

Développement de lignées introgressées entre les deux espèces de riz cultivé (*O. sativa* et *O. glaberrima*) au moyen de marqueurs moléculaires cartographiés

A. Ghesquière¹, M. Lorieux¹, G. Second²

¹ORSTOM — LRGAPT, BP 5045, F-34032 Montpellier Cedex 1

²ORSTOM, CP 09747, 70001 970 Brasilia DF, Brésil

Communication présentée au séminaire "Marqueurs Moléculaires et Amélioration des Plantes" organisé par l'INRA, 19-24 mars 1995, Méribel, France.

Résumé

Ce projet a pour but la création assistée par marqueurs d'une centaine de lignées "pseudo-isogéniques", chaque lignée ayant un fond génétique *sativa* et un fragment introgressé *glaberrima* d'environ 20 cM. La totalité des fragments introgressés devra couvrir l'ensemble du génome. La divergence ancienne (2 à 3 Ma) et l'isolement génétique des deux espèces cultivées de riz permet d'attendre un polymorphisme élevé, ce qui fait de ce croisement un matériel idéal pour une étude de cartographie par marqueurs moléculaires (PCR ciblée). La première étape sera la construction d'une carte génétique à base de marqueurs PCR-RFLP, sur la population BC₁. L'obtention des lignées se fera par plusieurs croisements en retour successifs sur le parent *sativa*, en choisissant à chaque étape les lignées dont la configuration allélique pour les marqueurs permet de garder les fragments recherchés. La dernière étape est une fixation par autofécondation. Les intérêts d'une telle approche sont multiples : utilisation en sélection, ressources génétiques expérimentales, étude et fixation des transgressions, approche "QTL" simplifiée et améliorée (fond génétique homogène ; multilocal), organisation du génome de *glaberrima vs sativa* (recombinaisons ; domestication), cartographie comparée.

Mots-clés : lignées introgressées, *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*, cartographie génétique, marqueurs moléculaires, recombinaisons

Introduction

Il existe deux espèces de riz cultivé : *Oryza sativa*, de loin la plus répandue, et *O. glaberrima*, qui n'est cultivée qu'en Afrique de l'Ouest. *O. glaberrima* fut domestiquée dans cette région à partir de l'espèce sauvage annuelle *O. breviligulata* (Second, 1984). Cette domestication se serait faite bien avant l'introduction d'*O. sativa* en Afrique de l'Ouest, qui eut lieu vers le 16^{ème} siècle. Actuellement, *O. glaberrima* tend à être remplacée par *Oryza sativa*, qui, grâce à de longues années de sélection, offre un meilleur rendement, possède un meilleur port, une bonne structure de panicule, etc. Toutefois *O. glaberrima* peut, dans certaines conditions de culture non intensive, offrir de meilleurs rendements qu'*O. sativa*. Cette espèce possède aussi des caractères tels que la résistance à la panachure jaune, à la pyriculariose, ainsi que la tolérance à de nombreux facteurs abiotiques tels que l'acidité, la sécheresse, etc. Il serait donc intéressant de pouvoir introgresser ces caractères dans un fond génétique *sativa*. Jusqu'à présent, les tentatives faites dans ce sens n'ont pas donné de résultats probants, car l'approche conventionnelle adoptée n'est pas appropriée, du fait de la stérilité mâle des hybrides combinée au non contrôle des fécondations qui entraîne la plupart du temps un retour rapide vers des génotypes *sativa*.

Présentation du projet

Ce projet, qui est une collaboration entre l'ORSTOM et l'ADRAO (Côte d'Ivoire), a pour but la création assistée par marqueurs de lignées "pseudo-isogéniques", chaque lignée ayant un fond génétique *sativa* et un fragment introgressé *glaberrima* délimité par deux marqueurs (fig. 1). La totalité des fragments introgressés devra couvrir l'ensemble de la carte génétique. En considérant que la taille du génome est d'environ 2000 cM, il s'agit donc de créer un centaine de lignées comportant chacune un fragment introgressé par backcross successifs d'environ 20 cM. Les lignées obtenues seront multipliées pour une évaluation multilocale.

La première étape du projet est le développement d'une population en ségrégation, à partir d'un croisement en retour sur le parent *sativa*. Vingt-quatre croisements sont actuellement en cours de réalisation, impliquant six parents *glaberrima* et quatre parents *sativa*. Parallèlement, le polymorphisme entre toutes les combinaisons de parents sera évalué pour une centaine de marqueurs PCR-RFLP (STS, sequence tagged sites) couvrant tout le génome. Un seul hybride F₁ sera retenu pour le backcross, sur le critère du polymorphisme mais aussi sur les qualités du parent *glaberrima*.

L'étape suivante est la construction d'une carte génétique à base de marqueurs STS régulièrement répartis sur le génome (espacement moyen de 20 cM), sur la population BC₁ (130 à 150 individus).

La quantité d'analyses nécessaires à la vérification de la présence du fragment-cible à chaque génération de croisement en retour, rend indispensable l'utilisation de marqueurs basés sur la technique PCR. Aussi, une collaboration avec l'équipe de J. Bennett (IRRI, Philippines) a été établie pour obtenir des amorces spécifiques

ORSTOM Documentation



010000527

- 6 JUL. 1995

ORSTOM Fonds Documentaire

N° 41.789 ex 1

Cote : B

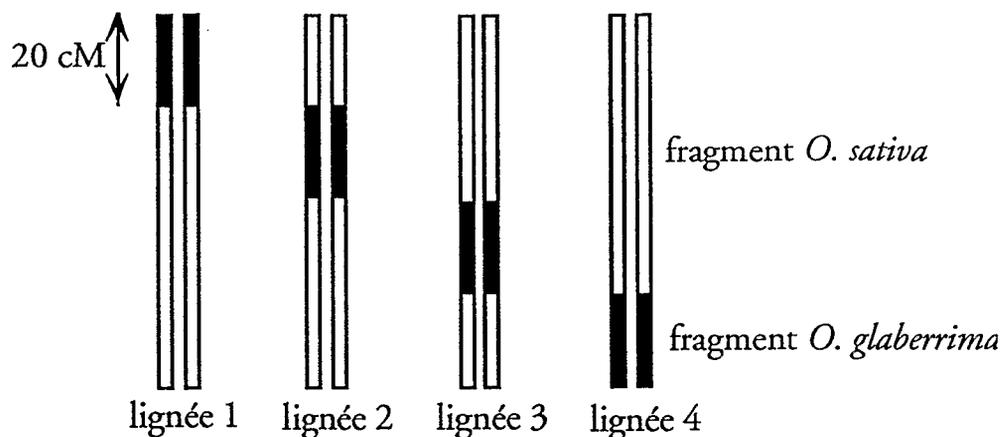


Figure 1. Chaque lignée aura un fond génétique *O. sativa* et un fragment introgressé *O. glaberrima* délimité par deux marqueurs. La totalité des fragments introgressés devra couvrir l'ensemble de la carte génétique (ici, un seul chromosome est représenté).

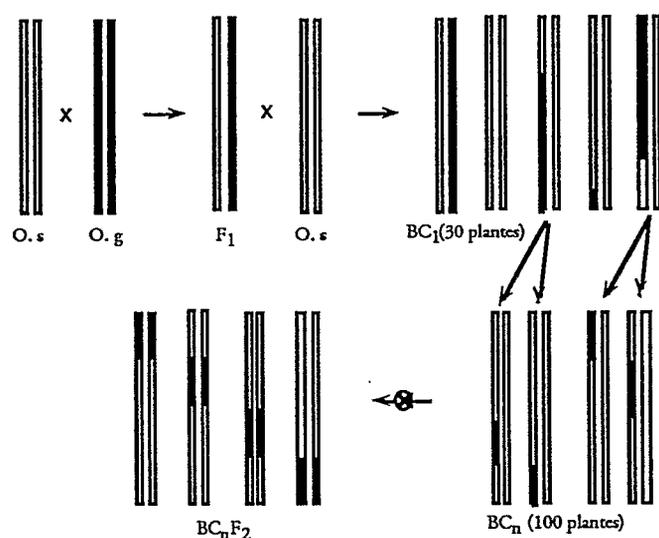


Figure 2. Le croisement initial est réalisé en prenant le parent *O. sativa* comme femelle. Le croisement en retour utilise ensuite le parent *O. sativa* comme mâle. Une trentaine de plantes BC_1 sont choisies dans la descendance, en fonction de leur configuration allélique. Ces plantes sont rétrocroisées avec le parent *O. sativa*, et 7 – 8 plantes BC_2 sont analysées pour les 4 marqueurs encadrant les fragments intéressants portés par les plantes BC_1 . Les plantes BC_2 retenues sont rétrocroisées, et 7 – 8 plantes BC_3 sont analysées pour les 2 marqueurs encadrant les fragments intéressants portés par les plantes BC_2 . Le rétrocroisement est répété jusqu'à la génération BC_4 , ou BC_5 puis les plantes sont autofécondées. Le linkage drag éventuel est éliminé par un nouveau rétrocroisement.

permettant d'amplifier par PCR des portions du génome qui correspondent à des sondes RFLP localisées sur la carte de Cornell (Causse *et al.*, 1994 ; Ghareyazie *et al.*, 1993 ; Villareal *et al.*, comm. pers.). D'autre part, l'équipe du RGP (Japon) a publié d'autres séquences comparables utilisables dans ce projet et localisées sur la carte japonaise (Inoue *et al.*, 1994 ; Kurata *et al.*, 1994). D'autres marqueurs (AFLP – RFLP – RAPD – microsatellites) pourront être utilisés pour couvrir les zones non polymorphes.

L'obtention des lignées se fera par plusieurs croisements en retour successifs sur le parent *sativa*, en choisissant à chaque étape les lignées dont la configuration allélique pour les marqueurs permet de garder les fragments recherchés. Les lignées seront évaluées pour différents caractères à chaque génération. À chaque étape du processus de backcross, le matériel génétique peut être fixé par autofécondation, et introduit dans d'autres programmes d'amélioration. À partir de l'étape BC_2 , les plantes seront cultivées et croisées en Côte d'Ivoire (fig. 2).

La dernière étape est une fixation par autofécondation. Un test de fertilité sera effectué à ce moment, et seules les lignées normalement fertiles seront incluses dans le stock de lignées.

Discussion à propos de l'approche

La divergence ancienne (2 à 3 Ma ; Second, 1984) et l'isolement génétique des deux espèces cultivées de riz permet d'attendre un polymorphisme élevé (pas d'introgessions), ce qui fait de ce croisement un matériel idéal pour une étude de cartographie par marqueurs moléculaires (PCR ciblée). Grâce à l'apport du génome *glaberrima*, on peut espérer couvrir certaines zones monomorphes dans les croisements *indica x japonica*. D'autre part, cette carte permettra de faire la liaison entre la carte japonaise et celle de Cornell.

L'un des intérêts majeurs de cette approche est de permettre une comparaison directe des lignées obtenues

avec le parent récurrent, afin d'identifier la variation génétique due à *O. glaberrima* pour tout caractère intéressant. Ainsi, pour chaque lignée et chaque caractère, il sera possible de choisir le nombre d'individus nécessaires à la réalisation d'une analyse de variance simple. Après une première analyse globale avec relativement peu d'individus, par lignée, la puissance de détection peut être facilement augmentée pour un caractère et une lignée particulière. Un autre avantage est la possibilité de travailler en multilocal. D'autre part, contrairement à ce qui se passe dans une analyse de QTL classique, le fond génétique est ici homogène. Cette démarche peut donc constituer une alternative intéressante à l'approche QTL habituelle. Un autre atout est que les lignées qui sont intéressantes peuvent être utilisées directement en sélection. On pourra aussi étudier et fixer des transgressions éventuellement détectées. Notons toutefois que cette approche ne permet pas de détecter les éventuels effets d'épistasie.

Ce projet permettra par ailleurs de faire des ressources génétiques expérimentales, en mimant dans une certaine mesure les introgressions réciproques qui ont eu lieu entre les deux sous-espèces *indica* et *japonica* d'*O. sativa*. On pourra étudier l'organisation du génome d'*O. glaberrima* par rapport à celui d'*O. sativa* (recombinaisons ; domestication).

Résultats préliminaires

Quatre marqueurs STS, correspondant à des sondes génomiques localisées sur la carte japonaise et définis par deux amorces de 20 bases, ont été testés sur deux ou trois parents : des parents *O. sativa* (IR 64 seul ou IR 64 et Azucena) et un parent *O. glaberrima* (Tog 5681). La digestion des amplifications par des enzymes de restriction à 4 bases, a permis de mettre en évidence un polymorphisme entre *O. sativa* et *O. glaberrima* pour G 56, G 104 et G 278 (fig. 3 a, b et c). Lorsqu'aucun polymorphisme avec les enzymes à 4 bases n'était détecté, des pools d'enzymes à 5 ou 6 bases (3 par piste) ont été testés. Pour G 187, cette approche a été tentée avec succès (fig. 3 d). Il reste ensuite à tester les enzymes individuellement.

Références citées

Causse M.A., T.M. Fulton, Y.G. Cho, S.N. Ahn, J. Chunwongse, K. Wu, J. Xiao, Z. Yu, P.C. Ronald, S.E. Harrington, G. Second, S.R. McCouch et S.D. Tanksley. 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics* 138: 1251-1274.

Ghareyazie B., N. Huang, G. Second, J. Bennett et G.S. Khush. 1993. Comparison between PCR-based RFLP and Southern-based RFLP as DNA markers for germplasm classification in rice (*Oryza sativa* L.). *RGN* 10: 129-132.

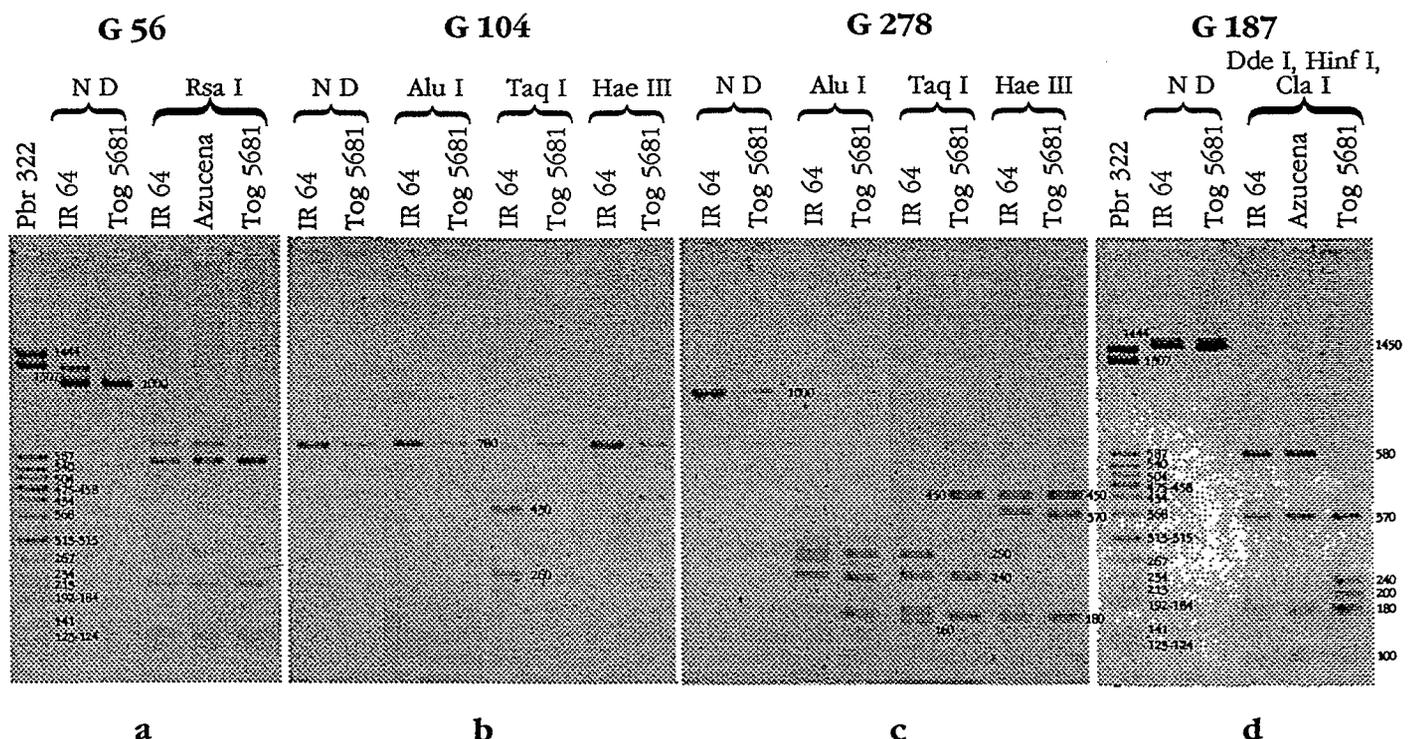


Figure 3. Détection de polymorphisme entre *O. sativa* et *O. glaberrima*. Les enzymes suivantes ont donné du polymorphisme : a. Pour le marqueur G 56, Rsa I. b. Pour le marqueur G 104, Taq I et Hae III. c. Pour le marqueur G 278, Alu I et Taq I. d. Pour le marqueur G 187, un pool d'enzymes Dde I, Hinf I (5 bases) et Cla I (6 bases).

Inoue T., H.S. Zhong, A. Miyao, I. Ashikawa, L. Monna, S. Fukuoka, N. Miyadera, Y. Nagamura, N. Kurata, T. Sasaki et Y. Minobe. 1994. Sequence-tagged sites (STSs) as standard landmarks in the rice genome. *Theor. Appl. Genet.* 89: 728-734.

Kurata N., Y. Nagamura, K. Yamamoto, Y. Harushima, N. Sue, J. Wu, B.A. Antonio, A. Shomura, T. Shimizu, S.-y. Lin, T. Inoue, A. Fukuda, T. Shimano, Y. Kuboki, T. Toyama, Y. Miyamoto, T. Kirihara, K. Hayasaka, A. Miyao, L. Monna, H.S. Zhong, Y. Tamura, Z.-X. Wang, T. Momma, Y. Umehara, M. Yano, T. Sasaki et Y. Minobe. 1994. A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nature Genetics* 8: 365-372.

Second G. 1984. *Relations évolutives chez le genre Oryza et processus de domestication des riz*. Thèse de doctorat d'Etat. Université Paris Sud.

Villareal C.P., A.P. Resurreccion, S.V. Constantino, J.M. Robeniol et J. Bennett. comm. pers. Conversion of RFLP markers to sequence tagged sites for chromosome 1 of rice (*Oryza sativa* L.).