

Contribution au développement et à l'utilisation des cartes génétiques moléculaires en génétique des riz

Gérard SECOND *, Alain GHESQUIERE **, Mathilde CAUSSE ***
et Olivier PANAUD ****

Résumé : L'étude du polymorphisme au niveau de l'ADN (RFLP, RAPD...) permet d'établir des cartes génétiques saturées. Dans cet objectif, des considérations sur la phylogénie des riz nous ont conduit à proposer un croisement interspécifique dont la cartographie est en cours d'achèvement (Cornell University). Sur le plan des ressources génétiques, l'utilisation d'une carte génétique saturée doit permettre une meilleure estimation de l'importance et de la structure de la diversité génétique, ainsi que des flux géniques à travers les barrières reproductives. L'analyse de cette diversité permet d'envisager en particulier une rationalisation de l'utilisation des ressources génétiques en privilégiant la diversité allélique : les collections pourraient ainsi se limiter à un plus petit nombre de géniteurs mais potentiellement plus riches de transgressions favorables dans les hybridations ; d'autre part, les tendances génétiques consécutives au processus de domestication et à la sélection moderne pourront être décelées au niveau génotypique.

Parallèlement à l'identification et à la localisation des gènes d'intérêt agronomique, les marqueurs moléculaires offrent la possibilité de contrôler et de suivre les introgressions dans les descendance issues d'hybridations interspécifiques ; cette démarche est abordée non seulement dans les croisements éloignés à l'intérieur du groupe *Sativa* (génome A) mais également dans des combinaisons mettant en jeu d'autres génomes. La cartographie de la diversité génétique résultante permettra de tester la valeur adaptative de certains fragments chromosomiques chez les riz sauvages et cultivés. Le point sera fait sur les développements récents des marqueurs moléculaires chez le riz à travers le programme d'évaluation de la diversité mené à l'IRRI (Philippines) et des exemples de suivi d'introgression en cours d'analyse.

Mots-clés : riz, marqueurs moléculaires, cartes génétiques, ressources génétiques, hybridation.

* IRRI, Plant Breeding Genetics and Biochemistry Division, PO Box 933, Manila, Philippines.

** ORSTOM, Laboratoire de Génétique et d'Amélioration des Plantes Tropicales, BP 5045, 34032 Montpellier cedex, France.

*** INRA, Station de Génétique Végétale, Ferme du Moulon, 91190 Gif/Yvette, France.

**** Laboratoire d'Evolution et Systématique des Végétaux, CNRS (URA 121), Bât 362, Université Paris-Sud XI, 91405 Orsay cedex, France.

Abstract : The study of polymorphism at DNA level (RFLP, RAPD...) allows to establish saturated genetic maps. In this aim, considerations on rice phylogenetic relationships led us to propose an interspecific back cross population for which mapping is expected to be completed in the near future (Cornell University). From the genetic resources standpoint, the development of a saturated rice map is expected to improve the evaluation of the range and structure of genetic diversity, as well as of gene flows across reproductive barriers. The analysis of this diversity will permit to rationalize the utilization of genetic resources while emphasizing on allelic diversity : thus, collections could be reduced to a smaller number of selected genitors but more suitable to lead to new genetic transgressions in hybridization programs. Also, genetic trends resulting from domestication process and modern plant breeding will be evidenced at genotypic level.

Jointly with tagging agronomic genes, molecular markers enable monitoring of genetic introgressions in progenies of interspecific hybrids. This is being done both in remote crosses within multispecific *Sativa* group (A genome) and in hybrids involving others genomes. Mapping of genetic diversity in hybrid derivatives will allow testing the adaptive value of peculiar chromosome fragments in wild and cultivated rices. The present status of rice molecular markers will be presented through the program of genetic diversity evaluation program underway at IRRI (Philippines) and examples of monitoring introgression for which analysis are pursued.

Key words : rice, molecular markers, genetic map, genetic resources, hybridization.

Introduction

Parmi les plantes cultivées et surtout les céréales, le riz présente un ensemble de caractéristiques qui le rendent particulièrement apte à la caractérisation moléculaire de son génome. En dehors de son importance géopolitique et économique dans le monde, la principale de ces caractéristiques est la petite taille de son génome : en nombre de nucléotides, cette taille (C = 450 Mb) est seulement environ trois fois celle d'*Arabidopsis thaliana*, mais elle est inférieure de deux fois environ à celle de la tomate, cinq fois à celle du maïs, onze fois à celle de l'orge et près de quarante fois à celle du blé tendre (Arumuganathan et Earle, 1991). Comme on peut l'attendre d'un petit génome, celui du riz contient une proportion élevée de séquences uniques que l'on estime à 75 % (Deshpande and Ranjekar, 1980 ; Mc Couch *et al.*, 1988) ; en outre, de toutes les graminées testées, le riz s'est révélé être la plus facile à transformer par de l'ADN exogène.

Conjointement au développement des biotechnologies, des progrès rapides ont été fait depuis quelques années dans l'étude et la manipulation du génome des riz : le génome chloroplastique du riz a d'ores et déjà été séquencé entièrement (Hiratsuka *et al.*, 1989), une carte physique de celui de la mitochondrie du riz est en cours (André *et al.*, 1991) et le projet de séquencer entièrement le génome nucléaire du riz est sérieusement envisagé, notamment au Japon.

Notre contribution s'est limitée au domaine du développement de cartes génétiques moléculaires et de leur utilisation dans l'évaluation de la diversité des ressources génétiques et dans leur appui à l'amélioration variétale par croisements. Cette contribution apparaît comme une suite logique du programme de recherche sur les riz africains mis en place par Jean Pernès : nous privilégierons donc ici les aspects qui découlent directement de la compréhension de l'organisation et de la structure de la diversité génétique des riz sauvages et cultivés tout en les situant dans leur contexte plus général.

Développement des cartes de liaison génétique des marqueurs RFLP

Le développement des cartes de liaisons génétiques chez le riz s'est fait depuis de nombreuses années sur la base de marqueurs morphologiques (Kinoshita, 1984) et plus récemment à partir de marqueurs isozymiques (Wu *et al.*, 1988 ; Pham *et al.*, 1990). La mise en évidence et la localisation de nouveaux marqueurs isozymiques est poursuivie à l'IRRI et concerne actuellement 35 marqueurs cartographiés sur 10 chromosomes (Khush *et al.*, 1991). Loin d'être obsolètes, ces premières cartes conserveront un grand intérêt lorsqu'elles auront été intégrées aux cartes de marqueurs de l'ADN, plus complètes et d'application plus universelle ; en particulier, elles peuvent être suffisantes pour des études préliminaires de liaisons génétiques au moindre coût. Néanmoins, seuls les marqueurs au niveau de l'ADN et plus particulièrement les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), ont permis à ce jour l'élaboration de cartes « saturées » où la distance moyenne entre marqueurs est de 5 cM ou moins.

Depuis la première carte RFLP partielle publiée sur le riz (Mc Couch *et al.*, 1988), plusieurs autres sont en développement, dont seules deux sont saturées avec 12 groupes de liaison (Yano *et al.*, 1991 ; Tanksley *et al.*, 1991 ; Causse et Tanksley, ce volume). La première carte ainsi que celle entreprise par l'équipe japonaise ont été toutes deux développées à partir de croisements entre des variétés cultivées appartenant aux sous-espèces *japonica* et *indica* car ces croisements présentent un polymorphisme plus important comparativement aux combinaisons intragroupes. La carte développée par Mc Couch *et al.* (1988) montre, pour un total de 135 marqueurs cartographiés, 22 groupes de liaisons ainsi que des marqueurs isolés qui n'ont pu être regroupés sur les 12 chromosomes du riz que grâce à l'utilisation d'une série complète de trisomiques (Khush *et al.*, 1984). L'addition de 100 nouveaux marqueurs (Mc Couch et Tanksley, 1991) n'a pas permis de réduire sensiblement le nombre de groupes de liaison dans ce croisement et il n'est pas évident qu'un autre croisement parmi des variétés d'*O. sativa* puisse être plus satisfaisant de ce point de vue sauf en utilisant un nombre de plantes F2 beaucoup plus important.

La distribution des marqueurs RFLP sur la carte génétique du riz soulève un problème intéressant car, comme le montre aussi la carte RFLP de la tomate, avec plus de 1 000 marqueurs, il existe des groupes de marqueurs en liaison étroite (« Linkats »), par rapport à des zones de recombinaisons plus élevées qui apparaissent sans marqueurs (Tanksley, 1991). Seule la

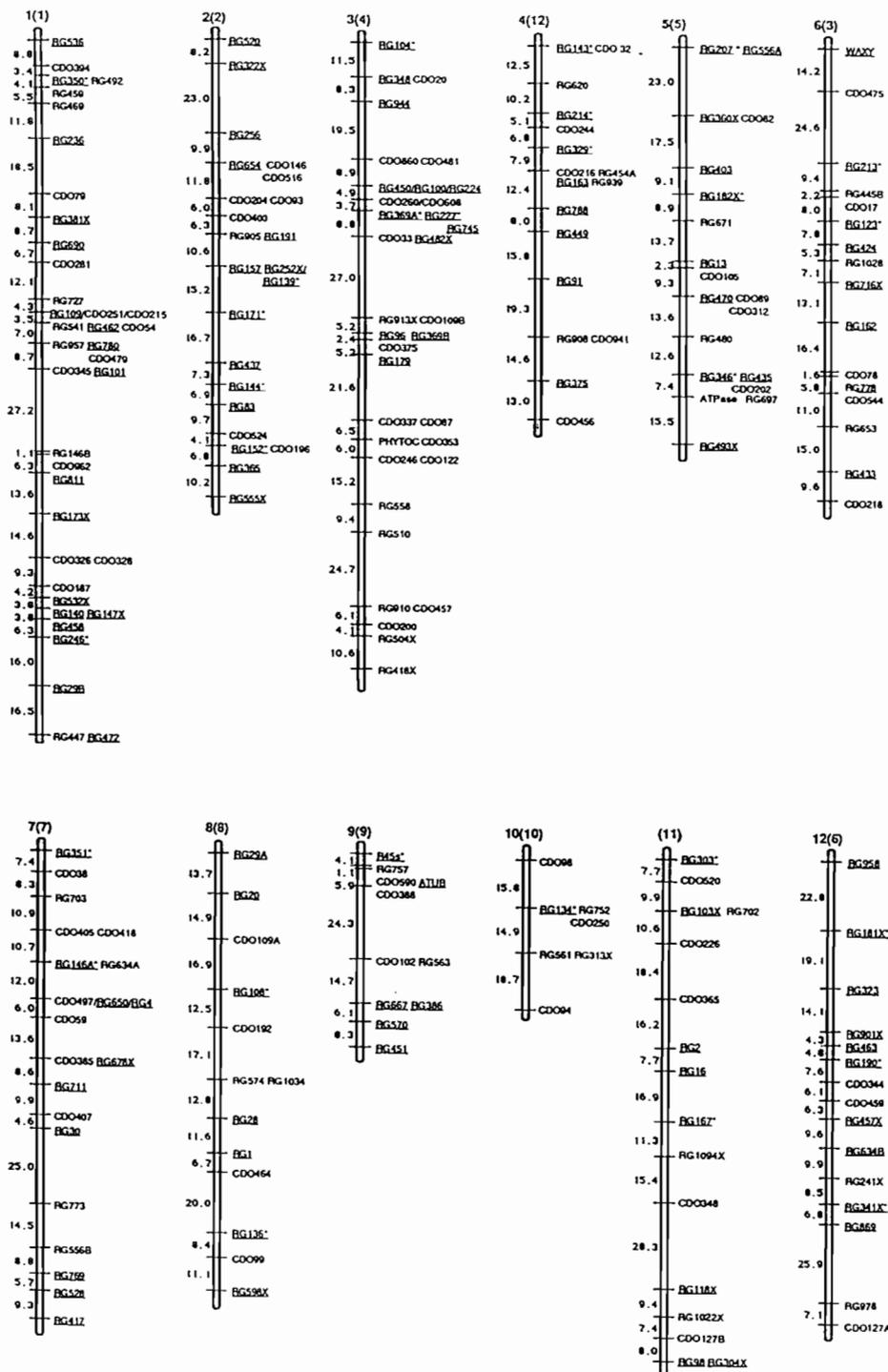
comparaison des cartes génétiques et physiques permettra de vérifier cette variation présumée des taux de recombinaison génétique le long des chromosomes ; néanmoins, chez le riz, nous pouvons aussi prédire qu'un autre facteur se surajoute pour rendre compte de l'irrégularité des marqueurs sur les chromosomes. En effet, comme nous l'avons vu (Charrier et Second, ce volume), la structure de la diversité génétique d'*O. sativa* est liée à une domestication indépendante des sous espèces *indica* et *japonica* à partir d'ancêtres sauvages différents suivie d'introgessions réciproques de segments chromosomiques entre ces variétés ancestrales. On doit donc s'attendre à ce que la divergence de deux variétés cultivées soit variable le long des chromosomes, selon que les segments chromosomiques considérés ont des ancêtres sauvages différents ou au contraire ont un ancêtre commun depuis la domestication à la suite des introgessions réciproques. Si cela est vrai, la distribution des marqueurs polymorphes (c'est-à-dire les seuls qui peuvent être potentiellement cartographiés) sera variable le long des chromosomes. L'existence de ces cartes permettra sous peu de vérifier cette hypothèse.

C'est sur la base de ces considérations que nous avons proposé de poursuivre le développement de la carte génétique du riz à partir d'un croisement entre riz sauvage et cultivé. Nous avons sélectionné une population issue d'un back cross interspécifique (*O. sativa* x *O. longistaminata*) x *O. sativa* pour les raisons suivantes :

- les études cytogénétiques montrent une méiose normale chez les hybrides interspécifiques *O. sativa* x *O. longistaminata* (génome A du groupe multispécifique *Sativa*) (Nayar, 1973).
- les études de ségrégation de 9 marqueurs isozymiques dans les back cross interspécifiques montrent des ségrégations régulières malgré la stérilité pollinique très forte de ces hybrides (Ghesquière, 1988).
- le taux de polymorphisme attendu est très élevé compte tenu de la distance génétique élevée séparant les deux espèces (Second, 1985).
- la pérennité d'*O. longistaminata* permet de compter sur une conservation végétative plus facile de la population back cross cartographiée.

Cent dix huit plantes BC1 ont été retenues et ont servi dans un premier temps à transférer 100 marqueurs de la carte de Mc Couch *et al.* (1988) ; ensuite, une librairie de cDNA d'avoine a été utilisée pour porter la carte à plus de 200 marqueurs sur 12 groupes de liaison (Figure 1) (Causse et Tanksley, ce volume). Comparativement à la première carte, les distorsions

Fig. 1. — Carte génétique du riz établie sur un back cross interspécifique (*O. sativa* x *O. longistaminata*) x *O. sativa* (Causse et Tanksley, ce volume). La numérotation des chromosomes suit la nouvelle nomenclature adoptée à l'IRRI en mai 1990 et l'ancienne identification définie par Khush *et al.* (1984) est indiquée entre parenthèses. Plus de 200 marqueurs sont placés sur 12 groupes de liaisons correspondant aux 12 chromosomes de riz avec l'identification suivante : RG indique les marqueurs d'une banque génomique de riz et CDO les marqueurs d'une librairie de cDNA d'avoine. Les sondes qui hybrident avec 2 bandes majeures ou plus sont signalées par X si un seul locus a été cartographié ou par A et B si 2 loci ont été cartographiés. Les marqueurs communs entre cette carte et la première carte développée par Mc Couch *et al.* (1988) sont soulignés et une astérisque indique les marqueurs placés sur leurs chromosomes grâce aux trisomiques. Cinq gènes identifiés ont été placés sur cette carte : waxy, phytochrome (phyto), atubuline (atub), ATPase, r45s. La distance entre les marqueurs est indiquée en centimorgan sur la gauche des chromosomes et les marqueurs dont la position n'a pas une probabilité supérieure à 99 % sont placés à côté du marqueur le plus proche. La cartographie de cette population back cross se poursuit et fait appel à la technique des RAPD pour combler les segments sans marqueurs lorsqu'ils dépassent 5 cM avec pour objectif de publier cette carte dès qu'elle atteindra 500 marqueurs (Causse *et al.*, en préparation).



de ségrégations n'étaient pas plus importantes et la plupart des marqueurs se retrouvaient sur les mêmes chromosomes avec la même disposition, même si une diminution assez forte des distances (25 %) entre marqueurs était observée (Causse et Tanksley, ce volume). Près de 500 marqueurs sont maintenant positionnés sur la carte génétique obtenue avec cette population BC1 ; ils sont regroupés en 12 groupes de liaison correspondant aux 12 chromosomes du riz. Les segments de chromosomes sans marqueurs et qui dépassent 5 cM seront comblés en utilisant une méthode nouvelle consistant à regrouper les plantes en ségrégation qui présentent les marqueurs parentaux encadrant le segment cible ; des RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) seront recherchés alors entre ces marqueurs et utilisés comme sondes pour la cartographie (Tanksley *et al.*, 1991). Les télomères sont également en cours de cartographie grâce aux techniques d'électrophorèse en champ pulsé et à une sonde télomérique d'*Arabidopsis thaliana* (Tanksley *et al.*, 1991). La population de plantes rétrocroisées, les parents et l'hybride F1 sont préservés par multiplication végétative en quatre points différents (Universités Cornell et Athens aux USA, ORSTOM à Montpellier et IRRI aux Philippines). Il y a donc tout lieu de penser que cette carte conservera au moins pendant quelque temps un rôle de référence.

La seule autre carte du riz avec seulement 12 groupes de liaison est en cours de développement au Japon, à partir d'un croisement entre variétés *indica* et *japonica* d'*O. sativa*. Soixante-dix sondes ont été échangées réciproquement entre les deux équipes (Tanksley et Saito, comm. pers.) et permettront l'alignement des deux cartes tout en augmentant le nombre de marqueurs sur chacune. Par ailleurs, la carte du riz cultivé a été partiellement transférée aux espèces *O. officinalis* (génome CC) et *O. latifolia* (génome CCDD) (Jena et Kochert, 1991 ; Jena *et al.*, 1991 ; Kochert, comm. pers.).

L'apport de la cytogénétique sera également déterminant dans l'établissement des cartes : un ensemble de 14 trisomiques secondaires représentant les 12 chromosomes de riz a été isolé à partir de la série de trisomiques primaires établie par Khush *et al.* (1984) ; ces trisomiques secondaires ont le stock chromosomique normal plus un iso-chromosome supplémentaire, ils seront d'une grande utilité pour orienter les groupes de linkage et placer les centromères sur la carte génétique RFLP (Khush *et al.*, 1991).

Utilisation des cartes génétiques du riz

Parmi les utilisations potentielles des cartes génétiques, on peut distinguer d'une part le marquage sur les chromosomes des gènes d'intérêt agronomique avec pour objectif le clonage de ces gènes ou l'emploi des marqueurs pour faciliter et accélérer le transfert des caractères utiles dans les programmes de sélection après croisement (Tanksley *et al.*, 1988). Ce travail est basé sur l'utilisation de lignées isogéniques et a déjà été entrepris avec succès pour plusieurs gènes : on peut citer comme exemple un gène de sensibilité à la photopériode (Mackill *et al.*, 1990), des gènes de résistance à la pyriculariose (Yu *et al.*, 1991), ainsi qu'à une bactériose (*Xanthomonas oryzae* — gène Xa21) pour lequel une marche sur le chromosome a été entreprise à partir d'une banque de chromosomes artificiels de levure (Ronald *et al.*, 1991). D'autre part les marqueurs moléculaires peuvent être aussi d'un grand intérêt pour caractériser les ressources génétiques et aborder le niveau

moléculaire de la diversité allélique des caractères agronomiques. Nous nous limiterons aux aspects qui concernent directement l'utilisation et l'évaluation des ressources génétiques.

Les marqueurs cartographiés et l'évaluation de la diversité génétique

Plus important que de permettre une égale distribution sur le génome des marqueurs analysés (ce que l'on peut assurer en utilisant un grand nombre de marqueurs), l'utilisation de marqueurs cartographiés doit théoriquement permettre la mise en évidence directe des introgressions. Or, nous avons vu (Charrier et Second, ce volume) l'importance des hybridations introgressives dans l'évolution des riz sauvages et cultivés. C'est dans cette optique que l'un de nous poursuit la caractérisation d'une collection de riz cultivés à l'Institut International de Recherche sur le Riz (IRRI) aux Philippines. Un total de 600 variétés a été sélectionné : pour moitié, elles représentent une collection mondiale de variétés traditionnelles choisies par J.C. Glaszmann et M. Bonman sur la base de leur classification en groupes isoenzymatiques (Glaszmann, 1987) et de leur origine géographique et agro-écologique diverse ; ces variétés sont en cours de caractérisation au champ pour leur comportement agronomique, leur résistance aux parasites ainsi qu'à différents stress biotiques et abiotiques. L'autre moitié de cet échantillonnage représente des variétés d'intérêt particulier pour les sélectionneurs : variétés les plus performantes cultivées sur de grandes surfaces dans chaque type d'écosystème, variétés élites issues des programmes de sélection ou encore sources bien identifiées de résistance ou de caractéristiques particulières (qualité de grain, etc...). Le pedigree d'un bon nombre de ces variétés améliorées est connu, et certaines d'entre elles sont issues de croisements entre sous-espèces *indica* et *japonica*. Environ 50 marqueurs (isozymes, RFLP, RAPD) seront caractérisés sur l'ensemble de ces 600 variétés pour aboutir après élimination des accessions redondantes à un sous-ensemble représentatif d'une centaine de variétés. Deux cents marqueurs comportant des marqueurs RFLP cartographiés, des séquences répétées, ainsi que des marqueurs chloroplastiques et mitochondriaux seront ensuite analysés.

Cette étude devrait donner une vue d'ensemble de la diversité génétique des riz cultivés et mettre en évidence les effets génétiques qui ont accompagné la domestication et la sélection moderne. Si ces effets sont réellement importants, les phénomènes introgressifs entre sous-espèces *indica* et *japonica* pourront être mis en évidence beaucoup plus clairement et permettre une classification encore plus précise des variétés de riz cultivés. Un autre retentissement attendu du point de vue ressources génétiques sera de permettre une réduction significative du nombre d'accessions conservées tout en garantissant une diversité génétique élevée. Une approche similaire est également entreprise pour la caractérisation des riz sauvages et l'étude des relations phylogénétiques des espèces du genre *Oryza*.

La cartographie des gènes d'intérêt agronomique en relation avec l'évaluation des ressources génétiques

L'évaluation de la diversité génétique au travers des marqueurs moléculaires présente la limitation inhérente à l'étude de marqueurs généralement adaptativement neutres alors que l'on cherche à évaluer la diversité intéressante sur le plan agronomique. Il y a tout lieu de penser qu'une corrélation étroite existe sur le plan quantitatif entre les deux types de diversité, neutre

et adaptative (les marqueurs moléculaires traçant la phylogénie au cours de laquelle les gènes d'intérêt agronomique ont été sélectionnés dans des milieux différents), néanmoins, on peut envisager certaines situations où l'estimation du polymorphisme neutre peut ne pas renseigner valablement sur le polymorphisme d'intérêt agronomique :

Une espèce allogame comme *O. longistaminata* qui peut développer des peuplements très importants est susceptible de montrer un polymorphisme neutre élevé (effectif efficace élevé pendant de nombreuses générations) ; celui-ci est effectivement vérifié sur le plan marqueurs moléculaires (Ghesquière, 1988 ; Leblanc *et al.*, ce volume) mais on sait par ailleurs que cette espèce ne montre pas une forte variabilité intraspécifique sur le plan agromorphologique. Il peut également s'agir d'une difficulté à évaluer agronomiquement les espèces sauvages allogames par rapport aux espèces autogames.

Au contraire, chez une espèce autogame et à plus forte raison si elle a été domestiquée, le faible taux efficace de reproduction peut être compensé par l'effet direct de la sélection de mutations favorables au cours de la domestication, ou de l'amélioration.

La possibilité de pouvoir analyser la diversité allélique de gènes d'intérêt agronomique cartographiés, ou encore mieux clonés, devrait permettre d'avancer significativement dans ce domaine. On peut se référer par exemple au travail effectué sur l'amplification d'un gène de résistance aux insecticides chez le moustique qui montre que, quelle que soit l'origine géographique des moustiques sur plusieurs continents, ils présentent le même gène amplifié alors que les séquences environnantes sont diversifiées (Raymond, 1991). L'analyse des gènes de photopériodisme chez le riz, en cours à l'IRRI devrait être instructive à ce sujet. L'analyse de la variabilité moléculaire des parasites à relier avec leur pouvoir pathogène permettra également d'aborder sur le plan moléculaire les relations hôtes-parasites (diversité génétique chez une plante hôte d'une résistance donnée).

Un autre modèle intéressant sera le décryptage du déterminisme des caractères qui sont particuliers à certaines variétés cultivées et qui n'existent pas chez les riz sauvages, telles que les caractéristiques de taille et qualité des grains, ou encore celles du système racinaire, particulièrement développé chez les riz pluviaux africains par exemple. Le déterminisme de ces caractères peut être lié à une ou des mutations (c'est sans aucun doute le cas du caractère gluant — waxy — du grain), mais aussi à des transgressions génétiques liées à des combinaisons originales entre gènes provenant d'espèces ou sous-espèces différentes. A ce point de vue, plusieurs croisements en cours d'étude à l'IRRI permettent de confirmer que des transgressions génétiques, comme elles ont été suggérées par Arraudeau (1975), sont fréquentes dans les recombinaisons entre variétés *indica* et *japonica*. Ces croisements concernent des lignées obtenues au bout de 6 générations SSD (Single Seed Descent) ou des lignées haploïdes doublées obtenues dans des croisements entre variétés *indica* et *japonica* (Mc Couch *et al.*, 1989) et pour lesquelles l'analyse au niveau des marqueurs RFLP a été entreprise.

Caractérisation des introgressions dans les croisements éloignés

Les marqueurs RFLP donnent également les moyens de suivre les introgressions dans les descendance issues d'hybridations éloignées qui mettent en jeu des espèces sauvages possédant d'autres génomes (génomes B, C, BC,

CD, E et F tels qu'ils ont été définis au niveau des appariements chromosomiques ; Nayar, 1973). Un programme de croisements entre le riz cultivé, *O. sativa* (génomme A), et ces espèces sauvages éloignées incluant des espèces tétraploïdes a été entrepris à l'IRRI (Brar *et al.*, 1991). Ces espèces font l'objet d'un grand intérêt d'une part parce qu'elles constituent des sources de gènes de résistance à des parasites et d'autre part parce que les techniques de sauvetage d'embryons par culture *in vitro* sont maintenant bien maîtrisées et permettent d'obtenir des hybrides interspécifiques qui peuvent être ensuite recroisés.

Croisements entre génomes

Deux cas d'hybridations entre génomes cytogénétiquement différents ont pour l'instant été caractérisés au niveau moléculaire : les introgressions à partir d'*O. officinalis* (génomme C) et celles à partir d'*O. brachyantha* (génomme F) ; les croisements avec *O. officinalis* ont été motivés principalement par la recherche de résistance à une cicadèle (*Nilaparvata lugens*) vectrice d'un virus (Tungro) ; des croisements ont été réalisés entre 2 lignées d'*O. sativa* et 5 souches d'*O. officinalis*. Cinquante deux lignées d'introgressions à 24 chromosomes (BC2F8) ont été analysées pour 174 marqueurs RFLP couvrant tous les chromosomes et approximativement tous les 10 cM (Jena *et al.*, 1991) ; 28 segments de chromosomes d'*O. officinalis* ont été identifiés dans une ou plus de ces lignées et concernent 11 des 12 chromosomes ; ces fragments introgressés ne portent qu'un marqueur, suggérant leur petite taille mais ne semblent pas être plus petit comparativement aux plantes de la génération BC2F3 ; la grande dispersion et la petite taille des fragments d'introgressions semblent difficilement compatibles avec les possibilités d'observation des appariements chromosomiques au cours de la méiose F1 ; aussi, Jena *et al.* (1991) concluent qu'un mécanisme autre que le crossing over doit être à l'origine de ces introgressions à moins que la fréquence des appariements ne représente pas valablement la fréquence des recombinaisons génétiques.

D'une manière différente, l'analyse RFLP des introgressions avec *O. brachyantha* a concerné directement la seconde génération de recroisement avant toute sélection pour le caractère cible et l'aspect agronomique des plantes. Cette étude a été couplée à une analyse cytogénétique du matériel et 16 plantes BC2 possédant de 25 à 30 chromosomes ont été étudiées pour 34 marqueurs RFLP (Panaud, ce volume) : de nombreux fragments caractéristiques d'*O. brachyantha* sont mis en évidence même en excluant les situations aneuploïdes à $2n + 1$ chromosomes ; ces fragments sont observés parmi toutes les plantes et concernent tous les chromosomes, leur apparition peut être interprétée par des modèles de crossing over simples ou doubles entre les chromosomes des génomes A et F (Panaud, ce volume). Comme dans l'exemple précédent, ces résultats semblent contradictoires avec les possibilités d'appariements à la méiose ; néanmoins, Panaud *et al.* (1992) suggèrent que le déroulement de la méiose pourrait être différent dans ces hybrides F1 et nécessiterait des observations à un stade plus précoce (pachytène) pour mettre réellement en évidence les possibilités de recombinaisons. La création d'une série complète de lignée d'addition à partir d'*O. brachyantha* est en cours et les recroisements sont poursuivis pour évaluer le matériel vis-à-vis d'une résistance à des lépidoptères foreurs des tiges de riz.

Hybridations interspécifiques avec O. longistaminata

Bien qu'au sein du même groupe multispécifique *Sativa* (génomme A), les hybridations entre *O. sativa* et *O. longistaminata* s'apparentent à des croisements éloignés : distance génétique très grande et forte barrière reproductrice nécessitant pratiquement toujours la culture des embryons pour obtenir les hybrides F1.

La variabilité moléculaire d'*O. longistaminata* représente sur le plan quantitatif l'équivalent de celle des formes asiatiques d'*O. rufipogon* et donc un réservoir potentiel de variabilité d'autant plus intéressant que cette espèce n'a pas été concernée par la domestication du riz en Afrique (Ghesquière, 1988). Alors que l'on sait que les introgressions avec les espèces sauvages ont été déterminantes dans l'origine de la diversité génétique du riz cultivé asiatique (Second, 1982), le fonctionnement de ces introgressions à partir d'*O. longistaminata* est resté très limité sur le continent africain ; ceci peut être expliqué par la liaison stricte entre le gène de barrière reproductrice présent chez *O. longistaminata* et ceux gouvernant l'expression des rhizomes ; cette liaison a pour effet de limiter fortement les possibilités de développement de populations adventices qui pourraient être une source de flux de gènes vers les riz cultivés (Ghesquière, 1990). Au niveau de la variabilité d'intérêt agronomique de cette espèce, peu de choses ont encore été exploitées pour l'instant : on peut citer le transfert des caractères d'allogamie sur des lignées mâles stériles pour améliorer la production de semences hybrides (Taillebois et Guimaraes, 1987) et plus récemment le transfert d'un gène de résistance à large spectre (Xa21) vis-à-vis de plusieurs souches de *Xanthomonas oryzae* (Khush *et al.*, 1990). D'autre part, les hybridations interspécifiques entre *O. sativa* et les espèces possédant d'autres génomes nécessitent encore la culture des embryons pour obtenir les premières générations de croisements ; au contraire, les phénomènes de barrières reproductives et de stérilité dans les croisements issus des hybridations avec *O. longistaminata* sont nettement moins prononcés et permettent d'envisager une utilisation plus complète de la diversité génétique de ce pool secondaire ; c'est ainsi que des populations artificielles issues de back cross interspécifiques sur *O. sativa* peuvent être créées et permettre des brassages génétiques importants à l'origine d'une nouvelle variabilité (Causse et Ghesquière, 1990).

Le modèle représenté par *O. longistaminata* et l'existence de cartes de marqueurs permet d'envisager de manière plus réaliste l'accès à une diversité génétique large et de tester le concept de ressources génétiques qui ne seraient pas limitées seulement au transfert de caractères agronomiques directement évaluables. Dans cet objectif, 13 souches d'*O. longistaminata* représentatives de la variabilité écogéographique de cette espèce et impliquées dans des croisements interspécifiques ont été étudiées pour leur variabilité RFLP sur 39 sondes. Un polymorphisme très important est observé parmi toutes ces souches et met en évidence pour 29 de ces sondes des marqueurs diagnostiques de la lignée d'*O. sativa* entrant dans la composition de l'hybride F1 utilisé (Leblanc *et al.*, ce volume). Une population BC1F2 a été mise en place et constitue un matériel largement diversifié en recombinaisons provenant d'*O. longistaminata* ; cette population fournit un matériel de choix pour étudier les recombinaisons entre les deux espèces et rechercher des marqueurs de l'expression des rhizomes.

Bibliographie

- ANDRÉ C.P., NARAYANAN K.K. and V. WALBOT, 1991 — Pulsed field gel analysis of rice mitochondrial genomes. *Molecular mapping of the rice genome*. Fifth annual meeting of the Rockefeller foundation international program on rice biotechnology. Tucson, Arizona. USA. October 2-5 1991. Abstracts : p 149.
- ARRAUDEAU M., 1975 — Réflexions sur le choix des géniteurs et sur certaines voies d'obtention de variétés nouvelles chez le riz (*O. sativa* L.). *Agron. Trop.*, 30 (1) : 8-18.
- ARUMUGANATHAN K. and E.D. EARLE, 1991 — Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Reporter*, 9 (3) : 208-218.
- BRAR D.S., KHUSH G.S., MULTANI D.S., DALMACIO R., ELLORAN R., DE LOS REYES B., PANAUD O., VIRTUCIO J. and L.A. SITCH, 1991 — *Wide hybridization and alien gene transfer in rice*. Fifth annual meeting of the Rockefeller foundation international program on rice biotechnology. Tucson, Arizona. USA. October 2-5 1991. Abstracts : p 100-101.
- CAUSSE M. and A. GHESQUIÈRE, 1990 — Prospective use of *Oryza longistaminata* for rice breeding. In Proc. 2nd Intern. Rice Genet. Symp. IRRI, Los Banos, Philippines. may 14-18, 1990. (in press).
- DESHPANDE V.G. and P.K. RANJEKAR, 1980 — Repetitive DNA in three Gramineae species with low DNA content. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 361 (8) : 1223-1233.
- GHESQUIÈRE A., 1988 — Diversité de l'espèce sauvage de riz, *Oryza longistaminata* A. Chev. & Roehr et dynamique des flux géniques au sein du groupe *Sativa*. Thèse Doct. ès-Sciences, Univ. Paris-Sud, Orsay. 228 pp.
- GHESQUIÈRE A., 1990 — Reexamination of the genetic control of the reproductive barrier between *Oryza longistaminata* and *O. sativa* and relationship with the rhizome expression. In Proc. 2nd Intern. Rice Genet. Symp. IRRI, Los Banos, Philippines. may 14-18, 1990 (in press).
- GLASZMANN J.C., 1987 — Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theor. Appl. Genet.*, 74 : 21-30.
- HIRAI A., IWAHASHI M., SUGINO K., KANNO A. and T. ISHIBASHI, 1990 — Structure of cytoplasmic genomes in rice. In Proc. 2nd Intern. Rice Genet. Symp. IRRI, Los Banos, Philippines. may 14-18, 1990. (in press).
- HIRATSUKA J., SHIMADA H., WHITTIER R., ISHIBASHI T., SAKAMOTO M., MORI M., KONDO C., HONJI Y., SUN C.R., MENG B.Y., LIY O., KANNO A., NISHIWASA Y., HIRAI A., SHINOZAKI K., SUGIURA M., 1989 — The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome : intermolecular recombination between tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol. Gen. Genet.*, 217 : 185-194.
- JENA K.K. and G. KOCHERT, 1991 — Restriction fragment length polymorphism analysis of CCDD genome species of the genus *Oryza* L. *Plant. Mol. Biol.*, 16 : 831-839.
- JENA K.K., KHUSH G.S. and G. KOCHERT, 1991 RFLP analysis of rice (*Oryza sativa* L.) introgression lines. *Theor. Appl. Genet.*, (Submitted).
- KHUSH G.S., SINGH R.J., SUR S.C. and A.L. LIBROJO, 1984 — Primary trisomics of rice : origin, morphology, cytology and use in linkage mapping. *Genetics*, 107 : 141-163.
- KHUSH G.S., BACALANGCO E. and T. OGAWA, 1990 — A new gene for resistance to bacterial blight from *O. longistaminata*. *Rice Genet. Newslet.*, 7 : 121-122.

- KHUSH G.S., BRAR D.S., MULTANI D.S. and A. SANCHEZ, 1991 — *Secondary trisomics and linkage mapping in rice*. Fifth annual meeting of the Rockefeller foundation international program on rice biotechnology. Tucson, Arizona, USA. October 2-5, 1991. Abstracts : p 6.
- KINOSHITA T., 1984 — Gene analysis and linkage map. *In Biology of rice*. S. Tsunoda and N. Takahashi (eds). Japan Sci. Soc. Press. Tokyo. Elsevier, Amsterdam : 187-274.
- Mc COUCH S.R., KOCHERT G., YU Z.H., WANG Z.Y., KHUSH G.S. COFFMAN W.R. and S.D. TANKSLEY, 1988 — Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.*, **76** : 815-829.
- Mc COUCH S.R., GUIDERDONI E., COURTOIS B. and S.D. TANKSLEY, 1989 — Evaluation of an anther culture-derived doubled haploid population for RFLP mapping. Third annual meeting of the Rockefeller foundation international program on rice biotechnology. St Louis, Missouri, USA. March 8-10, 1989.
- Mc COUCH S.R. and TANKSLEY S.D., 1991 — Development and use of restriction fragment length polymorphism in rice breeding and genetics. *In: Rice Biotechnology*, G.S. Khush and G.H. Toeniessen (eds). Biotechnology in Agriculture. Series 6, CAB and IRRI : 109-133.
- MACKILL D.J., WANG Z.Y. and S.D. TANKSLEY, 1990 — Linkage between an RFLP probe and a photoperiod sensitivity gene. *Rice Genetic Newsletter*, **7** : 145-147.
- NAYAR N.M., 1973 — Origin and cytogenetics of rice. *Adv. Genet.*, **17** : 153-292.
- PANAUD O., BRAR D.S. and G.S. KHUSH, 1991 — Molecular evidence of genetic recombination between cultivated rice *O. sativa* and the wild relative *O. brachyantha*. *J. Hered.* (accepted).
- PHAM J.L., GLASZMANN J.C., SANO R., BARBIER P., GHESQUIERE A. and G. SECOND, 1990 — Isozyme markers in rice : genetic analysis and linkage relationships. *Genome*, **33** : 348-359.
- RAYMOND M., CALLAGHAN A., FORT P. and N. PASTEUR, 1991 — World-wide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature*, **350** : 151-153.
- RONALD P.C., WU K. and S.D. TANKSLEY, 1991 — *Molecular analysis of bacterial blight resistance. Molecular mapping of the rice genome*. Fifth annual meeting of the Rockefeller foundation international program on rice biotechnology. Tucson, Arizona, USA. October 2-5, 1991. Abstracts : p 137.
- SECOND G., 1982 — Origin of the genic diversity of cultivated rice (*Oryza* spp.) : study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. *Jap. J. Genet.*, **57** : 25-57.
- SECOND G., 1985 — Evolutionary relationships in the *Sativa* group of *Oryza* based on isozyme data. *Génét. Sél. Evol.*, **17** (1) : 89-114.
- TAILLEBOIS J. et E. GUIMARAES, 1987 — Obtention chez le riz de lignées femelles permettant une production économique de semences hybrides. *Agron. Trop.*, **42** (2) : 121-125.
- TANKSLEY S.D., 1991 — *Molecular characterisation of the tomato nuclear genome*. Third International Congress of Plant Molecular Biology. Tucson, Arizona, USA. October 6-11, 1991. Abstracts.
- TANKSLEY S.D., YOUNG N.D., PATERSON A.H. and M.W. BONIERBALE, 1988 — RFLP mapping in plant breeding — New tools for an old science. *Biotechnology*, **7** : 257-264.
- TANKSLEY S.D., AHN N., CAUSSE M., CHUNGWONGSE J., FULTON T., RONALD P., SECOND G., WU K., YU Z., WANG Z. and J. XIAO, 1991 — *Molecular mapping of the rice genome*. Fifth annual meeting of the Rockefeller foundation international program on rice biotechnology. Tucson, Arizona, USA. October 2-5, 1991. Abstracts : p 3-4.

- WU K.S., GLASZMANN J.C. and G.S. KHUSH, 1988 — Chromosomal location of ten isozyme loci in rice (*Oryza sativa* L.) through trisomic analysis. *Bioch. Genet.*, **26**: 303-320.
- YANO M., SAITO A., KAWASE M., KISHIMOTO N., NAGAMINE T., KATSUBA M., NAKAGHARA M., YOSHIMURA S., YOSHIMURA A. and N. IWATA — Towards the integration of a restriction fragment length polymorphism map and conventional genetic map of rice *O. sativa* L. In Proc. 2nd Intern. Rice Genet. Symp. IRRI, Los Banos, Philippines. may 14-18, 1990. (in press).
- YU Z.H., MACKILL D.J., BONMAN J.M. and S.D. TANKSLEY, 1991 — Tagging genes for blast resistance via linkage to RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, **81**: 471-476.

Second Gérard, Ghesquière Alain, Causse M., Panaud O.

Contribution au développement et à l'utilisation des cartes génétiques moléculaires en génétique des riz.

In Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes.

Paris (FRA) : Bureau des Ressources Génétiques, 1992, p. 109-121