Cameroun. Les massifs du mont Cameroun et du mont Oku sont séparés dans cette chaîne par le

mont Kupe, le mont Manengouba, les monts Bamboutos et le mont Lefo (figure 1). Un échantillonnage systématique des populations de *P. africana* distribuées sur cette chaîne de montagnes permettrait de mieux comprendre la structuration et les modalités de ces flux de gènes.

Le principal objectif de cette étude était d'évaluer la contribution des marqueurs Aflp et microsatellites, par comparaison aux marqueurs Rapd, à l'étude de la diversité génétique des populations de *P. africana*. Les taux de polymorphisme, les indices de diversité et les distances génétiques obtenus à partir de ces trois techniques montrent que chacune d'entre elles peut contribuer efficacement à l'étude de la diversité génétique des populations de *P. africana*. En effet, les indices de diversité obtenus dans cette étude sont largement supérieurs à ceux des études antérieures (DAWSON, POWELL, 1999). En ce qui concerne les Rapd, ce gain de diversité est vraisemblablement lié au choix des amorces, qui semblent nettement plus polymorphes dans notre étude.

Les indices de diversité et les distances génétiques sont plus élevés avec les analyses microsatellites, ce qui fait de cette technique un outil hautement attractif pour l'analyse génétique des populations (CIPRIANI *et al.*, 1999 ; WANG, SZMIDT, 2001). En plus d'être codominants et hautement polymorphes, les microsatellites ont l'avantage de produire un grand nombre d'allèles à faibles fréquences, spécifiques de quelques populations ou de quelques individus, ce qui contribue efficacement à l'évaluation des flux de gènes entre les individus et entre les populations (GILLET, 1999). Les principales difficultés liées à l'utilisation des microsatellites pour les études génétiques sont la création des banques génomiques et les limitations taxonomiques (GILLET, 1999). Le fait d'avoir réussi à adapter les microsatellites développés sur *P. persica* à *P. africana*, avec une conservation du polymorphisme (jusqu'à onze allèles pour

un des locus) malgré l'éloignement phylogénétique de ces deux espèces (LEE, WEN, 2001), permet de résoudre ces deux problèmes. Ce qui rend cette méthode financièrement et techniquement accessible pour les analyses génétiques plus fines chez cette espèce. Le développement d'une banque de microsatellites spécifiques de *P. africana* aurait nécessité environ deux mois du temps de travail d'un technicien spécialisé.

Les résultats de l'étude confirment ceux de NAKAJIMA *et al.* (1998) montrant que les marqueurs Aflp produisent quatre fois plus de bandes que les Rapd (34 bandes polymorphes Rapd contre 110 bandes Aflp). Les techniques Aflp doivent leur efficacité à une combinaison de la précision des Rflp (*Restriction fragments length polymorphism*) et de la puissance des Pcr (réactions de polymérisation en chaîne) (Vos *et al.*, 1995). Des trois couples d'amorces Aflp testés, E-AGC/M-CTC fournit un nombre de bandes polymorphes inférieur de moitié à celui des autres couples. Ce résultat confirme l'hypothèse selon laquelle le nombre de nucléotides GC dans les amorces est inversement lié au nombre de fragments amplifiés. En effet, le génome des plantes est riche en nucléotides AT, et l'utilisation des amorces pauvres en AT pourrait réduire la complexité des profils des bandes (QI, LINDHOUT, 1997). Ces connaissances de base sont indispensables pour le choix des amorces, car ce dernier affecte à la fois le nombre de bandes et le taux de polymorphisme. Dans cette étude, malgré le grand nombre de bandes polymorphes, la diversité génétique obtenue à partir des marqueurs Aflp est moins élevée que celle obtenue par les marqueurs Rapd, principalement en raison du grand nombre d'allèles en fréquences très fortes ou rares. Des criblages complémentaires de nouvelles amorces sont indispensables. De plus, il serait nécessaire d'améliorer la qualité et la quantité d'Adn par des techniques plus appropriées de collecte et de conditionnement des échantillons sur le terrain.



Quelques échantillons d'écorce de *Prunus africana*.
Samples of *Prunus africana* bark.
Photo M.-L. Avana.

Conclusion

Il ressort de cette étude que les marqueurs microsatellites constituent le meilleur outil, à la fois techniquement et financièrement, pour les études génétiques plus approfondies de *P. africana*. Le gain de polymorphisme obtenu par rapport aux marqueurs Rapd permettrait de délimiter, à l'intérieur des populations de l'espèce, des groupes homogènes sur lesquels des stratégies fiables de conservation pourraient s'appuyer. Compte tenu de l'importance de l'espèce et de son écosystème d'origine, il s'avère nécessaire d'entreprendre un échantillonnage systématique des populations camerounaises et malgaches, qui sont les plus menacées, et de mener les études génétiques plus fines. Une des stratégies de conservation, généralement recommandée, est la régénération *in situ* et la conservation *ex situ* de l'espèce. À cet effet, de nombreuses études menées au World Agroforestry Centre mettent un accent particulier sur les problèmes de germination des semences et de multiplication végétative par bouturage de cette importante espèce (TCHOUNDJEU *et al.*, 2002).

Références bibliographiques

BARKER N. P., CUNNINGHAM A. B., MORROW C., HARLEY E. H., 1994. A preliminary investigation into the use of RAPD to assess the genetic diversity of a threatened African tree species : *Prunus africana*. *Strelitzia*, 1 : 221-230.

CIPRIANI G., LOT G., HUANG W. G., MARRAZZO M. T., PETERLUNGER E., TESTOLIN R., 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch] : isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theoretical Applied Genetics*, 99 : 65-72.

CUNNINGHAM A. B., MBENKUM F. T., 1993. Sustainability of harvesting *Prunus africana* bark in Cameroon : A medicinal plant in international trade. *People and Plants Working Paper 2*, 28 p.

CUNNINGHAM A. B., AYUK E., FRANZEL S., DUGUMA B., ASANGA C., 2002. An economic evaluation of medicinal tree cultivation *Prunus africana* in Cameroon. *People and Plants Working Paper 10*, 35 p.

DAWSON I. K., POWELL W., 1999. Genetic variation in the Afromontane tree *Prunus africana*, an endangered medicinal species. *Molecular Ecology*, 8 : 151-156.

DAWSON I. K., WERE J., LENGKEEK A., 2000. Conservation of *Prunus africana*, an over exploited African medicinal tree. Rome, Italie, *Fao Forest Genetic Resources 28* : 31-37.

GILLET E. (éd.), 1999. Which DNA marker for which purpose ? Final compendium of the Research Project development, optimization and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme *Molecular tools for Biodiversity*. <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>.

LEE S., WEN J., 2001. A phylogenetic analysis of *Prunus* and the Amygdaloideae (Rosaceae) using ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany*, 88 (1) : 150-160.

NAKAJIMA Y., OEDA K., YAMAMOTO T., 1998. Characterization of genetic diversity of nuclear and mitochondrial genomes in *Daucus* varieties by RAPD and AFLP. *Plant Cell Reports*, 17 : 848-853.

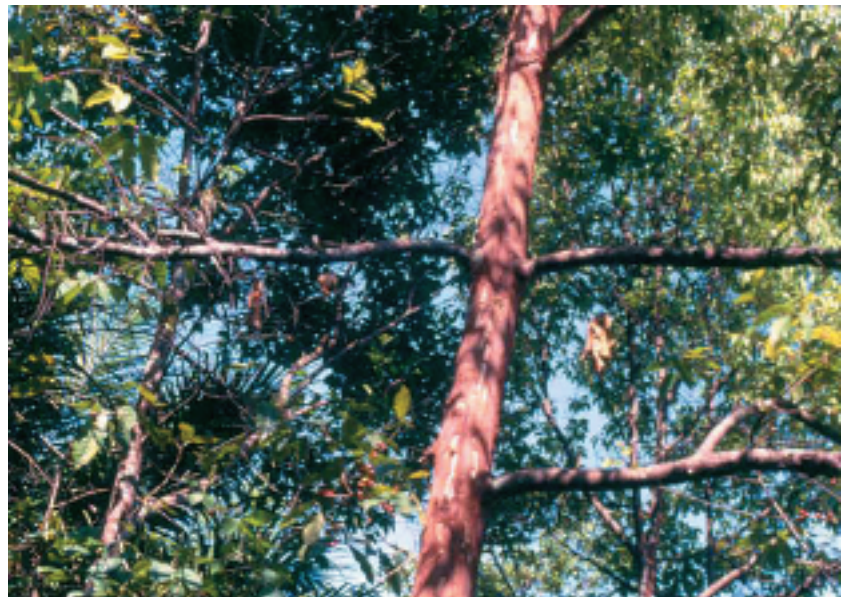
QI X., LINDHOUT P., 1997. Development of AFLP markers in barley. *Molecular Genetics and Genomics*, 254 (3) : 330-336.

RISTERUCCI A. M., GRIVET L., N'GORAN J. K. A., PIERETTI I., FLAMENT M. H., LANAUD C., 2000. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 101 : 948-955.

TCHOUNDJEU Z., AVANA M. L., LEAKEY R. R. B., SIMONS A. J., ASAAH E., DUGUMA B., BELL J. M., 2002. Vegetative propagation of *Prunus africana* : Effects of rooting medium, auxin concentration and leaf area. *Agroforestry Systems*, 54 : 183-192.

VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., HORNES M., FRITERS A., POT J., KUIPER M., ZABEAU M., 1995. AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23 : 4407-4414.

WANG X., SZMIDT A., 2001. Molecular markers in population genetics of forest trees. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 16 : 199-220.



Jeune arbre de *Prunus africana* ayant subi un écorçage du tronc et de ses branches. *A young Prunus africana with bark removed from the trunk and branches.*
Photo M.-L. Avana.

Synopsis

GENETIC DIVERSITY IN *PRUNUS AFRICANA* (HOOK. F.) KALKMAN, CAMEROON

Marie-Louise AVANA,
Zacharie TCHOUNDJEU,
Joseph Martin BELL,
Alexandre VAILLANT,
Marie-Hélène CHEVALLIER

The medicinal properties of *Prunus africana* bark have resulted in over-exploitation of natural populations of the species in Cameroon and Madagascar, to satisfy worldwide demand amounting to an estimated 4 000 t/year. Consequently, the gene pool of *P. africana* in the two countries is under serious threat and conservation strategies for the species urgently need to be defined. A study on the genetic diversity of four *P. africana* populations in Cameroon has therefore been undertaken, using highly polymorphic, reproducible and accurate molecular markers such as AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) and microsatellites. The main aim of the study is to assess the contribution to analyses of genetic diversity in *P. africana* of AFLP and microsatellite markers, in comparison to RAPD markers which are reputed to be less reliable.

Molecular markers can be used to quantify genetic diversity in natural populations

Each of the different markers used was able to make an effective contribution to assessments of genetic diversity in *P. africana* populations. The eight RAPD primers analysed in 40 individuals produced 34 polymorphic strips and a diversity index of Nei, $H=0.376$. The three paired AFLP primers tested in 22 individuals resulted in 110 polymorphic loci and $H=0.276$. Six of the eight paired microsatellite primers, cloned and sequenced from two *Prunus persica* (peach) genome banks showed satisfactory amplification in *P. africana*. The two paired primers (UDP98-405 and UDP98-406) analysed in 35 samples revealed four alleles for the locus UDP98-405, eleven alleles for the locus UDP98-406, and $H=0.643$.

Molecular markers can provide the structure of *P. africana* populations in Cameroon

The preliminary analyses carried out for this study showed that there were two main population groups corresponding to two of the forest stands along the Cameroon ridge: Mount Cameroon and Mount Oku. However, the heterogeneous character of the main groups and the appearance of an intermediate group showed that there is probably a flow of genes of very early origin between the two forest stands, which are located almost at either end of the mountain ranges down the length of Cameroon.

Microsatellite markers are the most useful tool for genetic analyses

The inherent characteristics of microsatellite markers – codominance, high polymorphism, a large number of alleles of low specific frequency in a few populations or individuals – make this the most appropriate molecular tool for analyses of *P. africana* and assessments of gene flows between individuals and populations. The adaptation of the microsatellites developed from *P. persica* to *P. africana*, preserving polymorphism (up to eleven alleles for one of the loci) despite the phylogenetic distance between the two species, provided a solution to the technical and financial problems involved in setting up a specific genome bank for *P. africana*. Using microsatellite markers in genetic studies of the most threatened populations in Cameroon and Madagascar can help to define effective conservation strategies for *P. africana*.