

Variabilité des huiles essentielles et de l'ADN de deux souches de *Mentha spicata* L. (glabre et pubescente) de la région de Meknès

C. EL ANBRI¹, T. EDDAYA², A. BOUGHADAD³, P. CHAIMBAULT⁴, A. ZAID¹, E. EL FAHIME⁵

(Reçu le 10/09/2021; Accepté le 12/10/2021)

Résumé

Mentha spicata constitue l'une des 4 espèces du genre *Mentha* cultivées pour, entre autres, la production d'huiles essentielles. Les parcelles de la menthe connaissent l'apparition d'une souche pubescente (Sp) suite à la germination des graines produite par la souche glabre (Sg), initialement cultivée dans la région de Meknès. Pour comparer ces deux souches de *M. spicata*, des analyses chimiques des composés volatils et génétiques ont été entreprises. Les huiles essentielles ont été extraites par hydrodistillation des feuilles sèches et leur composition chimique a été analysée par CPG/SM. Le polymorphisme de l'ADN des deux souches a été caractérisé par l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Les rendements en huiles essentielles de Sp et Sg sont, respectivement, de l'ordre de 1,61 et 2,32% (v/w). Les nombres de composés chimiques identifiés chez la Sp et la Sg sont respectivement de 47 et 37. La souche Sp se démarque par sa richesse en limonène (7,7%) et gemacrène-D (3,12%) et sa faible teneur en carvone (62,2), comparativement à la souche cultivée (75,6). La souche Sp est caractérisée par 44 bandes uniques et la Sg n'en possède que 18.

Mots clés: *Mentha spicata*, Huiles essentielles, CPG/SM, ADN, AFLP, Polymorphisme

Variability of essential oils and DNA of two strains of *Mentha spicata* L. (hairless and pubescent) from Meknes region

Abstract

Mentha spicata is one of four species of the genus *Mentha* cultivated for, among others, the production of essential oils. The mint plots are experiencing the appearance of a pubescent strain (Sp) following the germination of seeds produced by the hairless strain (Sg) initially cultivated in the Meknes region. To compare these two strains of *M. spicata*, chemical and genetic analysis of volatile compounds were undertaken. The essential oils were extracted by hydrodistillation of dry leaves and their chemical composition was analyzed by GC/MS. The DNA polymorphism of the two strains was characterized by AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). The essential oil yields of Sp and Sg are 1.61 and 2.32% (v/w), respectively. The numbers of chemical compounds identified in the Sp and Sg are 47 and 37, respectively. Sp strain is distinguished by its richness in limonene (7.7%) and gemacrene-D (3.12%) and its low carvone content (62.2) compared to the cultivated strain (75.6). Sp strain is characterized by 44 unique bands and Sg has only 18.

Keywords: *Mentha spicata*, Essential oils, CPG / MS, DNA, AFLP, Polymorphism

INTRODUCTION

Mentha spicata L. est un hybride interspécifique fertile issu du croisement de *M. suaveolens* et *M. longifolia* (Harley et Brighton, 1977; Gobert *et al.*, 2002). Plusieurs variétés et hybrides de cette espèce (Gobert *et al.*, 2002; Shasany *et al.*, 2005; Hua *et al.*, 2011; Hua *et al.*, 2013) sont cultivés ou poussent à l'état spontané sur les 5 continents sauf l'Antarctique (Kokkini et Vokou, 1989; Gobert *et al.*, 2002; Liu et Lawrence, 2007; Tucker Arthur et Naczi Robert, 2007). *M. spicata* est l'une des 4 espèces cultivées pour la production des huiles essentielles (Harley et Brighton, 1977). Les huiles essentielles de cette espèce sont utilisées dans plusieurs domaines d'importance économique (médecine, industrie alimentaire, pharmacie et phytoprotection) (Akdoan *et al.*, 2007; Znini, 2011).

L'origine parentale de *M. spicata* lui confère une grande diversité morphologique, cytologique, génétique et chimique (Kokkini et Vokou, 1989; Gobert *et al.*, 2002). Parmi ses populations, il peut y avoir des individus glabres et d'autres pubescents (Harly, 1967, cité dans Gobert *et al.*, 2002). La présence de souches pubescentes constitue un matériel végétal recherché par les améliorateurs de plantes (Ashouri *et al.*, 2001; Pomponb *et al.*, 2010). Les poils constituent un système de défense contre des bioagresseurs comme les pucerons (Ashouri *et al.*, 2001; Moghadam *et al.*, 2013),

ravageurs de *M. spicata* (Özdemýr, 2006; Kaygin *et al.*, 2009). Par ailleurs, certains terpenoïdes comme le limonène, α -Pinène, β -Pinène, (*E*)- β -ocimène et germacrène D sont utilisés par les plantes comme système de défense contre les bioagresseurs, dans l'activation de l'expression des gènes de défense ou pour l'attraction des parasitoïdes et prédateurs des ennemis de cultures (Bohlmann *et al.*, 1997; Fäldt *et al.*; 2003; Boachon *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2021).

Le chimio-phénotype, le phénotype et le rendement des huiles essentielles des plantes sont affectés par les facteurs endogènes, dont le génotype de la plante (Murray, 1960; Kokkini et Vokou, 1989; Kokkin, 1991; Marks, 1997; Özgüven et Kirici, 1999; Boachon *et al.*, 2018; Bornowski *et al.*, 2020). La connaissance de la diversité génétique d'une plante fournit une base pour la sélection de cultivars très performants (Schlotterer, 2004). Pour ce faire, différentes techniques moléculaires sont utilisées pour évaluer la diversité génétique de la menthe (Vos *et al.*, 1995; Khanuja *et al.*, 2000; Fenwick et Ward, 2001; Shasany *et al.*, 2005; Hua *et al.*, 2011; Al-Rawashdeh, 2011; Hua *et al.*, 2013). Pour *M. spicata*, la diversité génétique intra-spécifique a été étudiée par, entre autres, l'AFLP. Au Maroc, la caractérisation moléculaire de *M. spicata* seule ou en association avec celle des composés volatils n'a jamais fait, à notre connaissance, l'objet d'étude.

¹ Faculté des Sciences, Université Moulay Ismail, Meknès, Maroc

² Institut des Techniciens Spécialisés en Horticulture, Meknès, Maroc

³ Département de Protection des Plantes et de l'Environnement, École Nationale de l'Agriculture, Meknès, Maroc

⁴ Faculté des Sciences, Université Moulay Ismail, Meknès, Maroc

⁵ Plateforme génomique fonctionnelle, UATRS-CNRST, Rabat, Maroc

Cette étude se propose de comparer la variabilité chimique des huiles essentielles et génétique de deux souches de *M. spicata*, l'une glabre (Sg) initialement cultivée et l'autre pubescente (Sp) issue de la germination des graines de la souche (Sg), au sein d'une même parcelle située dans la région de Meknès.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Caractérisation morphologique de la souche Sg et Sp de *M. spicata*

La souche Sp de *M. spicata* est collectée d'une parcelle cultivée par la souche Sg de la même espèce dans la région de Meknès. Hormis la pubescence chez la souche à poils, les autres caractères morphologiques sont semblables chez les deux souches. L'identité des deux souches a été confirmée par le professeur Ibn Tattou Mohamed (Institut Scientifique de Rabat, Maroc où des échantillons sont déposés dans l'herbier de l'Institut, respectivement, sous les RAB 78287 et 78288 (Figure 1).

Matériel végétal

Trois kilogramme/souche de tiges feuillées fraîches de *M. spicata* ont été récoltés en juillet 2016 de la même parcelle, située dans la région de Meknès et de coordonnées géographiques (N: 33.898846; O: 5.634463), d'altitude 550 m et de climat semi-aride à hiver tempéré.

Les plants ont été séchés à l'ombre à une humidité relative comprise entre 37 et 65 % et à une température ambiante inférieure à 29 °C jusqu'à la stabilité du poids. Les feuilles ont été ensuite séparées des tiges et conservées au frais.

Extraction des huiles essentielles

Cent grammes de feuilles séchées de chaque souche ont été soumis à une hydro-distillation dans 500 mL d'eau distillée pendant 3 heures à l'aide d'un appareil de type «Clevenger». Les huiles essentielles recueillies par décantation à la fin de la distillation ont été déshydratées au sulfate de sodium anhydre et conservées dans des flacons en verre fumé dans un réfrigérateur à 4°C. Le rendement en huiles essentielles est exprimé en ml d'huiles par 100 g de broyat des feuilles sèches.

Analyse des huiles essentielles

L'analyse chimique des huiles essentielles a été effectuée par la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM). L'appareillage utilisé est un chromatographe de type Trace GC ULTRA, équipé d'une colonne VB-5 (Methylpolysiloxane à 5% phenyl), 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Le spectromètre de masse est de type Polaris Q MS à trappe ionique. L'énergie d'ionisation est de 70 eV. La gamme de balayage s'étend de 50 à 500 m/z; 1 µL d'une solution de 6 mg d'huiles essentielles dans 1,5 mL d'acétate d'éthyle a été injecté en mode split avec un ratio 1/50. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1,4 mL/min. La température de l'injecteur et celle de ligne de transfert sont respectivement de 220 °C et de 300°C. La température de la source d'ionisation est 200°C. La température du four a été programmée comme suit : un isotherme à 40°C pendant 2 minutes, ensuite la température passe à 180°C à raison de 4°C/min puis à 300°C à raison de 20°C/min et un isotherme à 300°C pendant 2 minutes.



Figure 1: Aspect morphologique des tiges feuillées et des inflorescences des souches Sp et Sg de *M. spicata* a tige feuillée pubescente (Sp), b inflorescence pubescente (Sp); c tige feuillée glabre (Sg), d inflorescence glabre (Sg)

L'identification des constituants des huiles essentielles a été faite sur la base des spectres de masse et de leurs indices de rétention (AI) au sens d'Adams (Adams, 2007) qui sont calculés à partir du temps de rétention d'une série d'alcane (C8-C40). Les spectres et les AI sont comparés à ceux de la base de données (NIST, Version 2.0, 2002) et ceux cités dans la littérature (Adams, 2007; Padalia Rajendra *et al.*, 2013).

Extraction de l'ADN

Les feuilles des deux souches de la menthe *M. spicata* (Sg et Sp) ont été conservées dans l'azote liquide à 80°C. Pour chaque souche, 200 mg de feuilles ont été broyées en une pâte fine dans environ 500 µL de tampon CTAB (bromure d'hexadécyltriméthylammonium). Après l'incubation du mélange dans un incubateur à 55°C pendant 15 min, celui-ci a été centrifugé à 12000 tr/min pendant 5 min. Pour chaque tube, 250 µL du mélange du chloroforme et de l'alcool isoamylique (24:1) ont été ajoutés. La solution finale a été mélangée puis tournée à 13000 tr/min pendant 1 min et la phase aqueuse supérieure contenant l'ADN a été transférée seule dans un microtube. Pour chaque microtube, 50 µL d'acétate d'ammonium 7,5 M, puis 500 µL d'éthanol absolu froid ont été additionnés et les microtubes inversés lentement à plusieurs reprises pour précipiter l'ADN. Après sa précipitation, l'ADN a été prélevé à la pipette puis lavé dans un microtube contenant 500 µL d'éthanol à 70% sous forme de glace et les tubes ont été lentement inversés et ensuite tournés à 13000 tr/min pendant une minute pour former une pastille. Après l'élimination du surnageant, l'ADN a été lavé 2 fois par l'ajout de d'éthanol à 70% sous forme de glace et ensuite tourné à 13000 tr/min pendant 1 min. La qualité et la quantité de l'ADN obtenu ont été mesurées par un spectrophotomètre à 260/280 nm. L'ADN a été séché pendant 15 min puis repris dans l'eau ultra pure.

Analyse de la variation génétique

Les amorces utilisées dans cette étude proviennent du kit AFLP d'Applied Biosystem (ABI, USA). Dans le présent travail, six combinaisons d'amorces AFLP (EcoRI-ACA/M-CTC, EcoRI-AGG/M-CTG, EcoRI-AGC/M-CTG, EcoRI-ACA/M-CAG, EcoRI-AAG/M-CTA et EcoRI-AGC/M-CTA) ont été utilisées. Les différentes étapes d'ALFP suivies sont décrites dans le manuel fournis avec le Kit (AFLP®, 2010).

Analyse des données

Les bandes non ambiguës de longueurs comprises entre 0 et 500 pb dans l'analyse AFLP ont été marquées. Ensuite, les résultats des profils d'amplification ont été transformés en une matrice par l'attribution du chiffre 1 à des bandes présentes et 0 à des bandes absentes. La similarité génétique a été estimée par le coefficient de similarité (Nei et Li, 1979), tandis que la diversité de la composition des huiles essentielles des deux souches a été évaluée par la distance euclidienne au moyen du logiciel Excel version 2007.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Rendement des huiles essentielles

Le rendement en huiles essentielles des feuilles de la souche Sg (2,32 % v/w) est supérieur à celui de la Sp (1,62 % v/w); cette différence peut être attribuée aux facteurs endogènes dont le génotype des souches de *M. spicata*. En effet,

selon (Kokkini et Vokou, 1989; Kokkini, 1991; Özgüven et Kirici, 1999), l'accumulation des huiles essentielles est affectée par le génotype des plantes et le rendement de ces huiles varie d'un hybride à l'autre ou d'une souche à l'autre (Farah *et al.*, 2002; Rey *et al.*, 2004; Soilhi *et al.*, 2019).

Composition des huiles essentielles

L'analyse de la composition chimique montre une variation en quantité et en qualité du profil chimique des huiles essentielles étudiées. Selon la souche étudiée, 93,9 et 94,3 % des constituants des huiles essentielles de *M. spicata* sont identifiés (Tableau 1).

Ce qui correspond à 37 et 47 composés relevés dans l'échantillon, respectivement, de la souche Sg et Sp. Les composés identifiés sont principalement les monoterpènes oxygénés qui représentent environ 71% dans Sp et 85% dans Sg des composés des huiles essentielles. Avec 62% dans Sp et 76% dans Sg, le carvone constitue le composé majoritaire; dans la littérature, plusieurs auteurs ont remarqué que *M. spicata* est aussi riche en carvone (Edris *et al.*, 2003; Chauhan *et al.*, 2009; Hua *et al.*, 2011; Znini *et al.*, 2011; Govindarajan *et al.*, 2012; Hua *et al.*, 2013; Soilhi *et al.*, 2019). La composition en huiles essentielles des hybrides connaît une variation (Farah *et al.*, 2002; Rey *et al.*, 2004) néanmoins leur chémotype reste le même (Rey *et al.*, 2004). Les monoterpènes hydrocarbonés et les sesquiterpènes hydrocarbonés sont plus représentés chez la Sp avec, respectivement, de 11,0 et 7,59%; tandis que la Sg est pauvre en ces groupes (Tableau 1). Le limonène (7,82 %) est le composé le plus représenté du groupe des monoterpènes hydrocarbonés chez la souche Sp. Récemment, l'accession [IIM(J) 26] de *M. spicata* riche en carvone (76,6 %) et en limonène (9,57%) a été sélectionnée (Chauhan *et al.*, 2009). La variabilité en pourcentage de limonène et carvone peut s'expliquer par l'activité de limonène synthétase, limonène-6-hydroxylase et trans-carveol dehydrogenase (Gershenzon *et al.*, 1992; Bouwmeester *et al.*, 1998) qui sont affectées par la régulation de l'expression des gènes sous l'influence de facteurs endogènes (Bohlmann *et al.*, 1997; Bouwmeester *et al.*, 1998; Croteau Rodney et Colby Shelia, 1999; Fäldt *et al.*, 2003). Par contre, le germacrène D est le plus représenté dans le groupe des sesquiterpènes hydrocarbonés et représente 3,17% des composés volatils chez la même souche (Sp). Cette variabilité peut être due à l'activité enzymatique des sesquiterpènes synthétases impliquées dans la transformation du geranyl diphosphate en sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés (Degenhardt *et al.*, 2009; Nieuwenhuizen *et al.*, 2009). Certains auteurs ont pu isoler la (+)-germacrène D synthétase du gingembre (*Zingiber officinale*) (Picaud *et al.*, 2006). D'autres ont montré la synthèse du germacrène D à partir du farnesyl pyrophosphate (FPP) à l'aide de la germacrène D synthétase (Gershenzon *et al.*, 2000). La variabilité de la composition des huiles est attribuée aux différents niveaux de la biosynthèse des enzymes responsables (Gershenzon *et al.*, 2000).

Les 12 composés volatils spécifiques à la Sp sont les α -Thujène, Camphène, β -Pinène, meta-Mentha-1(7), 8-diene, α -Terpinène, (Z)- β -Ocimène, (E)- β -Ocimène, Terpinolène, trans-Piperitol, cis-Jasmone, Spathulénol et cis-14-nor-Muurolo-5-en-4-one. Ceux-ci représentent 1,99% du total. Par contre, dans les huiles essentielles de la Sg, seuls 2 composés sont spécifiques à savoir les ρ -Mentha-1(7), 8-diene et Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol. Ils repré-

Tableau 1: Composition chimique en pourcentage des huiles essentielles des feuilles des souches Sg et Sp de *M. spicata*

Composés	AI	Pourcentage	
		S _g	S _p
α-Thujene	925	-*	0,02
α-Pinene	930	0,03	0,27
Camphene	943	-	0,05
Sabinene	971	0,08	0,59
β-Pinene	990	-	0,19
meta-Mentha-1(7),8-diene	1001	-	0,1
ρ-Mentha-1(7),8-diene	1004	0,18	-
α-Terpinene	1013	-	0,42
Limonene	1025	2,15	7,82
(Z)-β-Ocimene	1037	-	0,41
(E)-β-Ocimene	1048	-	0,1
γ-Terpinene	1056	0,04	0,88
cis-Sabinene hydrate	1063	0,45	1,08
Terpinolene	1085	-	0,19
Linalool	1095	0,06	0,11
cis-Thujone	1100	0,09	0,09
trans-Pinene hydrate	1118	0,16	0,12
trans-ρ-Mentha-2-en-1-ol	1137	0,14	0,11
Menthol	1162	0,72	0,61
Terpinen-4-ol	1173	1,94	1,77
trans-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1187	0,37	0,23
cis-Dihydro carvone	1192	3,96	3,21
trans-ρ-Menthan-2-one	1199	0,39	0,2
trans-Piperitol	1207	-	0,05
Trans-Carveol	1218	0,65	0,57
Pulegone	1235	0,83	0,61
Carvone	1243	75,6	62,2
Dihydroedulan-IIA	1284	0,16	0,18
Dihydroedulan-I	1289	0,15	0,17
iso-Dihydro carveol acetate	1326	1,1	1,65
Cis Carveol acetate	1361	0,35	0,37
α-Copaene	1372	0,08	0,14
β-Bourbonene	1381	1,54	2,13
cis-Jasmone	1398	-	0,11
α-Gurjunene	1406	0,17	0,29
Caryophyllene E	1415	0,99	0,29
α-Humulene	1449	0,15	0,3
allo-Aromadendrene	1458	0,15	0,61
Germacrene-D	1476	0,41	3,17
Valencene	1492	0,02	0,39
α-Muurolene	1501	0,02	0,12
Germacrene-A	1510	0,12	0,15
Spathulenol	1572	-	0,13
Caryophyllene oxide	1578	0,31	0,15
Cubenol	1611	0,14	0,33
Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5α-ol	1638	0,24	0,49
α-Cadinol	1651	0,25	0,51
Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1α-ol	1684	0,08	-
cis-14-nor-Muuro-1-5-en-4-one	1687	-	0,18
Monoterpenes hydrocarbonés		2,48	11,0
Monoterpenes oxygénés		85,4	71,1
Sesquiterpènes hydrocarbonés		3,65	7,59
Sesquiterpènes oxygénés		1,02	1,79
Autres esters		1,45	2,02
Autres Composés oxygénés		0,31	0,35
Total identifié		94,3	93,9
Rendement en huile essentielle (% w/v)		2,32	1,61

*.: Non détecté

sentent 0,26 % du pourcentage identifié. La variabilité dans la composition en huiles essentielles des deux souches est aussi corroborée par la distance de dissimilarité avoisinant 14,9. Dans le cas des accessions étudiées par (Hua *et al.*, 2011), la distance de dissimilarité varie entre 0,01 et 11,3. Plusieurs auteurs ont aussi noté une variabilité dans la composition chimique des huiles essentielles des accessions étudiées de *M. spicata* (Kokkini et Vokou, 1989; Edris *et al.*, 2003; Hajlaoui *et al.*, 2008; Chauhan *et al.* 2009; Znini *et al.*, 2011; Hua *et al.*, 2011; Hua *et al.*, 2013; Soilhi *et al.*, 2019). La différence dans les constituants de ces huiles peut être affectée par des facteurs liés à l'espèce elle-même (eg, anatomique, biochimique et physiologique).

Évaluation moléculaire

L'étude de la diversité moléculaire des souches Sp et Sg par l'AFLP a permis d'amplifier 109 bandes. La longueur des fragments marqués varie de 36 à 492 pb avec une moyenne de 18 bandes par marqueur primaire et dont 56,9% sont polymorphes. La souche Sp est génétiquement plus diversifiée que la Sg, les nombres totaux des bandes uniques sont 44 et 18, respectivement chez Sp et Sg. Ce nombre de bandes uniques varie de 0 à 20 en fonction de l'amorce utilisé (Tableau 2).

Tableau 2: Variation du nombre de bandes uniques chez les souches Sp et Sg de *M. spicata* selon l'amorce utilisé

Souches de <i>Mentha spicata</i>	Amorces					
	E-ACA/M-CTC	E.AGG/M.CTG	E.AGC/M.CTG	E.ACA/M.CAG	E.AAG/M.CTA	E.AGC/M.CTA
S _p	8	20	1	3	8	4
S _g	0	15	0	0	3	0

La variation du nombre de bande unique chez *M. spicata* CIMAP/C30, *M. spicata* CIMAP/C33 et leur hybride a été montré selon l'amorce choisi par (Shasany *et al.*, 2005). Le polymorphisme est aussi mesuré par le coefficient de similarité s'élevant à 0,61. Nos résultats concordent avec ceux trouvés par certains auteurs (Gobert *et al.*, 2002; Khanuja *et al.*, 2000; Al-Rawashdeh, 2011). Les coefficients de similarité de la diversité génétique intra-spécifique de *M. spicata* calculés par ces auteurs oscillent, respectivement, entre 0,61 et 0,98; 0,59 et 0,64 et entre 0,11 à 0,68. A l'instar des accessions de *M. spicata* mentionnées dans certaines études (Al-Rawashdeh, 2011; Hua *et al.*, 2011), les 2 souches de *M. spicata* étudiées ne présentent pas une grande diversité génétique.

La présence de poils et la variabilité des huiles essentielles entre les deux souches peuvent être d'origine génétique. Comme cela a été mis en évidence chez le lavandin (*Lavandula × intermedia* Emeric ex Loiseleur) génétiquement modifié et chez *Arabidopsis* (Marks, 1997; Tsuro et Ikedo, 2011). D'ailleurs, une relation entre le génotype de la plante, la biosynthèse des enzymes responsables et le métabolisme des monoterpènes et les sesquiterpènes a été montrée (Ringer *et al.*, 2005; Boachon *et al.*, 2018; Bornoński *et al.*, 2020). Chez *M. spicata*, le gène C dominant est responsable de la production de la carvone à partir du limonène et le gène Lm dominant inhibe la conversion du limonène à la piperiténone avec une faible conversion de la carvone en carveol en absence du gène R (Bhat *et al.*, 2002). A ce propos, les huiles essentielles des individus de

M. aquatica possédant le gène dominant Lm et récessif cc sont riches en limonène, tandis que celles des plantes du génotype (LmLm, CC) sont riches en carvone (Hefendehl et Murray, 1972; Hefendehl et Murray, 1973). Certains auteurs ont isolé et séquencé l'ADN codant pour l'enzyme (-)-4S-limonène synthase de *M. spicata* (Croteau Rodney et Colby Shelia, 1999). D'autres travaux relatifs à l'isolement de séquences d'ADN codant pour les enzymes synthétases des monoterpènes, sésquiterpènes et les diterpènes sont cités dans la littérature (Bohlmann et al., 1997; Maruyama et al., 2001; Lückner et al., 2002; Ohara et al., 2003; Fäldt et al., 2003; Picaud et al., 2006; Nieuwenhuizen Niels et al., 2009; Bornowski et al., 2020; Li et al., 2021).

CONCLUSION

À travers les résultats obtenus, les deux souches de *M. spicata* présentent une variabilité génétique et en termes de composition des huiles essentielles. La souche Sp est à la fois génétiquement plus diversifiée et riche en nombre de composés volatils. Chez les deux souches, la carvone est le composé majoritaire. Le limonène et le Germacrène-D sont plus représentés dans les huiles essentielles de la souche pubescente Sp Douze composés volatils sont spécifiques à cette dernière souche contre uniquement deux à la souche Sg Dans la présente étude, la diversité des composés volatils des deux souches semble être affectée par leurs génotypes. La caractérisation quantitative et qualitative des huiles essentielles des deux souches en association avec la diversité de l'ADN constitue donc une piste de recherche pour orienter la sélection et l'amélioration des cultivars appropriés de la menthe.

RÉFÉRENCES

- Adams R.P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry, 4th Edition. AFLP® Plant Mapping (2010).

- Jullien F. (2007). Mint. *Transgenic Crops IV-Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 59: 435-466.
- Karazmoodeh E., Zandi P. (2013). Population Abundance of Cabbage Aphid (*Brevicoryne Brassicae* L.) On The Most Commonly Cultivated Rapeseed Varieties in Guilan at Two Growth Stages. *Asian J. exp. Biol. Sci.*, 4: 21-27.
- Kaygin A.T., Gorur G., Sadel F.C. (2009). Aphid (Hemiptera: Aphididae) species determined on herbaceous and shrub plants in Bartin Province in Western Blacksea Region of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 8: 2893-2897.
- Khanuja S.P.S., Shasany A.K., Srivastava A., Kumar S. (2000). Assessment of genetic relationships in *Mentha* species. *Euphytica*, 111: 121-125.
- Kokkini S., Vokou D. (1989). *Mentha spicata* (Lamiaceae) chemotypes growing wild in Greece. *Economic botany*, 43: 192-202.
- Kokkini S. (1991). Chemical races within the genus *Mentha* L. In Linskens H.E. and Jackson J. E. (Eds.): *Essential Oils and Waxes*, Vol. 12, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Koul O., Walia S., Dhaliwa G.S. (2008). Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. *Biopestic. Int.*, 4: 63-84.
- Li J., Wang Y., Dong Y., Zhang W., Wang D., Bai H., Li K., Li H., Shi L. (2021). The chromosome-based lavender genome provides new insights into Lamiaceae evolution and terpenoid biosynthesis. *Horticulture Research*, 8:53.
- Liu W., Lawrence B. M. (2007). Production of Mints and Mint Oil in China. In: Lawrence B. M. (ed.). *Mint, the Genus Mentha*, CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton London New York.
- Lücker J., El Tamer Mazen K., Schwab W., Verstappen Francel W. A., van der Plas Linus H. W., Bouwmeester Harro J., Verhoeven Harrie A. (2002). Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*) cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthases. *Eur. J. Biochem.*, 269: 3160-3171.
- Marks M.D. (1997). Molecular genetic analysis of trichome development in arabidopsis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 48: 137-163.
- Maruyama T., Ito M., Kiuchi F., Honda G. (2001). Molecular Cloning, Functional Expression and Characterization of d-Limonene Synthase from *Schizonepeta tenuifolia*. *Biol. Pharm. Bull.*, 24: 373-377.
- Miller G., Halberta S., Foottit N. (2007). A taxonomic reevaluation of *ovatus mentharius* (van der goot) (Hemiptera: Aphididae). *Proc. Entomol. soc. Wash.*, 109: 522-529.
- Moghadam S.G., Hosseini M., Pourbaige M., Tabar H.K., Farhadi N., Hosseini S.M.A (2013). Composition and Antifungal Activity of Peppermint (*Mentha piperita*) Essential Oil from Iran. *J. Crop Prot.*, 2: 506-512.
- Murray, M. J. (1960). The genetic basis for a third ketone group in *M. spicata* L. *Journal Genetics*, 45: 931-37.
- Nei M. et Li W-H (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Genetics*, 76: 5269-5273.
- Nieuwenhuizen Niels J., Wang Mindy Y., Matich Adam J., Green Sol A., Chen X., Yauk Yar-Khing, Beuning Lesley L., Nagegowda Dinesh A., Dudareva N., Atkinson Ross G. (2009). Two terpene synthases are responsible for the major sesquiterpenes emitted from the flowers of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Journal of Experimental Botany*, 60: 3203-3219.
- Ohara K., Ujihara T, Endo T., Sato F., Yazaki K. (2003). Limonene production in tobacco with *Perilla* limonene synthase cDNA. *Journal of Experimental Botany*, 54: 2635-2642.
- Omar Nabil A., El-Sayed Zeinab I.A., Romeh Ahmed A (2009). Chemical constituents and biocidal activity of the Essential oil of *Mentha Spicata* L. grown in Zagazig region, Egypt. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5: 1089-1097.
- Özdemir I., Kilincer A.N., Gürkan M.O. (2006). A Survey of Aphididae (Homoptera) on Wild Plants in Ankara, Turkey. *Ekoloji*, 15: 1-6.
- Özgüven M., Kirici S. (1999). Research on yield, essential oil, contents and components of mint (*Mentha*) species in different ecologies. *Turkish J. Agric. and Forestry*, 23: 465-472.
- Padalia Rajendra C., Verma Ram S., Chauhan A., Sundaresan V., Chanotiya Chandan S. (2013). Essential oil composition of sixteen elite cultivars of *Mentha* from western Himalayan region, India. *Maejo Int. J. Sci. Technol.*, 7: 83-93.
- Picaud S., Olsson Mikael E., Brodelius M., Brodelius Peter E. (2006). Cloning, expression, purification and characterization of recombinant (+)-germacrene D synthase from *Zingiber officinale*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 452: 17-28.
- Pompona J., Quiring D., Giordanengo P., Pelletier Y. (2010). Characterization of *Solanum chomatophilum* resistance to 2 aphid potato pests, *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) and *Myzus persicae* (Sulzer). *Crop Protection*, 29: 891-897.
- Pomponb J., Quiring D., Giordanengo P., Pelletier Y. (2010). Role of host-plant selection in resistance of wild *Solanum* species to *Macrosiphum euphorbiae* and *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 137: 73-85.
- Rey C., Carron C.A., Cottagnoud A., Schweizer N., Bruttin B., Carlen Ch. (2004). Nouveaux hybrides de thym vulgaire. *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.*, 36: 297-301.
- Ringer K.L., Davis E.M., and Croteau R. (2005). Monoterpene Metabolism. Cloning, Expression, and Characterization of (-)-Isopiperitenol/(-)-Carveol Dehydrogenase of Peppermint and Spearmint. *Plant Physiology*, 137: 863-872.
- Schlotterer C. (2004). The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? *Nat. Rev. Gene*, 5: 63-69.
- Schmidt Claus O., Bouwmeester Harro J., Franke S., König Wilfried A. (1999). Mechanisms of the biosynthesis of sesquiterpene enantiomers (+)- and (-)-germacrene D in *Solidago Canadensis*. *Chirality*, 11: 353-362
- Shasany A. K., Darokar M. P., Dhawan S., Gupta A. K., Gupta S., Shukla A. K., Patra N. K., Khanuja S. P. S. (2005). Use of RAPD and AFLP Markers to Identify Inter- and Intraspecific Hybrids of *Mentha*. *Journal of Heredity*, 96: 542-549.
- Soilhi Z., Rhimi A., S. Heuskin S., Fauconnier M.L., Mekki M. (2019). Essential oil chemical diversity of Tunisian *Mentha* spp. collection. *Industrial Crops & Products*, 131: 330-340.
- Tsuro M., Ikedo H. (2011). Changes in morphological phenotypes and essential oil components in lavandin (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel.) transformed with wild-type strains of *Agrobacterium rhizogenes*. *Scientia Horticulturae*, 130: 647-652.
- Tucker Arthur O., Naczi Robert F.C. (2007). *Mentha*: An Overview of Its Classification and Relationships. In: Lawrence B. M. (ed.). *Mint, the Genus Mentha*, CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton London New York.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van De Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
- Znini M., Bouklah M., Majidi L., Kharchouf S., Aouniti A., Bouyanzer A., Hammouti B. (2011). Chemical Composition and Inhibitory Effect of *Mentha Spicata* Essential Oil on the Corrosion of Steel in Molar Hydrochloric Acid. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 6: 691-704.