

Distribution et caractéristiques des écotypes français de trèfle souterrain

P. Masson¹, W.J. Collins², J. Gladstones²,
M. Meste³, G. Alquier⁴

La flore française est riche en espèces fourragères spontanées susceptibles de fournir une base pour la sélection. Parmi ces espèces, le trèfle souterrain n'est actuellement disponible que sous forme de variétés australiennes. L'analyse des populations françaises est donc intéressante en vue d'une création variétale à partir d'écotypes locaux, notamment pour les régions méridionales.

RÉSUMÉ

Sur 174 sites des régions méditerranéennes et atlantiques françaises, 599 écotypes de trèfle souterrain (*Trifolium subterraneum* L.) ont été collectés puis évalués en ligne pendant 2 ans à Perth (Australie). Leurs caractéristiques sont présentées, ainsi que celles de 16 autres écotypes collectés et évalués dans la région de Perpignan. La sous-espèce *brachycalycinum* n'a été rencontrée qu'en zone méditerranéenne. Les écotypes français de trèfle souterrain se caractérisent par un cycle long, une bonne vigueur, des teneurs en substances oestrogènes très variables, une dureté de semences faible, surtout pour les écotypes de la région atlantique. Certains écotypes, qui proviennent essentiellement du sud de la France (Corse, Sud-Est, Sud-Ouest) semblent intéressants d'un point de vue agronomique.

MOTS CLÉS

France, légumineuse, population naturelle, prospection génétique, ressources génétiques, trèfle souterrain, *Trifolium subterraneum*, variabilité génétique.

KEY-WORDS

France, genetic prospection, genetic resources, genetic variations, legume, natural population, subterranean clover, *Trifolium subterraneum*.

AUTEURS

- 1 : Laboratoire d'ingénierie agronomique, I.N.P. - E.N.S.A.T., 145, avenue de Muret, F-31076 Toulouse cedex (France).
- 2 : Western Australian Department of Agriculture, Perth (W. Australia).
- 3 : I.U.T. Perpignan, Département STID, Carcassonne (France).
- 4 : Laboratoire des Agro-Ressources Méditerranéennes, Université de Perpignan (France).

Le trèfle souterrain (*Trifolium subterraneum* L.) est une légumineuse annuelle méditerranéenne à cycle hivernal qui a la faculté de se ressemer seule en enterrant ses semences en fin de cycle. Les botanistes distinguent trois sous-espèces (KATZNELSON, 1974 ; ZOHARY et HELLER, 1984) :

- *Trifolium subterraneum* L., inféodé aux sols acides et légers, à calice couvert et pédoncule fructifère court et vigoureux,
- *Trifolium brachycalycinum* K. et M. qui se rencontre dans des sols plus lourds et plus alcalins, à calice non couvert et pédoncule fructifère long et mince,
- *Trifolium yanninicum* K. et M. résistant à l'hydromorphie du sol.

Bien qu'originaires du bassin méditerranéen et des côtes atlantiques de l'Europe et de l'Afrique du Nord (MORLEY et KATZNELSON, 1965), le trèfle souterrain est surtout cultivé en Australie où il occupe plus de 10 millions d'hectares. L'introduction du trèfle souterrain se serait faite vers 1830 par contamination de semences importées du Royaume-Uni et d'autres pays d'Europe (GLADSTONES et COLLINS, 1983).

Des populations françaises de trèfle souterrain peu connues

L'étude des populations de trèfle souterrain n'a pratiquement pas été abordée en France continentale. Les travaux concernent essentiellement la Corse (GENSOLLEN, 1988 ; PROSPERI *et al.*, 1989 ; VOLAIRE *et al.*, 1992). Les pays méditerranéens voisins ont étudié récemment certaines de leurs populations de trèfle souterrain. Nous pouvons citer, en Italie, PIANO (1984), TALAMUCCI et PARDINI (1987), au Portugal, CRESPO (1975), en Espagne, ANGULO et SANCHEZ DE RIVERA (1975), au Maroc, MATTHÄUS (1992) et en Tunisie, JARITZ (1982). Ces études ont montré l'importance et la richesse des populations de trèfle souterrain dans les régions méditerranéennes.

L'objectif de cet article est de préciser la distribution et les caractéristiques biologiques des trèfles souterrains français à partir des collectes de J. GLADSTONES en 1978 (599 écotypes) et de P. MASSON dans les Pyrénées-Orientales en 1985 (16 écotypes).

Matériel et méthodes

1. Plus de 600 écotypes collectés sur les littoraux méditerranéen et atlantique

■ Collecte de GLADSTONES

La collecte française du Département d'Agriculture de l'Australie Occidentale a été effectuée par J. GLADSTONES du 14 juin au 18 juillet 1978 **entre Ajaccio et Brest** en parcourant la Corse, le sud-

est méditerranéen (Var, Pyrénées-Orientales), le sud-ouest atlantique (Landes essentiellement), la Vendée et la Bretagne. Il n'y avait pas de quadrillage systématique mais une prospection dans les zones à sol acide des régions méditerranéennes et atlantiques. La collecte a eu lieu **sur 164 sites différents**.

De retour à **Perth**, les glomérules provenant de chaque site furent battus séparément et semés à grands espacements sur une même ligne. Ce premier semis a permis de séparer des sous-populations sur des critères morphologiques. Au total, **599 sous-populations ont été individualisées et évaluées en ligne les 2 années suivantes** ; ce sont ces évaluations, aimablement fournies par W.J. COLLINS, que nous étudierons.

■ Collecte de MASSON

Ces prospections ont été faites en 1985 **dans les Pyrénées-Orientales** en parcourant les sols acides des Albères, des Aspres et des Fenouillèdes entre 20 et 700 m d'altitude, sans quadrillage précis du territoire. **21 sites** ont été identifiés au printemps, sites contenant une population de trèfle souterrain isolée sur une surface inférieure à celle du "voisinage" au sens de WRIGHT (1943) : surface dans laquelle on peut considérer que les parents d'un individu ont été tirés au hasard. Cette surface a été estimée à 0,2 m² pour l'espèce (DE LAGUERIE, 1986).

Pour chacun de ces sites, une quinzaine de glomérules ont été prélevés en juillet 1985 puis semés en ligne en septembre. Aucune différenciation apparente n'étant survenue, ces populations ont été considérées comme génétiquement pures. (Cette faible différenciation est bien sûr liée à la collecte sur une petite surface de populations isolées). **Parmi ces populations, 16 ont été retenues** sur des critères de vigueur, de port, de production de semences et évaluées en microparcelles de 1 m² en 1986/1987 et 1987/1988 sur les mêmes critères que GLADSTONES. Même si ces populations ne sont pas des lignées pures, on peut penser qu'elles sont génétiquement homogènes étant donné la forte autogamie du trèfle souterrain, la taille de la population d'origine inférieure à celle du voisinage et la non-différenciation pendant deux années d'évaluation.

Pour l'analyse statistique, **ces 16 populations ont été traitées séparément des 599 sous-populations** de GLADSTONES, mais elles leur seront comparées lorsque ce sera possible. Ces populations seront appelées par la suite "écotypes" selon l'usage, bien que d'autres critères que la situation écologique aient permis de les distinguer.

2. Caractéristiques des sites

Les caractéristiques retenues ont été la pluviométrie moyenne annuelle, le type de sol et le pH à l'eau du sol. Trois classes de sol ont été retenues :

- les sols bruns sablo-limoneux ou limoneux sur schistes ou sur granite,

- les sols d'arène granitique,
- et les sols sableux des Landes.

3. Caractères biologiques

■ Longueur du cycle

La longueur du cycle est déterminée par la durée (en jours) de la phase semis - début floraison. Les données de GLADSTONES sont exprimées en nombre de jours observés à Perth. Pour pouvoir comparer, à titre indicatif, les évaluations faites à Perth et à Perpignan on a enlevé 55 jours (décalage observé sur des variétés commerciales de cycle connu) aux résultats obtenus à Perpignan.

■ Vigueur

La vigueur est notée de 1 à 10, visuellement sur le volume de végétation pour l'évaluation de la collecte de GLADSTONES, d'après la biomasse coupée pour l'évaluation de la collecte de MASSON.

■ Teneurs en substances oestrogènes

Les teneurs en formononétine, génistéine et biochanine A ont été déterminées pour tous les écotypes au stade floraison, en chromatographie sur couche mince par la méthode standard (FRANCIS et MILLINGTON, 1965).

■ Dureté

La dureté est exprimée par le taux de graines dures, c'est à dire de graines dont le tégument est imperméable à l'eau et qui ne germent pas spontanément lors d'un test de germination, mais germent après scarification. Pour GLADSTONES, elle est mesurée à 0, 2, et 4 mois après conservation des semences en étuve à température alternée variant graduellement de 15°C la nuit à 60°C le jour, standard australien (QUINLIVAN, 1961) qui reproduit les conditions thermiques au sol dans ce pays. Il semble que cette méthode majore sensiblement les phénomènes de levée de dormance dans les conditions de la France. Ces déterminations n'ont été effectuées que sur un sous-échantillon de 222 écotypes jugés les plus intéressants, notamment par leur vigueur et leur aspect.

Sur les écotypes de la collecte MASSON, les tests de germination ont été effectués à 0 et 3 mois après avoir laissé les semences dans les conditions naturelles (MASSON, 1987). Ces mesures ne sont donc pas comparables avec celles de GLADSTONES et majorent la dureté par rapport au standard australien.

4. Méthodologie d'analyse statistique

Le traitement des données a porté sur le fichier complet des 599 écotypes de la collecte GLADSTONES et sur le sous-fichier de 222 écotypes sur lesquels la détermination de la dureté avait été faite. La comparaison des 2 fichiers faite visuellement sur des diagrammes emboîtés montre très peu de différences sauf pour la variable vigueur en fin de cycle qui avait déterminé la sélection du sous-échantillon (1 point d'écart).

Les groupes régionaux ont été comparés sur le fichier de 222 écotypes pour chacune des variables par analyse de variance et tests de comparaisons multiples (tests de BONFERRONI) au seuil de signification 0,05.

Des analyses en composantes principales ont été effectuées sur les 2 fichiers.

Une classification ascendante hiérarchique sur les variables centrées réduites (méthode WARD) a permis d'établir une typologie en 5 groupes des 222 écotypes. Les groupes ont été comparés pour chaque variable par analyse de variance et tests de BONFERRONI (seuil de signification 0,05).

Résultats et discussion

1. Distribution géographique : une forte présence de trèfle souterrain en région atlantique

■ Localisation et régions climatiques

La carte figure 1 et la figure 2 donnent la répartition géographique des écotypes collectés. Même si nous savons que cette répartition est en partie fonction des itinéraires de collecte, nous pouvons conclure à la présence importante de trèfles souterrains en région atlantique.

Sur les 599 écotypes collectés par GLADSTONES, 458 (soit 76%) l'ont été en région atlantique, de Bayonne à Brest. Bien que ceci soit conforme à la distribution de l'espèce proposée par MORLEY et KATZNELSON (1985), cette importance peut surprendre pour une espèce souvent considérée par ses utilisateurs comme méditerranéenne.

Les trèfles souterrains français se rencontrent dans des sites s'étendant des latitudes 41°30 à 48°40, **sous des climats variant du climat méditerranéen sub-humide au climat atlantique humide** avec les caractéristiques suivantes :

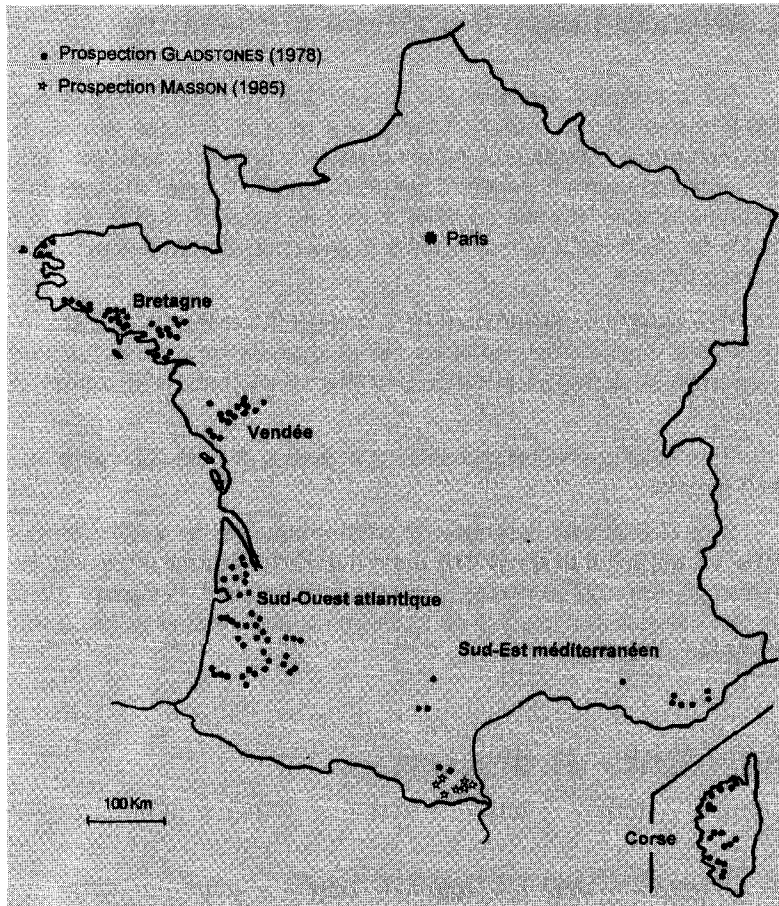


FIGURE 1 : Sites de collecte des écotypes de trèfle souterrain.

FIGURE 1 : Collection sites of ecotypes of subterranean clover.

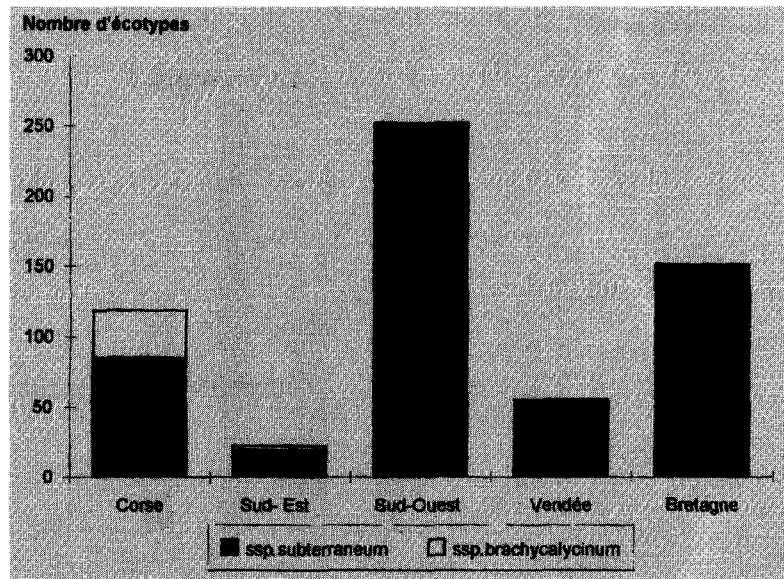
	Température moyenne annuelle (°C)	Température minimale moyenne de janvier (°C)	Pluviométrie annuelle (mm)	Insolation annuelle (h)
Perpignan	15,2	3,9	597	2 568
Marseille	14,5	2,5	569	2 814
Ajaccio	14,6	3,7	667	2 767
Brest	10,7	3,7	1 120	1 768

La caractéristique commune de ces climats est la douceur des températures hivernales qui permet l'accomplissement du cycle hiver - printemps du trèfle souterrain.

Il est difficile de faire une analyse sur l'altitude des sites puisque seules les régions méditerranéennes possèdent un relief important dans les zones de collectes. Les trèfles souterrains ont été trouvés jusqu'à 700 m, aussi bien en Corse que dans le Sud-Est mais pas au dessus. Cette localisation permet de penser que les écotypes français de trèfle souterrain sont **résistants au froid** puisque ces zones ont subi des périodes de froid exceptionnel comme en janvier 1985 (avec - 9,5°C en plaine du Roussillon, - 14°C dans l'arrière-pays) ou février 1956 (- 11°C à Perpignan). Des observations faites à Perpignan en 1985 sur

FIGURE 2 : Répartition régionale des écotypes de trèfle souterrain collectés (599 écotypes, collecte de GLADSTONES).

FIGURE 2 : Regional distribution of the subterranean clover ecotypes collected (599 ecotypes, GLADSTONES collection).



des écotypes du Sud-Est avaient montré (MASSON et GINTZBURGER, 1987) qu'ils avaient supporté - 9,5°C sans dommage. Cependant, les populations peuvent également survivre grâce au stock de graines dures en terre.

Les sous-espèces rencontrées appartiennent aux groupes *subterraneum* et *brachycalycinum* mais jamais *yanninicum*. La sous-espèce *subterraneum* est présente partout alors que la sous-espèce *brachycalycinum* est strictement inféodée aux zones méditerranéennes et aux zones les plus basses. Cette sous-espèce est surtout rencontrée dans les zones les plus chaudes (MORLEY et KATZNELSON, 1965 ; PIANO, 1984). La sous-espèce *brachycalycinum* représente 6,2% seulement de la collecte de GLADSTONES (37 écotypes) contre 68% de la collecte de MASSON dans les Pyrénées-Orientales.

■ Les sols

Il n'y a pas eu d'analyse détaillée des sols des collectes, mis à part la mesure du pH. La grande majorité des sols est de type sablo-limoneux, ou sableux dans les Landes. On retrouve donc la préférence du trèfle souterrain pour les **sols légers et acides**. Seuls 3% des sols se trouvent sur des arènes granitiques malgré l'importance des zones granitiques prospectées (Corse, Sud-Est, Vendée, Bretagne). Le trèfle souterrain a une préférence pour des sols plus évolués, plus riches notamment en matière organique comme cela a déjà été montré pour la Corse (GENSOULEN, 1988).

64% des sols des sites de collecte ont un pH compris entre 6 et 7. La figure 3 donne la répartition du pH des sites en fonction de la sous-espèce pour la collecte de GLADSTONES. On ne rencontre pratiquement jamais la sous-espèce *subterraneum* dans des sols de pH supérieur à 7,5. Pour la sous-espèce *brachycalycinum*, le pH du site varie

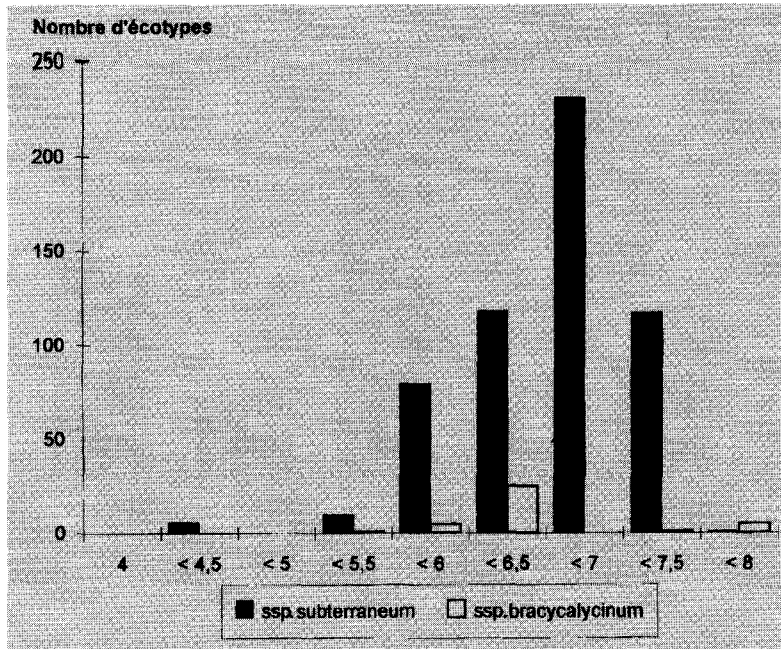


FIGURE 3 : Distribution des écotypes de trèfle souterrain selon la sous-espèce et le pH du site (599 écotypes, collecte de GLADSTONES).

FIGURE 3 : Distribution of subterranean clover ecotypes according to subspecies and site pH (599 ecotypes, GLADSTONES collection).

de 5 à 8. Cette sous-espèce tolère, on le sait, les pH alcalins (PIANO, 1984). La différence entre les 2 sous-espèces est hautement significative (Chi 2 = 44).

2. Caractéristiques biologiques des écotypes français

Les figures 4, 5, 6 donnent les caractéristiques biologiques pour le fichier complet de 599 écotypes de la collecte australienne et la figure 7 la répartition des taux de dureté des semences sur l'échantillon restreint (222 écotypes). Le tableau 1 donne les résultats des analyses de variances et des tests de comparaisons multiples (BONFERRONI) pour

Variables*	Corse	Sud-Est	Sud-Ouest	Vendée	Bretagne	Moyenne	Analyse** variance
FLO	138	143	142	148	143	142	S
VID	4,5	3,9	4,7	5,6	5,6	4,9	S
VIF	7,8	7,1	7,8	8,6	7,5	7,8	NS
FOR	0,07	0,14	0,17	0,19	0,09	0,13	S
BIO	0,32	0,88	1,02	1,24	1,17	0,90	S
GEN	0,75	0,55	0,27	0,38	0,18	0,38	S
DU0	88,8	73,4	72,2	64,8	84,8	69,5	NS
DU2	32,1	28,0	16,3	7,7	8,4	18,1	S

* FLO : durée (en jours) de la phase semis - floraison à Perth (Australie)
 VID, VIF : vigueur en début et en fin de cycle (estimation de 1 à 10)
 FOR, BIO, GEN : teneurs (% MS) en formononétine, en biochanine A et en génistéine
 DU0, DU2 : dureté initiale des semences et dureté des semences à 2 mois (températures alternées 15-60°C), en % de semences dures
 ** test de comparaison de moyenne de Bonferroni au seuil de 0,05 ; S: significatif, NS: non significatif

TABLEAU 1 : Comparaison régionale des caractéristiques biologiques des trèfles souterrains français (fichier de 222 écotypes, collecte de GLADSTONES).

TABLE 1 : Regional comparison of biological features of French subterranean clovers (file of 222 ecotypes, GLADSTONES collection).

les variables biologiques sur le sous-fichier des 222 écotypes pour lesquels les mesures de dureté avaient été faites.

■ Un cycle végétatif souvent long

La longueur du cycle est mesurée par la durée de la phase semis - début de floraison à Perth, exprimée en nombre de jours. La gamme des cultivars australiens commercialisés va de 77 jours pour le plus précoce (Nungarin) à 163 jours pour Tallarook (COLLINS, 1984). Pour les écotypes français, on constate que, si la variabilité du caractère est importante puisque la durée de la phase semis - floraison varie de 112 jours à 184 jours, **la distribution de précocité est fortement décalée vers les types tardifs** (figure 4).

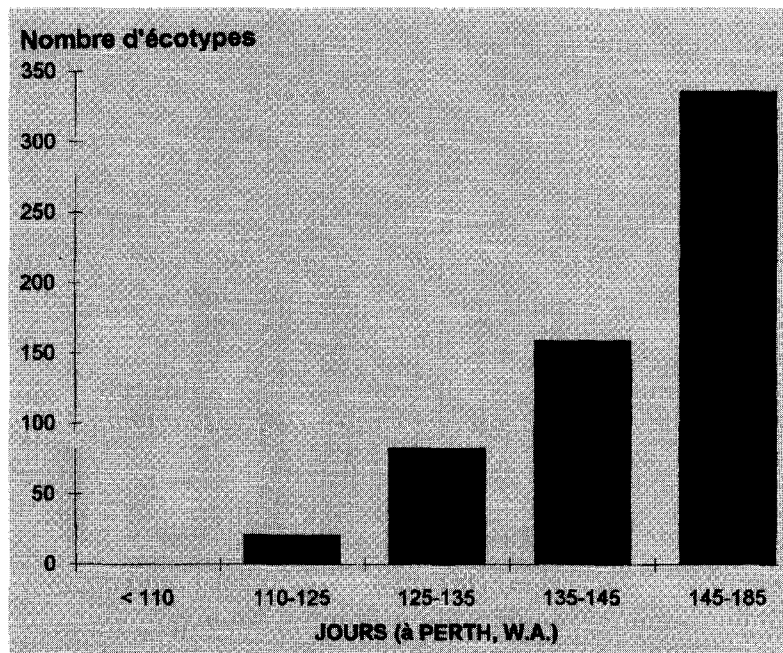
On peut classer les écotypes français de trèfle souterrain en 4 groupes en fonction du nombre de jours de la phase semis - début floraison à Perth, les types précoces n'étant pas représentés dans la flore française :

- demi-précoce : 110 à 125 j (type Seaton Park, 110 j) 3,5%
- précocité intermédiaire : 125 à 135 j (type Clare, 129 j) 13,9%
- tardif : 135 à 145 j (type Mount Barker, 137 j) 26,5%
- très tardif : 145 à 185 j (type Tallarook, 163 j) 56,1%

Bien que la comparaison soit délicate avec les données de GLADSTONES, les écotypes de la collecte effectuée par MASSON dans les Pyrénées-Orientales ont des cycles intermédiaires à très tardifs comme ceux des autres régions.

FIGURE 4 : Distribution des écotypes français de trèfle souterrain selon la longueur de la phase semis - floraison à Perth (599 écotypes, collecte de GLADSTONES).

FIGURE 4 : Distribution of French ecotypes of subterranean clover according to length of the sowing to flowering period in Perth (599 ecotypes, GLADSTONES collection).



L'analyse de variance faite sur le fichier des 222 écotypes indique des différences significatives entre les régions au seuil de 5% mais les différences sont faibles et seule la Vendée se différencie significativement des autres régions avec un cycle un peu plus long (148 jours), supérieur de 6 jours seulement à la moyenne des régions. On aurait pu s'attendre à rencontrer plus de types précoces dans les régions méridionales et les écotypes à cycle long dans les régions atlantiques. Il n'en est rien. Il est vrai que les régions méditerranéennes françaises ont certes un été chaud et sec mais une durée de la saison pluvieuse relativement longue, de l'ordre de 9 mois.

■ Une vigueur de fin de cycle élevée

Les distributions des notations de vigueur en début de cycle (milieu de l'hiver) et en fin de cycle (à la floraison) sont présentées figure 5.

Sur l'ensemble des écotypes on constate que **la vigueur de début de cycle**, c'est à dire la croissance hivernale, **est assez médiocre** avec une moyenne de 4,9. Il y a peu de différences régionales pour ce caractère. Cette faible vigueur générale en hiver laisse cependant apparaître 152 écotypes à vigueur assez élevée (de 6 à 7) et 8 à vigueur élevée (de 8 à 9) soit au total 27%. Ces types expriment une caractéristique importante pour l'utilisateur potentiel de cette espèce, l'aptitude à la croissance en période froide, alors que la plupart des autres espèces fourragères sont au repos à cette époque.

Le test de BONFERRONI après analyse de la variance sépare **deux groupes significativement différents** : un groupe méridional (Corse, Sud-Ouest et Sud-Est) et un groupe (Bretagne et Vendée) à vigueur en début de cycle plus forte. Ce caractère résulte peut être d'une adapta-

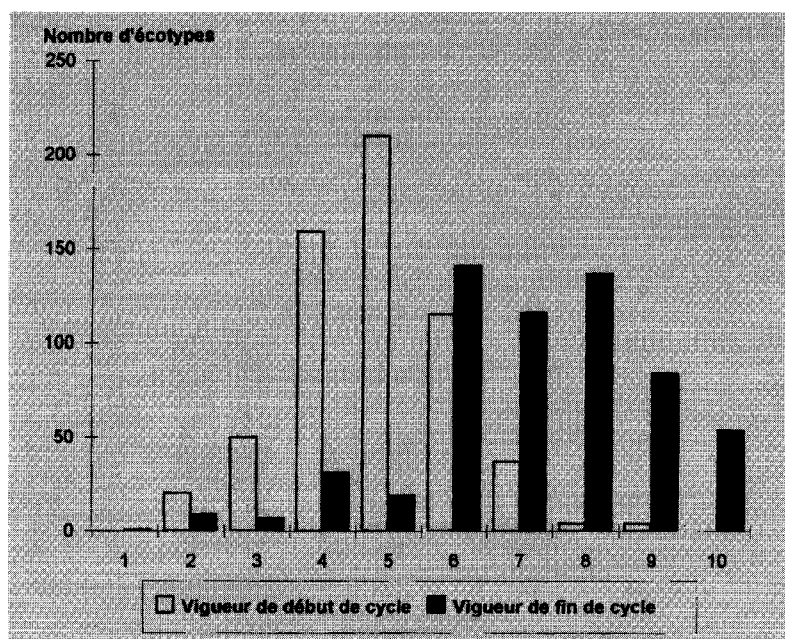


FIGURE 5 : **Vigueur des écotypes français de trèfle souterrain au début et à la fin du cycle** (599 écotypes, collecte de GLADSTONES).

FIGURE 5 : Vigour of French ecotypes of subterranean clover at beginning and end of cycle (599 ecotypes, GLADSTONES collection).

tion aux difficultés d'installation à l'automne d'un trèfle annuel dans des zones atlantiques où les autres espèces prairiales (graminées pérennes) sont plus présentes qu'en milieu méditerranéen.

La vigueur en fin de cycle est en revanche plus élevée ; elle est en moyenne de 7,2 sur l'ensemble des écotypes et, pour 89% d'entre eux, elle est supérieure ou égale à 6. Il n'y a pas de différence significative entre les régions sur ce caractère.

La vigueur en fin de cycle est **inversement liée à la longueur du cycle**. Le coefficient de corrélation entre la vigueur en fin de cycle (VIF) et la longueur de la phase semis - début floraison (FLO) est de - 0,53 (significatif au seuil 0,01). Cette relation laisse espérer l'existence d'un groupe d'écotypes de précocité moyenne et de bonne vigueur.

La sous-espèce ne semble pas intervenir dans la vigueur en début de cycle mais la sous-espèce *brachycalycinum* a plus fréquemment une vigueur de fin de cycle élevée (TALAMUCCI et PARDINI, 1987 ; GENSOLLEN, 1988).

■ Des teneurs en substances oestrogènes très variables

La formononétine, substance la plus dangereuse, qui provoque des troubles de reproduction chez les ovins, **est assez fréquente dans les écotypes français**. Si on prend pour limite supérieure de non nocivité 0,2% de la matière sèche, on constate que 46% des écotypes atteignent ou dépassent cette limite. Certes, 54% sont inoffensifs mais c'est un caractère sur lequel il faudra être vigilant dans tout programme de sélection. Il y a quelques différences régionales (figure 6) : **les écotypes trouvés dans les Pyrénées-Orientales ont une très faible teneur** en formononétine (et les 16 écotypes de la collecte MASSON ont même une teneur nulle en formononétine), ceux de Vendée une forte teneur (56% ont 0,2% et plus). Le test de BONFERRONI montre que les écotypes du Sud-Ouest et de Vendée ont une teneur moyenne en formononétine significativement supérieure (1,7 à 1,9% MS) à celle des trèfles des autres régions. Il semble que la sous-espèce *brachycalycinum* ait des teneurs en formononétine plus faibles : le taux de formononétine ne dépasse jamais 0,6% pour les écotypes de la sous-espèce *brachycalycinum* alors qu'il atteint 1,5% pour ceux de la sous-espèce *subterraneum*. Cette conclusion rejoint celle de MATTHÄUS (1992) sur les populations au Maroc.

En ce qui concerne **la génistéine**, **66% des échantillons ont une teneur faible**, inférieure à 0,5%. **La teneur en biochanine A est plus élevée** : plus de 64% des écotypes ont une teneur en biochanine A comprise entre 0,6% et 1,4% de la matière sèche.

Le taux de génistéine augmente avec l'altitude et il est plus élevé dans la sous-espèce *brachycalycinum*. On observe une relation inverse pour l'ensemble des deux sous-espèces entre les teneurs en génistéine et en biochanine A. Le coefficient de corrélation est de - 0,50 (significatif au seuil 0,01). Le test de comparaison des moyennes montre une différence significative entre les teneurs observées en Corse et celles

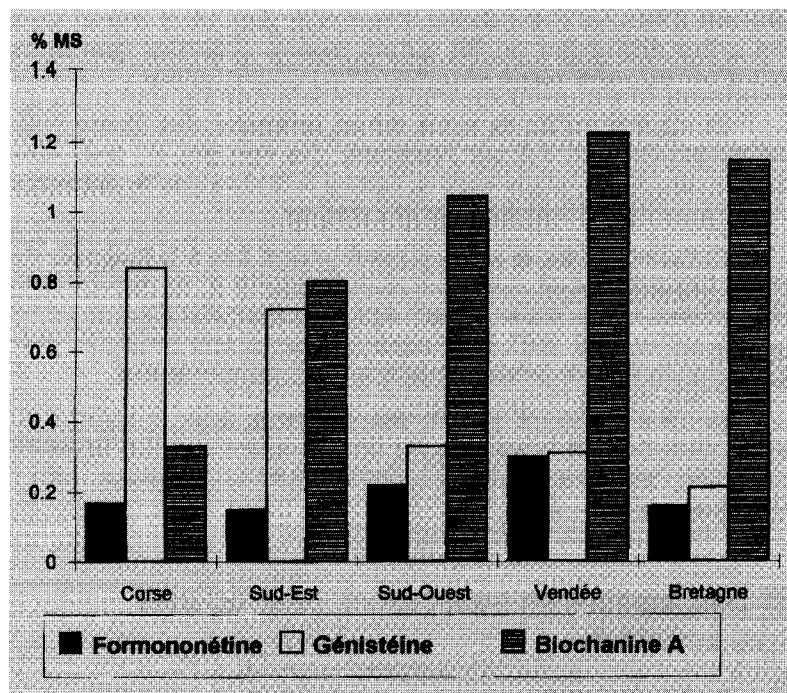


FIGURE 6 : Teneurs en oestrogènes des écotypes de trèfle souterrain selon leur origine régionale (599 écotypes, collecte de GLADSTONES).

FIGURE 6 : Contents in oestrogenic substances of French ecotypes of subterranean clover according to region of origin (599 ecotypes, GLADSTONES collection).

des autres régions. Les écotypes corses ont une teneur en biochanine nettement plus faible (0,32% MS) et une teneur en génistéine nettement plus forte (0,75% MS) que les écotypes des autres régions.

■ Une dureté de semences faible, sauf en zone méditerranéenne

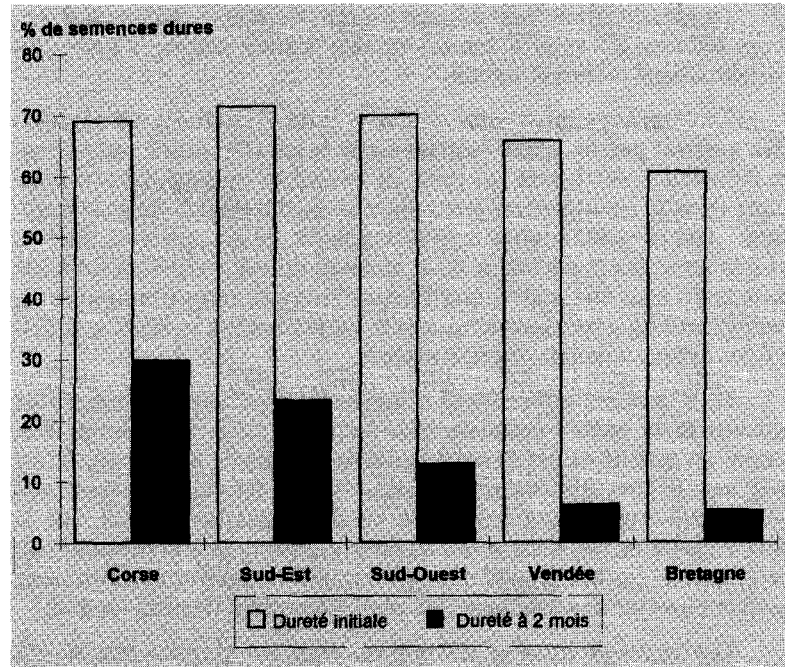
La dureté des semences est un mécanisme de protection qui permet de prévenir des germinations trop précoces afin de contribuer à pérenniser l'espèce. La dureté initiale au moment de la maturation des graines (juin) a intérêt à être élevée et à diminuer au cours de l'été pour permettre à la fois une germination suffisante à l'automne (octobre) et la constitution d'un stock de semences avec les graines non germées.

Les duretés initiales sont dans l'ensemble assez élevées avec une assez grande variabilité (écart type de la distribution : 17,1) : 51% des écotypes français ont une dureté initiale de semence supérieure à 70% (figure 7). **La dureté à 2 mois est en revanche très faible** : 52% des écotypes ont une dureté très faible, inférieure à 10% de semences dures. Il faut rappeler cependant que cette dureté est minorée dans la méthode d'évaluation en étuve à température alternée 15°C la nuit / 60°C le jour. Seuls 5,4% des écotypes français auraient selon cette méthode un taux de semences dures à 2 mois supérieur à 50%, taux recommandé pour garantir une bonne pérennité du peuplement.

Les tests de comparaison de moyennes ne montrent aucune différence significative entre les régions pour la dureté initiale. Les diffé-

FIGURE 7 : Taux de semences dures à 0 mois et à 2 mois selon l'origine régionale des écotypes de trèfle souterrain (222 écotypes, collecte de GLADSTONES).

FIGURE 7 : Proportions of hard seeds at 0 and 2 months in ecotypes of subterranean clover according to their region of origin (222 ecotypes, GLADSTONES collection).



rences sont par contre significatives pour la dureté à 2 mois avec une valeur nettement plus forte pour la Corse et le Sud-Est. Les écotypes des régions méditerranéennes ont un taux de semences dures de 25-35%, assez satisfaisant, alors que pour les écotypes de Bretagne et de Vendée ce taux est très faible (7%). Les types du Sud-Ouest ont un taux intermédiaire de 16%. Il s'agit d'une adaptation aux irrégularités climatiques des zones méditerranéennes permettant aux populations de trèfle souterrain de constituer un stock de semences garant de la survie du peuplement (PIANO *et al.*, 1993) ; en climat typiquement atlantique le risque de perte d'un semis est faible compte tenu de la plus grande régularité des pluies.

Dans la collecte MASSON, les 16 écotypes des Pyrénées-Orientales ont une dureté à 3 mois, mesurée *in situ*, de 54% en moyenne. Cette valeur est satisfaisante pour assurer une bonne régénération à l'automne et une bonne pérennité du peuplement.

3. Typologie des trèfles souterrains français : 2 des 5 groupes sont plus intéressants

Une analyse en composantes principales effectuée sur le fichier des 222 écotypes de la collecte GLADSTONES avec toutes les variables de caractéristiques biologiques n'a pas fait apparaître de structure très nette. Seule l'individualisation de la plupart des écotypes de Corse apparaît.

La classification hiérarchique a permis d'établir 5 classes d'éco-types (tableau 2) qui se différencient significativement pour toutes les variables sauf la dureté initiale.

Le 1^{er} groupe, provenant de Corse et du Sud-Ouest, **se caractérise surtout par un cycle relativement court** (132 jours entre semis et floraison à Perth soit un cycle de précocité intermédiaire comme Clare dans la classification australienne). La dureté à 2 mois est suffisante. Les caractéristiques agronomiques de ce groupe sont intéressantes pour des applications où la brièveté du cycle végétatif du trèfle souterrain peut être mise à profit pour réduire la concurrence avec un peuplement ligneux associé comme la vigne (BERTONI et MASSON, 1994) ou des arbres forestiers (agroforesterie).

Le 2^e groupe, qui provient uniquement de Corse, **se caractérise par une forte dureté des semences à 2 mois**. Le cycle est tardif et la teneur en génistéine est élevée à l'inverse du taux de biochanine. C'est le groupe le plus intéressant d'un point de vue agronomique dans une perspective d'utilisation fourragère ou de couverture du sol, car la dureté élevée de ses semences contribue grandement à la pérennité du peuplement. Or, la capacité de régénération du trèfle souterrain nous semble être l'un des avantages les plus importants de cette espèce.

Les autres groupes se différencient tous par un caractère négatif sur le plan agronomique, que ce soit la faible vigueur associée à une trop grande longueur du cycle (groupe 3), la teneur très élevée en formononétine (groupe 4) ou la très faible dureté des semences (groupe 5). Ces 2 derniers groupes qui ne se distinguent pratiquement que par le taux de formononétine sont originaires des régions atlantiques (Sud-Ouest, Bretagne et Vendée) ; on y retrouve une relation entre pluviométrie élevée et plus régulière, cycle tardif et faible dureté des semences, relation déjà décrite (VOLAIRE *et al.*, 1992 ; MATTHÄUS, 1992).

Par comparaison, les 16 écotypes collectés par MASSON dans les Pyrénées-Orientales sont voisins du groupe 2 avec un cycle tardif, une

Variables*	1	2	3	4	5	Test** statistique
FLO	132	141	149	144	137	S
VID	4,5	4,5	4,4	5,1	8,1	S
VIF	7,5	8,0	6,7	8,4	9,0	S
FOR	0,06	0,09	0,08	0,34	0,08	S
BIO	0,69	0,31	1,18	0,99	1,11	S
GEN	0,32	0,89	0,26	0,28	0,21	S
DU0	88	88	73	69	85	NS
DU2	21,5	33	17	12	8	S
Région concernée	Sud-Ouest Corse	Corse	Sud-Est Sud-Ouest Bretagne	Sud-Ouest	Sud-Ouest Bretagne Vendée	
Nb écotypes	34	41	68	37	40	
% écotypes	15	19	31	17	18	
* FLO : durée (en jours) de la phase semis - floraison à Perth (Australie) VID, VIF : vigueurs en début et en fin de cycle (estimation de 1 à 10) FOR, BIO, GEN : teneurs (% MS) en formononétine, en biochanine A et en génistéine DU0, DU2 : dureté initiale des semences et dureté des semences à 2 mois (températures alternées 15-60°C), en % de semences dures **S : significatif (au seuil de 0,05) ; NS : non significatif (au seuil de 0,05)						

TABLEAU 2 : Typologie des trèfles souterrains français (fichier de 220 écotypes, collecte de GLADSTONES).

TABLE 2 : Typology of French subterranean clovers (file of 220 ecotypes, GLADSTONES collection).

teneur nulle en formononétine mais relativement élevée en génistéine, une dureté des semences suffisante puisque les mesures effectuées après 3 mois dans les conditions climatiques locales donnaient un taux de semences dures de 54%. Ceci tendrait à montrer que les caractéristiques des trèfles souterrains du Sud-Est méditerranéen sont assez voisines de celles des écotypes de Corse.

Conclusion : des perspectives intéressantes pour la création variétale

Les prospections effectuées ont montré que le trèfle souterrain est une espèce largement répandue en France méditerranéenne et atlantique puisque plus de 600 écotypes ont été récoltés entre la Corse, le Sud-Est, le Sud-Ouest, la Vendée et la Bretagne. Dans ces régions, le trèfle souterrain se rencontre sur des sols acides, sur schistes, granites et sables jusqu'à un pH de 7,5 pour la sous-espèce *subterraneum*. La sous-espèce *brachycalycinum* reste, semble-t-il, inféodée aux zones méditerranéennes de faible altitude et se rencontre jusqu'à un pH de 8. La sous-espèce *yannicum* n'a pas été trouvée. L'altitude maximum des sites (700 m en région méditerranéenne) et la latitude la plus élevée (Brest, 48°50' N) laissent à penser que les trèfles souterrains français sont résistants au froid, vraisemblablement jusqu'à - 10°C, bien que ces régions se caractérisent par la relative douceur des températures hivernales moyennes. La pluviométrie annuelle moyenne de ces régions varie de 550 à 1 100 mm avec un minimum en été sans que la durée de la saison sèche n'excède 2 à 3 mois.

La variabilité des caractères biologiques est importante mais on observe cependant des caractéristiques particulières des populations françaises, notamment en ce qui concerne la durée du cycle et la dureté des semences.

La longueur du cycle mesurée en nombre de jours entre la germination et le début de la floraison mesurée à Perth, varie de 112 jours à 184 jours. Il s'agit donc de cycles longs : 16% seulement des écotypes prospectés se situent dans la gamme de précocité intermédiaire des variétés australiennes, 27% des écotypes sont tardifs et 53% très tardifs, toujours en référence à la gamme de précocité des variétés australiennes. Les types précoces ne sont pas représentés à l'exception de quelques écotypes demi-précoces (4%). Il y a peu de différence de longueur de cycle entre les provenances des différentes régions françaises.

Les notes de vigueur attribuées lors des évaluations au début du cycle et en fin de cycle sont extrêmement variables sans que l'on ait pu faire de liaison avec la région de provenance. La variabilité est forte à l'intérieur de chaque région, voire de certains sites de collecte. Cependant, d'une façon générale sur les écotypes français, la vigueur de début de cycle (croissance hivernale) est relativement faible et la vigueur de fin de cycle, élevée. Nous avons plutôt en France des types

à cycles longs et à croissance lente en hiver. Cependant, la variabilité du caractère étant importante, il existe des types à croissance hivernale notable, facteur qui intéresse les éleveurs des régions méridionales. La vigueur de fin de cycle est en général forte, corrélée négativement à la durée du cycle. Il existe donc un groupe d'écotypes de précocité tardive et de forte vigueur au printemps, notamment chez la sous-espèce *brachycalycinum*.

La teneur des écotypes de trèfle souterrain français en substances oestrogènes est très variable. Pour la plus dangereuse d'entre elles, la formononétine, responsable de troubles de fécondité chez les brebis, 45% des écotypes ont une teneur supérieure à 0,2%, limite considérée comme dangereuse. C'est donc un élément à prendre en compte dans la sélection. Il y a quelques différences régionales ; les fréquences d'écotypes à forte teneur en formononétine sont plus élevées en Vendée, plus faibles en Bretagne, en Corse et, surtout, dans le Sud-Est méditerranéen. Pour la génistéine et la biochanine A, substances moins dangereuses, la variabilité est également importante ; les écotypes méridionaux ont, en général, une teneur élevée en génistéine et faible en biochanine A, à l'inverse des écotypes de Vendée et Bretagne, riches en biochanine A et pauvres en génistéine.

La dureté des semences est un facteur important de pérennité des peuplements. La dureté initiale est en général assez élevée (en moyenne 60 à 70% des graines dures en début d'été). En revanche, la dureté à deux mois est, en général, faible chez les écotypes français avec une forte variabilité régionale ; la moyenne générale du pourcentage de graines dures à deux mois est de 14% et seuls 5% des écotypes français ont un taux de graines dures à deux mois supérieur à 50%, estimations faites avec la méthode standard australienne qui minore la dureté par rapport à nos conditions climatiques. Dans les régions méditerranéennes, le taux de semences dures à deux mois est de l'ordre de 30% alors qu'il n'est que de 8% en Bretagne et Vendée.

Un certain nombre d'écotypes semblent intéressants sur le plan agronomique avec un cycle de 140 jours, relativement long, une faible teneur en formononétine, une dureté initiale suffisante et surtout, une dureté à deux mois nettement plus élevée que pour le reste des populations françaises. Ces écotypes se localisent principalement dans le Sud du pays (Corse, Sud-Est méditerranéen, Sud-Ouest atlantique).

Des évaluations agronomiques effectuées en petites parcelles dans la région de Perpignan (MASSON *et al.*, 1993) avaient montré le potentiel prometteur de certains de ces écotypes, supérieur à celui des variétés commerciales australiennes. Un type a été retenu et a permis d'inscrire au catalogue européen en 1994 la variété "Argeles", variété tardive de la sous-espèce *brachycalycinum* à teneur nulle en formononétine, de bonne productivité hivernale et totale, à forte production de semences d'un taux de dureté de semences suffisant (45% à 3 mois en conditions locales). L'expérimentation en plein champ de cette variété est en cours.

Accepté pour publication, le 10 février 1997.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANGULO M.D., SANCHEZ de RIVERA A.M. (1975) : "Studies on *Trifolium subterraneum* Ecotypes", *Cytologia*, 40, 415-423.
- BERTONI G., MASSON P. (1994) : "Influence d'un enherbement à base de trèfle souterrain sur la production et la nutrition de la vigne sous climat méditerranéen", *Progrès agricole et viticole*, 111, 6, 136-139.
- COLLINS W.J. (1984) : *Registered cultivars of subterranean clover*, Bulletin 4083 Agdex 137 / 33. Western Aust. Dept. Agri., 28 p.
- CRESPO D.G. (1975) : *Pastagens semeadas temporarias e permanentes de sequeiro*, INIA, Oeiras, Portugal, 93 p.
- DE LAGUERIE P. (1986) : *Différenciation intra et inter-populations chez le trèfle souterrain, sous l'effet du hasard et de la sélection naturelle*, DEA USTL, 3 octobre, 78 p.
- FRANCIS C.M., MILLINGTON A.J. (1965) : "Varietal variation in the isoflavone content of subterranean clover : its estimation by a microtechnique", *Aust. J. Agric. Res.*, 16, 557.
- GENSOLLEN V. (1988) : *Etude de la répartition et de la différenciation écotypique du trèfle souterrain en Corse*, DAA ENSAM, 90 p.
- GLADSTONES J.S., COLLINS W.J. (1983) : "Subterranean clover as a naturalized plant in Australia", *J. of the Australian Inst. of Agric. Sci.*, 191-202.
- JARITZ G. (1982) : "Amélioration des herbages et des cultures fourragères dans le nord-ouest de la Tunisie : étude particulière des prairies de trèfle - graminée avec *Trifolium subterraneum*", *GTZ Schriftenreihe*, n°119.
- KATZNELSON J.S. (1974) : "Biological flora of Israel 5. The subterranean clovers of *Trifolium subsect. Calymorphum* Katzn. *Trifolium subterraneum* L. (*sensu lato*)", *Israel J. Bot.*, 23, 69-108.
- MASSON P. (1987) : "First evaluation of subterranean clover ecotypes collected in Pyrénées-Orientales (France)", *Agrimed sub group on self reseeding annual legumes*, Cagliari (Sardaigne), 28-30, 5 p.
- MASSON P., GINTZBURGER G. (1987) : "Le trèfle souterrain (*Trifolium subterraneum*). Essais préliminaires et perspectives d'utilisation dans une zone méditerranéenne française : le Roussillon", *Fourrages*, 110, 183-204.
- MASSON P., LANGAR K., ANTHELME B. (1993) : "Comparaisons de la production herbacée de divers cultivars et d'écotypes locaux du sud de la France de *Trifolium subterraneum* L.", *Herba*, n°6, 71-78.
- MATTHÄUS D. (1992) : *Verbreitung und Eigenschaften spontan vorkommender Trifolium subterraneum Genotypen in Marokko*, Dr. Agr. Univ. Giessen. (Allemagne).
- MORLEY F.H.W., KATZNELSON J.S. (1965) : "Colonization in Australia by *Trifolium subterraneum* L.", *Symp. on Genetics of colonizing species*, 169-282, Academic press, New-York.
- PIANO E. (1984) : "Preliminary observations on the structure and variability of Sardinian populations of subterranean clover", *Gent Agr.*, 38, 75-90.
- PIANO E., PECETTI L., SARDARA M., MISSIO A., CARRONI A. (1993) : "Relationship between adaptive features and environment of origin in subterranean clover", *FAO-CIHEAM REUR Technical series*, 28, 24-27.

- PROSPERI J.M., GENSOLLEN V., OLIVIER I., MANSAT P. (1989) : "Observations sur la répartition et l'écologie de luzernes annuelles et de trèfle souterrain en Corse", 16^e Congr. Int. Herbages, Nice (France), 295-296.
- QUINLIVAN B.J. (1961) : "The effect of constant and fluctuating temperatures on the permeability of hard seeds of some legume species", *Aust. J. Agric. Research*, 12, 1009-22.
- TALAMUCCI P., PARDINI A. (1987) : "Behaviour of some annual self-reseeding legumes observed in a mediterranean environment of southern Tuscany", *Agrimed working group on annual self-reseeding legumes*, Cagliari (Sardaigne), 5 p.
- VOLAIRE F., LELIEVRE F., PROSPERI J.M. (1992) : "Production of cultivars and native populations of *Trifolium subterraneum* L. in South of France (Corsica)", *Austr. J. of Exp. Agric.*, 32, 619-25.
- WRIGHT S. (1943) : "Isolation by distance", *Genetics*, 28, 114-138.
- ZOHARY M., HELLER D. (1984) : "The genus *Trifolium*", *Israel Acad. of Sci. and Humanities*, Jerusalem.

SUMMARY

Distribution and characteristics of French ecotypes of subterranean clover

Ecotypes of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.), 599 in all, were collected on 174 sites in French Atlantic and Mediterranean regions and assessed in line nurseries for 2 years in Perth (Australia). Their characteristics were analysed, together with those of 16 other ecotypes collected and assessed in the region of Perpignan. The brachycalycinum subspecies was found in the Mediterranean region only. The French ecotypes of subterranean clover are distinguished by a long cycle, good vigour, highly variable levels of oestrogenic substances, and a low seed hardness, especially in the ecotypes from the Atlantic region. Some ecotypes, particularly from southern France (Corsica, South-East, South-West), seem to be of agricultural interest.