

(Conf. proceed) Luro et al 1994

Techniques et utilisations des marqueurs moléculaires
Montpellier (France), 29-31 mars 1994
Ed. INRA, Paris 1995 (Les Colloques, n°72)

Cartographie du génome des agrumes à l'aide des marqueurs moléculaires et distorsions de ségrégation

F. LURO¹, M. LORIEUX², F. LAIGRET¹, J.M. BOVÉ¹ et P. OLLITRAULT³

¹ laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, INRA Bordeaux, BP 81,
33883 Villenave d'Ornon Cedex

² laboratoire AGETROP, CIRAD, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex

³ CIRAD/FLHOR, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex

Résumé

La cartographie du génome de deux agrumes ($2n = 18$) a été réalisée à partir d'une descendance de 52 individus, issue d'un croisement entre *Citrus grandis* (pamplemoussier "Sans pépins") comme parent femelle et un hybride intergénérique comme parent mâle. Ce dernier découle d'un croisement entre un *Citrus reticulata* (mandarinier "Cléopâtre") et un *Poncirus trifoliata* ("Single"). Différents types de marqueurs moléculaires (une centaine au total) ont été utilisés pour l'établissement de la carte génétique (isoenzymes, RFLP et RAPD).

Une cartographie partielle a été réalisée pour chacun des deux génotypes parentaux, au moyen du logiciel Mapmaker. La carte du génome mâle est composée de 104 marqueurs répartis sur 12 groupes de liaison couvrant 1500 cM (fonction de Haldane). La carte du parent femelle (pamplemoussier) dont le génotype des parents est inconnu, a également été réalisée par Mapmaker, en ayant, toutefois, déterminé préalablement la phase (couplage ou répulsion) à l'aide du logiciel Genepop. La carte résultante, d'une longueur totale de 600 cM, est constituée de 7 groupes de liaison, regroupant 35 marqueurs.

Contrairement à la carte du parent femelle, la carte du parent mâle est caractérisée par un taux élevé de marqueurs présentant une ségrégation non mendélienne (37,5%). Le logiciel Mapmaker ne prenant pas en compte les distorsions de ségrégation, les groupes de liaison établis ont été vérifiés par un test du χ^2 d'indépendance et le calcul des fréquences de recombinaison, tenant compte des distorsions de ségrégation, a été réalisé en utilisant l'estimateur de Bailey. Le groupe de liaison 1 est exclusivement constitué de marqueurs à ségrégation non mendélienne et contient près de la moitié des loci affectés par les distorsions de ségrégation. L'existence de ce groupe de liaison ainsi que l'ordre de certains



Fonds Documentaire IRD
Cote : B*24979 Ex : unique

marqueurs sont confirmés par la carte du parent femelle. De plus, tous les marqueurs du groupe 1 ont subi, chez le mâle, une sélection en faveur du mandarinier "Cléopâtre". Par conséquent, il semblerait que la contre-sélection de ce chromosome découlerait en partie des conséquences d'une hétérozygotie structurale et en partie d'une sélection d'un ou plusieurs allèles. Nous avons également montré que l'ordre des marqueurs, établi par l'estimateur classique (Mapmaker), peut être affecté par les distorsions de ségrégation.

Introduction

Le terme d'agrumes correspond à 3 genres botaniques (*Citrus*, *Poncirus* et *Fortunella*), interfertiles (Iwamasa *et al.*, 1988). L'agrumiculture représente la première production fruitière mondiale, avec 65 millions de tonnes produites en 1990 et son aire de répartition s'étend approximativement entre les 40^e degrés de latitude Nord et Sud, tout autour du globe (Roose, 1988). Les agrumes présentent donc une grande capacité d'adaptation à des conditions pédoclimatiques très différentes ainsi qu'à des pressions parasitaires en constante évolution. Chez tous les agrumes et genres apparentés le nombre de chromosomes de base est $n=9$ (Krug, 1943). La grande majorité des agrumes est diploïde et leur génome est relativement petit (environ $0,4 \cdot 10^9$ pb). L'analyse par cytométrie en flux a permis de mettre en évidence des variations de tailles significatives suivant les espèces (Ollitrault et Michaux-Ferrière, 1992). Celles-ci atteignent 10% entre les mandariniers et les cédratiers (respectivement 0,72 pg et 0,82 pg, soit $3,3 \cdot 10^8$ pb et $3,7 \cdot 10^8$ pb).

L'analyse génétique des croisements, chez les agrumes, se heurte à de nombreuses difficultés dont les principales causes sont: (1) la forte hétérozygotie, (2) l'apomixie partielle (pépins polyembryonnés comportant des embryons d'origine nucellaire et un embryon d'origine zygotique), (3) l'encombrement des descendants et (4) la longueur de la phase juvénile (Frost, 1948). L'évolution des biotechnologies et le développement de nouvelles techniques de marquage moléculaire apportent de nouvelles possibilités d'amélioration génétique des agrumes cultivés. La cartographie du génome qui représente un des volets de ce programme d'amélioration, a été entreprise par plusieurs laboratoires (Durham *et al.*, 1991; Jarrell *et al.*, 1992). Nous avons développé une carte génétique des agrumes, à l'aide de différents types de marqueurs moléculaires (isoenzymes, RFLP et RAPD), dont les principales applications sont:

- l'étude de l'hérédité chromosomique chez les hybrides interspécifiques intergénériques
- l'évaluation du nombre et de l'impact des mutations délétères, ou défavorables, dans les croisements entre espèces polyembryonnées
- la localisation de gènes qui interviennent dans la constitution des caractères intéressants au sens agronomique.

Plus, tous les marqueurs du mandarinier "Cléopâtre". Par conséquent, découlerait en partie de la sélection d'un ou de plusieurs marqueurs, établi par des analyses de ségrégation.

Les agrumes (*Citrus*, *Poncirus* et *Fortunaria*) représente la première culture fruitière en 1990 et son aire de répartition s'étend de la latitude Nord et Sud, tout cela donne une grande capacité de production ainsi qu'à des pressions de sélection apparentées le nombre de gènes majorité des agrumes est de 4.10^9 pb. L'analyse par des méthodes de tailles significatives de gènes -elles-ci atteignent 10% entre 0,82 pg, soit $3,3 \cdot 10^8$ pb et

se heurte à de nombreuses contraintes : (1) l'hétérozygotie, (2) l'apomixie d'origine nucellaire et un cycle de vie long et (4) la longueur de la saison et le développement des fruits. Les possibilités d'amélioration de la production représente un des volets du programme de recherches (Durham *et al.*, 1992; Durheim *et al.*, 1992). Pour la sélection des agrumes, à l'aide de méthodes moléculaires (RFLP et RAPD), dont les applications sur des hybrides interspécifiques et des populations naturelles, sont intéressantes, ou défavorables, dans la compréhension de la constitution des caractères

Les marqueurs liés à ces gènes d'intérêt agronomique, peuvent alors être utilisés comme critère de choix précoce des géniteurs dans des schémas de sélection (de Vienne, 1984; Stuber, 1989). De même, nous pouvons envisager, à long terme, l'utilisation des marqueurs pour l'isolement et le transfert de gènes par génie génétique (Ganal *et al.*, 1991).

Dans la plupart des programmes de cartographie, un nombre variable de marqueurs présente des ségrégations non mendéliennes. Ceux-ci sont parfois écartés de l'analyse afin d'éviter la construction de cartes génétiques biaisées. D'autres fois, ils sont placés sur la carte comme si leur ségrégation était mendélienne, au risque d'aboutir à de fausses conclusions. Il a été démontré, que, dans certaines situations de distorsion de ségrégation, les estimateurs utilisés classiquement pour l'analyse des données de cartographie, c'est-à-dire le test du χ^2 de liaison (Mather, 1957) ou la méthode des rapports de vraisemblances déterminée par le calcul du "Lod score" (Barnard, 1949; Morton, 1955), peuvent être biaisés dans l'estimation de la liaison entre 2 marqueurs et de la fréquence de recombinaison (Lorieux, 1993). Cependant, Bailey (1961) a démontré que dans le cas de la ségrégation de 2 marqueurs liés, dont l'un est seul soumis à une sélection, les estimateurs précédemment cités, ne présentent pas de modifications par rapport à la situation sans distorsion.

Nous présentons ici deux cartes génétiques des agrumes obtenues à partir d'une descendance hybride trois voies, en portant une attention particulière aux distorsions de ségrégation. Les différentes approches analytiques sont discutées en fonction des modèles biologiques sous-jacent.

Matériel et méthodes

Le croisement

Au vu des contraintes biologiques, importantes chez les agrumes, liées au système de reproduction et aux structures du génome (taille variable), l'analyse de populations de type hybride trois voies (un génotype fortement homozygote croisé par un hybride non apparenté, récent) apparaît comme la solution la plus avantageuse pour la réalisation d'une carte de marqueurs moléculaires. Avec ce type de croisement, nous espérons limiter les sélections gamétiques et zygotiques dues à la réunion d'allèles létaux, la dépression de consanguinité et diminuer les risques d'incompatibilité gamétophytique (Perrier *et al.*, 1992). Dans ce cadre l'utilisation de pamplemoussiers comme parent femelle paraît particulièrement intéressante. Ceux-ci sont en effet, monoembryonnés, auto-incompatibles et produisent de nombreux pépins. La descendance étudiée (52 individus) est issue d'un croisement entre *Citrus grandis* (pamplemoussier "Sans pépins") comme parent femelle et un hybride intergénérique comme parent mâle. Ce dernier provient d'un croisement entre un *Citrus reshni* (mandarinier "Cléopâtre") et un *Poncirus trifoliata* ("Single"). Ces trois géniteurs présentent, en cytométrie en flux, des tailles de génome équivalentes. L'hybride

intergénérique a été sélectionné pour les caractères de résistance du *Poncirus* (au froid, à la Tristeza...) et du mandarinier Cléopâtre (Chancre citrique). Un intérêt supplémentaire de ce croisement est que la descendance peut être analysée comme celle d'un testcross pour une majorité de marqueurs. En effet, les pamplemoussiers sont généralement fortement homozygotes, alors que le mâle (hybride intergénérique) est fortement hétérozygote.

Les marqueurs

Une centaine de marqueurs ont été obtenus. Environ la moitié est de type RFLP et provient de deux banques d'ADNc (Luro, 1993). Quarante sondes sont issues d'une banque d'ADNc que nous avons obtenue à partir des ARNm de l'oranger Valencia late (*Citrus sinensis*), et quatre autres nous ont été fournies par le Pr Roose de l'université de Riverside, en Californie (Jarrell *et al.*, 1992).

Sept systèmes isoenzymatiques ont été étudiés : isocitrate déshydrogénase (ICD), malate déshydrogénase (MDH), phosphoglucose isomérase (PGI), endopeptidase (End), leucine aminopeptidase (LAP), aspartate transaminase (GOT) et phosphoglucomutase (PGM). Trois loci isoenzymatiques (LAP, GOT et PGI) sont hétérozygotes chez le pamplemoussier et six (End, PGM, LAP, GOT, ICD et MDH) chez l'hybride intergénérique (mâle).

Le marquage RAPD a été effectué à partir d'un milieu réactionnel d'amplification (25 μ l) comprenant le tampon préconisé par Biolabs additionné d'un détergent anionique (0,05% de W1, BRL), 1ng d'ADN, 0,5 μ M d'amorce (Operon) et 0,75 unité de Taq polymérase (BRL) (Luro *et al.* soumis). L'amplification est réalisée en 40 cycles dans les conditions suivantes: 15 sec à 94°C, 30 sec à 36°C et 60 sec à 72°C. Les résultats de l'amplification sont analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose (1,5%) dans un tampon 0,5X TBE (Tris-borate 45 mM; acide borique 45 mM; EDTA 1mM; pH 8,5) à 6 v/cm. A l'aide de 25 amorces, 46 fragments spécifiques de l'hybride intergénérique (19 chez le mandarinier et 27 chez le *Poncirus*) et 24 fragments spécifiques du génome maternel (pamplemoussier), sont révélés par la technique RAPD et ségrégent dans la descendance. Cette technique de marquage ne prenant en compte que les variations de tailles de fragments amplifiés, nous ne pouvions pas établir directement une correspondance entre loci marqué par RAPD sur les deux cartes génétiques. Pour la comparaison des homologies de séquence une étape supplémentaire d'hybridation moléculaire aurait été nécessaire.

Cartographie

La cartographie a été réalisée au moyen du logiciel Mapmaker (Lander *et al.*, 1987). Plusieurs seuils de *Lod score* (Logarithm of odd ratios) ont été testés pour construire les groupes de liaison. La fonction de cartographie retenue est celle de Haldane (1919). Le calcul des fréquences de recombinaison effectué par le logiciel Mapmaker a été comparé avec celui réalisé à l'aide de l'estimateur de Bailey (1949) qui tient compte des distorsions.

du *Poncirus* (au froid, à la température de 4°C), à l'intérêt supplémentaire de celle d'un testcross pour une liaison qui est généralement fortement détournée par un parent hétérozygote.

La moitié est de type RFLP et les autres sont issues d'une banque de marqueurs de l'orange Valencia late (*Citrus sinensis*) de l'université de Riverside,

l'enzyme de restriction (ICD), l'enzyme de restriction (PstI), l'endopeptidase (End), l'enzyme de restriction (T) et phosphoglucomutase sont hétérozygotes chez le parent et MDH) chez l'hybride

La réactionnel d'amplification par PCR a été réalisé avec l'enzyme Taq (AmpliTaq) et 0,75 unité de Taq (AmpliTaq) dans un volume de 25 µl. La réaction a été réalisée en 40 cycles dans les conditions suivantes : 94°C à 72°C. Les résultats de l'analyse ont été visualisés sur un gel d'agarose (1,5%) dans un tampon TBE (10x; EDTA 1mM; pH 8,5) à l'aide d'un électrophorèse à l'hybride intergénérique (19 marqueurs génétiques du génome maternel) et ont été analysés par électrophorèse dans la descendance. Les tailles de fragments de l'hybride intergénérique concordance entre loci marqués des homologues de séquence nécessaires.

Mapmaker (Lander *et al.*, 1987). Les données ont été testées pour construire les cartes génétiques à l'aide de la fonction de Haldane (1919). Le logiciel Mapmaker a été comparé et tient compte des distorsions

de ségrégation. En effet, on peut montrer que dans la situation qui nous concerne (testcross), cet estimateur possède de bonnes propriétés dans des conditions assez générales (Lorieux, 1994). Dans ce cas, les groupes de liaison ont été établis par un test du χ^2 d'indépendance (Mather, 1957).

Les parents du pamplemoussier (femelle) étant de génotype inconnu, les données concernant la ségrégation des marqueurs hétérozygotes chez ce parent, ont été traitées, dans les mêmes conditions qu'un testcross. Dans un premier temps, pour chaque couple d'allèles ségrégeant, nous avons désigné, alléatoirement, P1 et P2 les parents du pamplemoussier. Ensuite, les liaisons et les fréquences de recombinaison (r) ont été calculées pour chaque couple de marqueurs à l'aide du logiciel Genepop (Ollitrault, 1987). Ce logiciel estime une liaison par le test du χ^2 d'indépendance (Mather, 1957). Ce test tient compte des distorsions de ségrégation car le calcul des effectifs théoriques de chaque classe est basé sur les fréquences marginales du tableau de contingence. Les situations où $r > 0,5$ sont équivalentes à celles d'une inversion allélique. Les marqueurs correspondant, le plus fréquemment, à cette situation, sont recodés en intervertissant la notation des allèles. Ces modifications sont poursuivies jusqu'à l'obtention d'un minimum d'inversion allélique. L'ordonnement des marqueurs n'étant pas réalisable avec ce logiciel, les données "corrigées" sont analysées par Mapmaker.

Résultats - discussion

Cartes génétiques

La différenciation allélique entre les parents du croisement est telle, que pour chaque individu de la descendance, nous avons pu déduire, dans tous les cas, les compositions alléliques des gamètes mâles et femelles pour l'hybride intergénérique (*C. reshni* x *P. trifoliata*). De ce fait, cette descendance a pu être analysée comme celle d'un testcross, pour tous les marqueurs.

La carte du génome de l'hybride intergénérique obtenue avec Mapmaker comporte 95 marqueurs répartis sur 12 groupes de liaison (le nombre chromosomique de base étant $n = 9$) (figure 1). Neuf loci ne sont rattachés à aucun groupe de liaison. La longueur totale de la carte est de 1503 cM (fonction de Haldane), ce qui représente environ les deux tiers de la longueur totale du génome (Jarrell *et al.*, 1992). La carte génétique du pamplemoussier couvre 633,1 cM (fonction de Haldane) avec 7 groupes de liaison et 34 marqueurs (figure 2). Cette carte apparaît donc beaucoup moins complète et dense que celle de l'hybride intergénérique. Le niveau d'homozygotie élevé, du pamplemoussier, est en effet une contrainte pour l'obtention d'un grand nombre de marqueurs hétérozygotes. Ces groupes ont été établis avec un *Lod score* ≥ 3 et une fréquence de recombinaison maximale de 0,3. Cette dernière valeur correspond approximativement à la fréquence maximale détectable pour un backcross de 52 individus. Pour des valeurs inférieures de *Lod score*, les

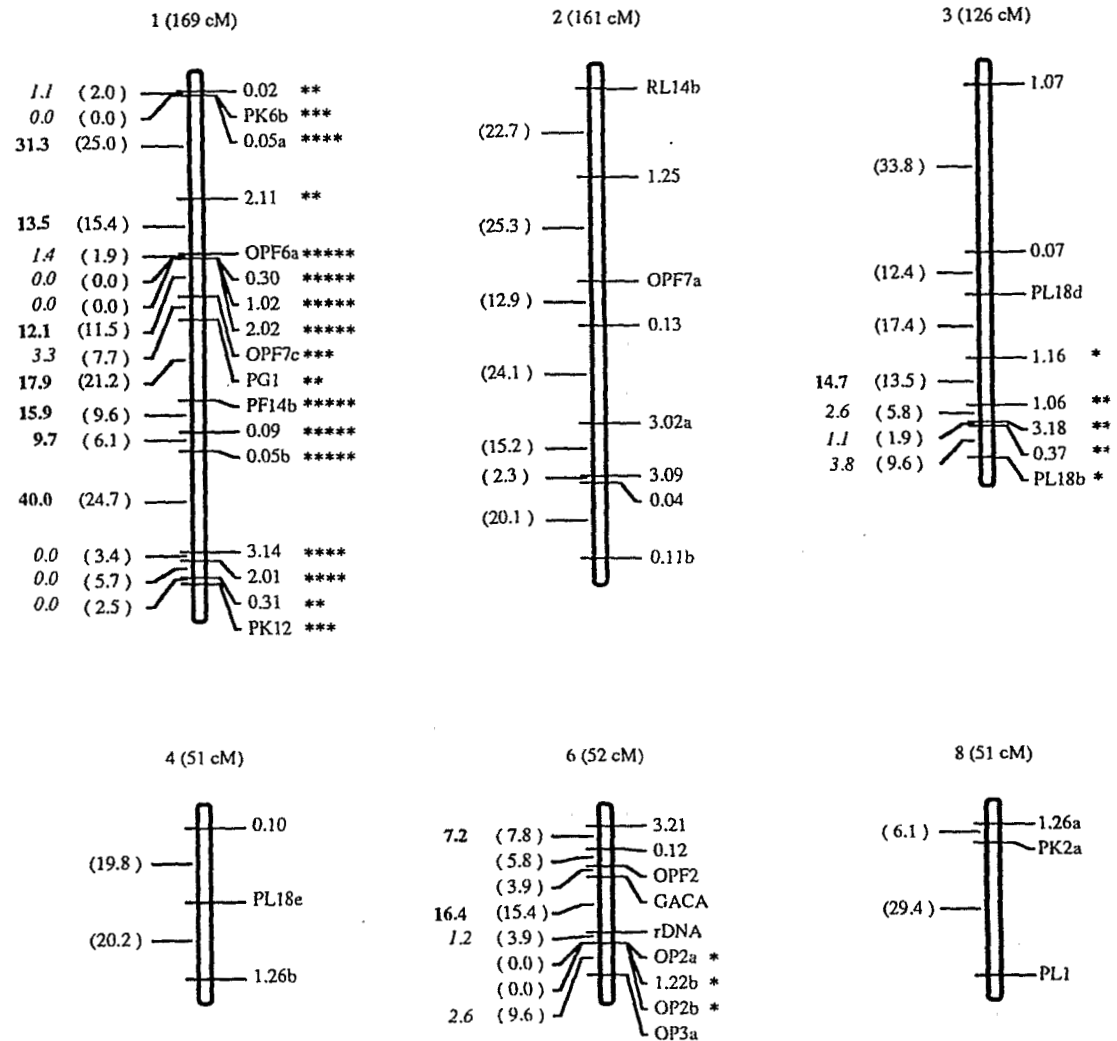
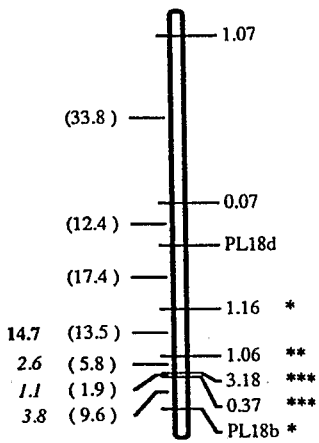


Figure 1: Carte génétique de l'hybride intergénérique (*Citrus reshni* x *Poncirus trifoliata*). Les nombres entre parenthèses indiquent les fréquences de recombinaison calculées avec Mapmaker. En caractère gras et en italique apparaissent les valeurs calculées avec l'estimateur de Bailey. A droite figurent les noms des marqueurs. Les astérisques signalent les marqueurs présentant une distorsion de ségrégation:

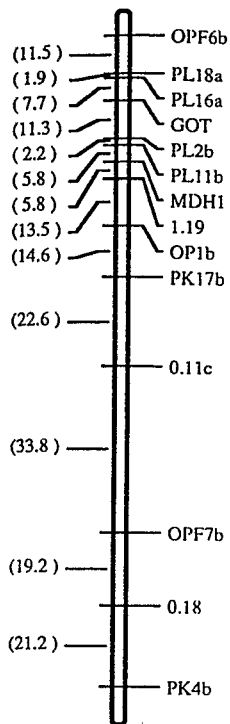
* :chi² significatif au seuil de 5%
 ** :chi² significatif au seuil de 1%
 *** :chi² significatif au seuil de 0,1%

**** :chi² significatif au seuil de 0,01%
 ***** :chi² significatif au seuil de 0,001%

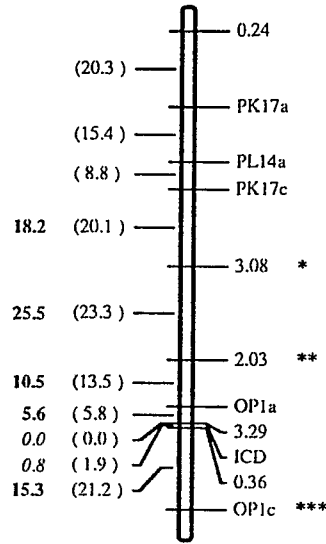
3 (126 cM)



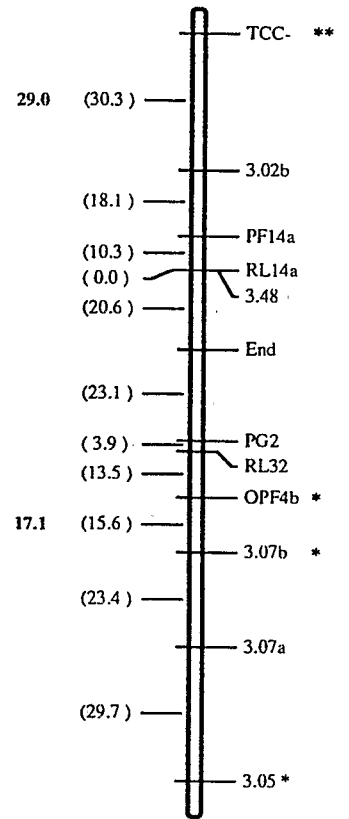
5 (222 cM)



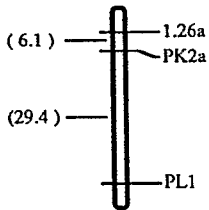
7 (163 cM)



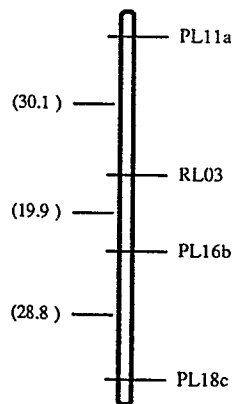
9 (253 cM)



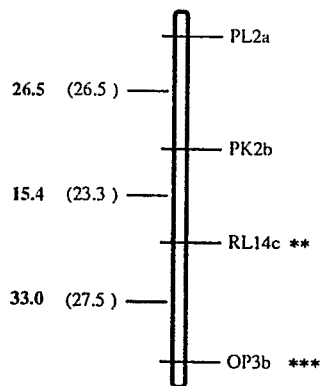
8 (51 cM)



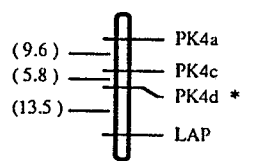
10 (114 cM)



11 (109 cM)



12 (32 cM)



eshni x Poncirus trifoliata.
combinaison calculées avec
calculées avec l'estimateur de
ues signalent les marqueurs

ficatif au seuil de 0,01 %
ficatif au seuil de 0,001 %

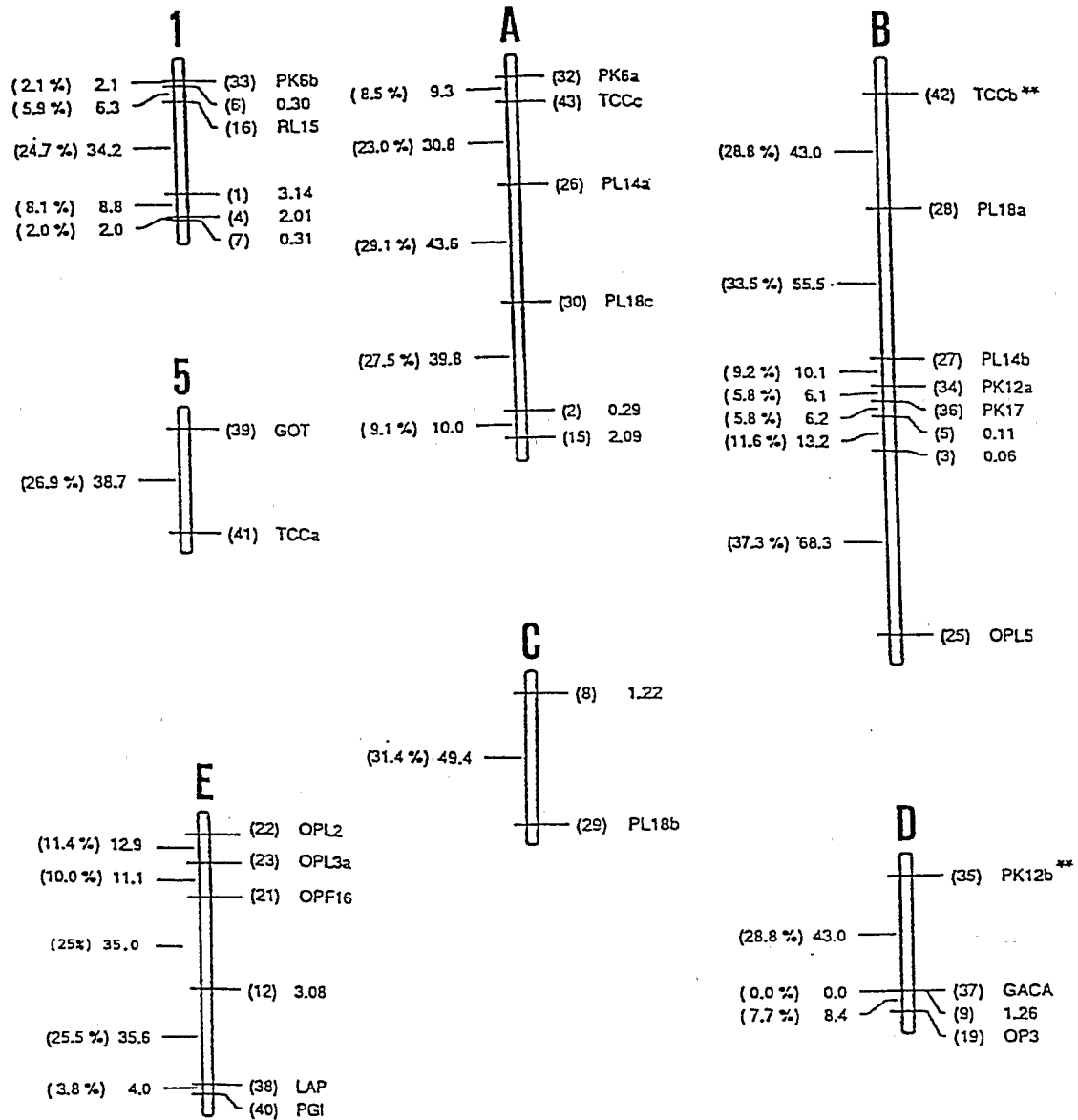
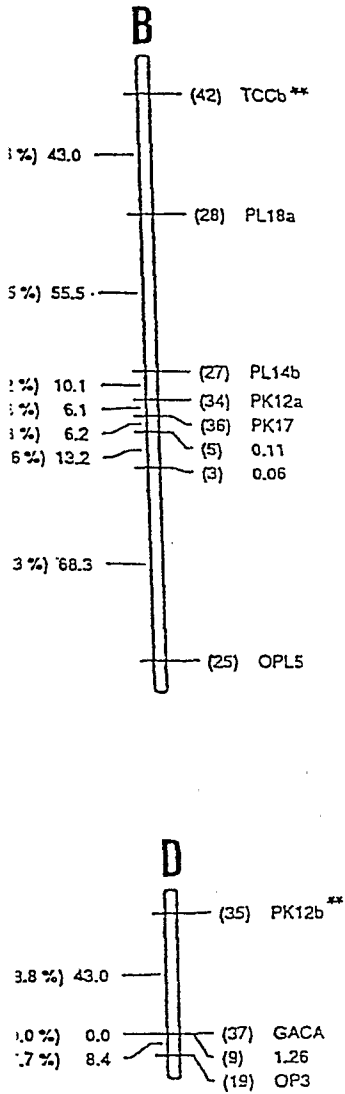
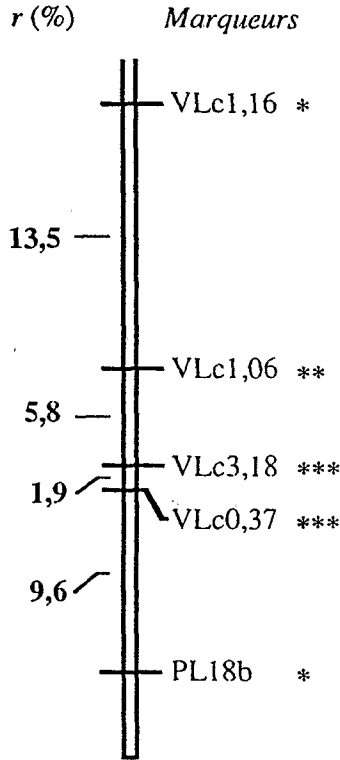


Figure 2: Carte génétique du pamplemoussier (*Citrus grandis*) obtenue à l'aide de Mapmaker (Lod = 3 et $r = 0,3$). Les nombres de gauche (entre parenthèses) indiquent les fréquences de recombinaison, les autres donnent la distance en cM. Les groupes de liaison ont été numérotés en fonction de la carte de l'hybride mâle.



Z classique
+ estimateur classique
(Mapmaker)



Z(u,v,w)
+ estimateur de Bailey

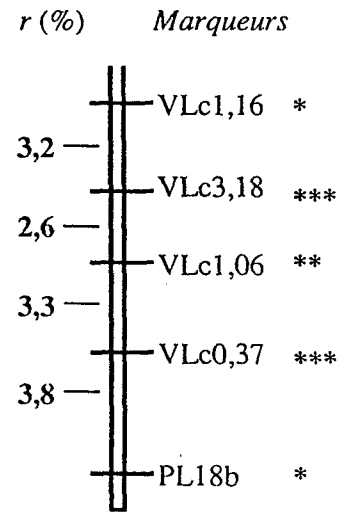


Figure 3: Carte de (*Citrus reshni* x *Poncirus trifoliata*) du groupe de liaison 3. Comparaison des ordres obtenus par la méthode classique (Mapmaker) et la méthode tenant compte des distorsions de ségrégation. On constate une inversion des marqueurs VLc3.18 et VLc1.06.

ue à l'aide de Mapmaker
ndiquent les fréquences de
iaison ont été numérotés en

groupes ne sont pas séparés nettement. Notamment, à Lod $_2$, les groupes 1 et 2 de la carte de l'hybride n'en forment qu'un, représentant plus d'un tiers de la longueur totale de la carte. Par contre, pour un Lod $_4$, le nombre et la composition des groupes de liaison ne sont pas modifiés par rapport à la carte établie à Lod $_3$.

Distorsions de ségrégation

Sur 104 marqueurs de la carte du mâle, 39, soit 37,5%, présentent une distorsion par rapport à la ségrégation théorique 1:1, avec un χ^2 significatif au seuil de 5% ou moins (tableau 1). A l'inverse, sur la carte du pamplemoussier, seuls 3 marqueurs sur 45, soit 6,5%, ségrègent de manière non mendélienne. Des ségrégations anormales de marqueurs ont déjà été observées chez les agrumes, notamment dans des croisements d'individus appartenant à des genres différents (Torres *et al.*, 1985; Ollitrault et Faure, 1992; Durham *et al.*, 1992; Jarrell *et al.*, 1992).

On remarque que le groupe de liaison 1 de la carte du mâle est constitué exclusivement de marqueurs caractérisés par une distorsion de ségrégation et regroupe presque la moitié des loci affectés. Deux hypothèses peuvent être envisagées: (1) ce groupe n'en est pas un, les distorsions induisant des fausses liaisons; (2) ce groupe correspond vraiment à un chromosome, et dans ce cas il est probable que cette distorsion généralisée soit liée aux conséquences d'une hétérozygotie structurelle au niveau de cette paire chromosomique.

Une analyse plus fine des distorsions du groupe de liaison 1, montre que tous les marqueurs ont subi une sélection en faveur du parent Cléopâtre. L'hypothèse d'un faux groupe de liaison est peu vraisemblable pour deux raisons: (1) les χ^2 d'indépendance qui testent l'hypothèse de liaison pour chaque couple de marqueurs sont tous significatifs (2) les marqueurs codominants (RFLP) hétérozygotes chez les deux génotypes parentaux et localisés au niveau de ce groupe de liaison 1, sont également assignés à un même groupe, sur la carte du pamplemoussier, et présentent une ségrégation mendélienne (1:1). La contre-sélection d'un chromosome entier pourrait provenir des conséquences d'une hétérozygotie structurelle et d'une sélection gamétique favorable à un ou plusieurs allèles du mandarinier Cléopâtre. Ce modèle biologique ne correspond pas aux hypothèses de l'estimateur de Bailey, qui n'envisage que des situations de sélection zygotique ou gamétique sur des marqueurs dominants et non des sélections imputables à des variations structurelles du génome (Lorieux, 1993). Cet estimateur est donc inopérant pour valider les valeurs de fréquences de recombinaison au sein du groupe 1. Cependant, nous pouvons supposer, après comparaison avec la carte du pamplemoussier, que l'agencement des marqueurs du groupe n'a pas été affecté par les distorsions de ségrégation, du moins en ce qui concerne les 5 marqueurs communs (marqueurs RFLP).

Tableau 1: Liste des marqueurs hétérozygotes chez l'hybride (*Citrus reshni* x *Poncirus trifoliata*) présentant une distorsion de ségrégation

Locus	Origine du marqueur	Groupe° de liaison	Fréquence alléliques dans les descendance		chi ² du rapport 1:1
			A#	B#	
0.02	RFLP	1	0.73	0.27	10.80 **
0.09	RFLP	1	0.88	0.12	29.82 *****
0.30	RFLP	1	0.85	0.15	24.92 *****
0.31	RFLP	1	0.73	0.27	10.37 **
1.02	RFLP	1	0.86	0.14	25.92 *****
2.01	RFLP	1	0.79	0.21	16.33 ****
2.02	RFLP	1	0.84	0.16	24.02 *****
2.11	RFLP	1	0.71	0.29	9.31 **
OPF6	RAPD	1	0.83	0.17	22.23 *****
OPF7c	RAPD	1	0.77	0.23	15.08 ***
PF14b	RAPD	1	0.87	0.13	27.77 *****
PK6b	RAPD	1	0.74	0.26	11.26 ***
PK12	RAPD	1	0.73	0.27	11.08 ***
PG1	isozyme	1	0.69	0.31	7.69 **
3.14	RFLP	1	0.80	0.20	18.84 *****
0.05a	RFLP	1	0.78	0.22	16.49 *****
0.05b	RFLP	1	0.88	0.12	29.83 *****
0.37	RFLP	4	0.77	0.23	15.08 ***
1.06	RFLP	4	0.69	0.31	7.08 **
1.16	RFLP	4	0.67	0.33	5.67 *
3.18	RFLP	4	0.75	0.25	13.00 ****
PL18b	RAPD	4	0.67	0.33	6.23 *
1.22b	RFLP	6	0.35	0.65	4.60 *
OP2a	RAPD	6	0.35	0.65	4.92 *
OP2b	RAPD	6	0.35	0.65	4.92 *
2.03	RFLP	7	0.31	0.69	7.08 **
3.08	RFLP	7	0.35	0.65	4.42 *
OP1c	RAPD	7	0.23	0.77	15.08 ***
3.07b	RFLP	9	0.65	0.35	4.42 *
OPF4b	RAPD	9	0.67	0.33	5.67 *
OPF4b	RAPD	9	0.67	0.33	5.67 *
(TCC)5	VNTR/PCR	9	0.69	0.31	7.69 **
PK4d	RAPD	12	0.65	0.35	4.92 *
RL14c	RFLP	11	0.73	0.27	10.09 **
OP3b	RAPD	-	0.77	0.23	15.08 ***
OPF4a	RAPD	-	0.24	0.76	14.29 ***
PL14b	RAPD	-	0.27	0.73	11.08 ***
PK6a	RAPD	-	0.26	0.74	11.26 ***
PK6c	RAPD	-	0.34	0.66	4.79 *

A= allèle de la mandarine Cléopatra, B= allèle du *P. trifoliata* Rubidoux

*P(probabilité) 0.05, ** P 0.01, ***P 0.001, ****P 0.0001, *****P 0.00001

° - : marqueur n'ayant pas été assigné à un quelconque groupe de liaison

Biais de l'estimateur "classique"

Le groupe de liaison 3 comprend, à l'une de ses extrémités, 5 marqueurs présentant des distorsions de ségrégation. Si nous conservons l'ordre obtenu avec la méthode "classique", on observe un gradient de distorsion unimodal, avec un maximum aux

marqueurs 3.18 et 0.37. Ce profil semble suggérer la présence d'un seul gène sélectionné au voisinage de ces deux marqueurs. Il a été démontré que si un seul allèle, au voisinage de deux marqueurs, est soumis à une sélection, l'estimateur "classique" des fréquences de recombinaison entre ces deux marqueurs liés n'est pas biaisé. Par contre les estimations des fréquences de recombinaison sont biaisées lorsqu'il y a un effet de sélection sur chacun des deux allèles encadrant les deux marqueurs (Lorieux, 1993). Dans ce cas particulier (deux marqueurs entourés de deux allèles sélectionnés), le biais de l'estimateur de Bailey est nul, quelles que soient les valeurs sélectives et les fréquences de recombinaison. Par conséquent, si nous envisageons la présence d'un seul allèle sélectionné, au niveau du groupe de liaison 3, les valeurs obtenues par Mapmaker et par l'estimateur de Bailey devraient concorder. Cette hypothèse ne semble pas être vérifiée, car les estimations diffèrent fortement pour deux intervalles: 1.06 - 3.18 et 0.37 - PL18b. Il y aurait donc dans cette région au moins deux loci très impliqués dans un processus de sélection selon l'estimateur de Bailey. L'ordre a donc été établi au moyen des *Lod score* tenant compte des distorsions de ségrégation (*Lod score* $Z(u,v,w)$) (Lorieux, 1993). Nous constatons alors une différence entre les ordres obtenus par la méthode classique et par la méthode alternative proposée (figure 3), et le gradient de distorsion devient bimodal, ce qui est cohérent avec la présence de deux allèles sélectionnés. Il semble donc probable que l'ordre corrigé soit plus proche de l'ordre réel que celui obtenu avec la méthode "classique" (Mapmaker).

Conclusion

L'étude d'une descendance hybride trois voies entre parents génétiquement très différents a permis de construire deux cartes génétiques grâce à l'identification des structures gamétiques mâles et femelles.

Des différences très marquées ont été observées pour les taux de distorsions de ségrégation bien plus importants chez l'hybride intergénérique mâle que chez le pamplemoussier femelle. Ce résultat est cohérent avec les données biologiques:

- les données bibliographiques montrent que les distorsions sont beaucoup plus fréquentes en hybridation interspécifique et intergénérique qu'en intraspécifique (les hétérozygoties structurelles jouant certainement un rôle important). La sélection globale du groupe de liaison 1 pourrait être due à de telles structures.
- les deux parents de l'hybride intergénérique sont polyembryonnés tandis que le pamplemoussier est monoembryonné; il est donc probable que le fardeau génétique est moins important chez ce dernier. L'apomixie facultative (polyembryonie) autorise, en effet, l'accumulation à l'état hétérozygote de nombreuses mutations défavorables ou délétères à l'état homozygote. Ces mutations peuvent induire des ségrégations anormales lors des fécondations croisées (sélection gamétique) ou des autofécondations (sélections gamétique et zygotique). Dans ces situations, nous

Un seul gène sélectionné, allèle, au voisinage de "ue" des fréquences de entre les estimations des sélection sur chacun des ce cas particulier (deux ateur de Bailey est nul, naison. Par conséquent, au du groupe de liaison ey devraient concorder. iffèrent fortement pour is cette région au moins l'estimateur de Bailey. pte des distorsions de ns alors une différence de alternative proposée chérent avec la présence rrigé soit plus proche de r).

ents génétiquement très e à l'identification des

taux de distorsions de ue mâle que chez le biologiques:

ns sont beaucoup plus qu'en intraspécifique (les important). La sélection structures.

mbryonés tandis que le que le fardeau génétique ultative (polyembryonie) le nombreuses mutations ions peuvent induire des ection gamétique) ou des ans ces situations, nous

avons vu que l'ordre des marqueurs, déterminé par les estimateurs "classiques", pouvait être affecté par les distorsions de ségrégation, lorsqu'au moins deux gènes soumis à sélection sont présents dans la région chromosomique étudiée. Il convient alors d'utiliser l'estimateur de Bailey. La présence d'hétérozygotie structurale peut étendre l'effet d'un locus soumis à sélection à de grands fragments chromosomiques, voire à un chromosome dans son ensemble. Dans ce cas, seule la comparaison avec une carte ne comportant pas de distorsion de ségrégation pourrait confirmer les liaisons déterminées.

- compte tenu des phénomènes de compétition pollinique, il est probable que les distorsions de ségrégation au niveau des gamètes soient généralement plus marquées du côté du parent mâle que du parent femelle.

La présence de distorsions de ségrégation dans une région génomique particulière pourrait donc compromettre l'utilisation de ces marqueurs moléculaires soumis aux effets de sélection, dans le cadre d'un programme d'amélioration. En effet, les inversions d'ordre et l'obtention de fausses liaisons auraient des conséquences plus néfastes dans la localisation de gènes ou de QTL, que les simples biais d'estimation de distance. De même, l'introgression d'un fragment chromosomique, assisté par un marqueur moléculaire dont l'effet de distorsion, qu'il subit, entraîne une fausse liaison avec un caractère recherché, est voué à l'échec. Par conséquent, les connaissances sur la génétique de l'espèce étudiée apparaissent déterminantes pour connaître l'origine des distorsions et, donc, utiliser la méthode d'estimation la mieux appropriée à un programme de cartographie.

Références bibliographiques

- BAILEY N.T.J. (1949) The estimation of linkage with differential viability, II and III. *Heredity* 3: 220-228.
- BAILEY N.T.J. (1961) Introduction to the mathematical theory of genetic linkage. Clarendon Press, Oxford, 298 pp.
- BARNARD G.A. (1949) Statistical inference. *J. Roy. Stat. Soc.* B11: 115-135.
- de VIENNE D. (1984) Limites et perspectives des marqueurs moléculaires. *Le sélectionneur français* 33: 35-46.
- DURHAM R.E., LIOU P.C., GMITTER F.G. & MOORE G.A. (1992) Linkage of restriction fragment length polymorphisms and isozymes in *Citrus*. *Theor. Appl. Genet.* 84: 39-48.
- FROST H.B. (1948) Genetics and breeding. Dans: *Citrus Industry*. (Reuther W., Batchelor L.D. & Webber H.J., eds.), University of California Press., Berkeley and Los Angeles. Chap. IX.
- GANAL M.W., BONIERBALE M.W., ROEDER M.S., PARK W.D. & TANKSLEY S.D. (1991) Genetic and physical mapping of the patatin genes in potato and tomato. *Mol. Gen. Genet.* 225: 501-509.
- HALDANE J. (1919) The combination of linkage values and the calculation of distance between the loci of linked factors. *J. Genet.* 8: 299-309.

- IWAMASA M., NITO N. & LING J.T. (1988) Intra and intergeneric hybridization in the orange subfamily *Aurantioidae*. Dans: *Proc. 6th Int. Citr. Cong. Vol. 1.* (Goren, R. & Mendel, K.) Balavan Publishers, Rehovot, Israël. pp.: 123-130.
- JARRELL D.C., ROOSE M.L., TRAUGH S.N. & KUPPER R.S. (1992) A genetic map of *Citrus* based on the segregation of isozymes and RFLPs in an intergeneric cross. *Theor. Appl. Genet.* 84: 49-56.
- KRUG C.A. (1943) Chromosome numbers in the subfamily *Aurantioidae* with special reference to the genus *Citrus*. *Bot. Gaz.* 48: 602-611.
- LANDER E.S., GREEN P., ABRAHAMSON J., BARLOW A., DALY M.J., LINCOLN S.E. & NEWBURG L. (1987) Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics 1*: 174-181.
- LORIEUX M., (1993) *Cartographie des marqueurs moléculaires et distorsions de ségrégation: modèles mathématiques*. Thèse de doctorat. Montpellier II.
- LORIEUX M., PERRIER X., GOFFINET B., LANAUD C. & GONZALEZ DE LEON D. Maximum likelihood models for mapping genetic markers showing segregation distortions. I. Backcross populations. *Theoretical and Applied Genetics*, sous presse.
- LURO F. (1993) *Utilisation des marqueurs moléculaires pour la cartographie du génome et les études génétiques chez les agrumes*. Thèse de doctorat. Bordeaux II.
- LURO F. DNA Amplified Fingerprinting (D.A.F.), a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in *Citrus*. (soumis à *Hortscience*).
- MATHER K. (1957) *The measurement of linkage in heredity*. Methuen & Co, Londres, Grande Bretagne.
- MORTON N. (1955) Sequential tests for the detection of linkage. *Am. J. Hum. Genet.* 7: 277-318.
- OLLITRAULT P. (1987) *Evaluation génétique des sorghos cultivés (Sorghum bicolor L. Moench) par l'analyse conjointe des diversités enzymatique et morphophysiologique. Relation avec les sorghos sauvages*. Thèse de doctorat de l'Université de Paris XI, Orsay, France.
- OLLITRAULT P. & FAURE X. (1992) Système de reproduction et organisation de la diversité génétique dans le genre *Citrus*. Dans: *Colloque international: Complexe d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes*. (Lavoisier, ed.) Bureau des ressources génétiques, Paris. pp. 135-151.
- OLLITRAULT P. & MICHAUX-FERRIERE N. (1992) Etude critique de la technique de cytométrie en flux appliquée à l'amélioration des plantes. Résultats obtenus pour quelques agrumes. *Fruits, Numéro spécial Agrumes 47*: 195-203.
- PERRIER X., OLLITRAULT P. & DUBOIS C. (1992) Cartographie du génome et QTL's. L'approche biométrique et les contraintes biologiques. *Fruits, Numéro spécial Agrumes 47*: 135-144.
- ROOSE M.L. (1988) Isozymes and DNA restriction fragment length polymorphisms in *Citrus* breeding and systematics. Dans: *Proc. 6th Int. Citrus Cong., Tel Aviv, Israel, 6-11 Mars 1988*. (Goren R. & Mendel K., eds.), Margraf Scientific Books, Rehovot, Israël. pp. 155-165.
- STUBER C.W. (1989) Marker based selection for quantitative traits. *Vorträge für Pflanzenzüchtung 16*: 31-49.
- TORRES A.M., MAU-LASTOVICKA T., WILLIAMS T.E. & SOOST R.K. (1985) Segregation distortion and linkages of *Citrus* and *Poncirus* isozymes genes. *J. Hered.* 76: 2896294.