

## Cartographie génétique de la stérilité mâle Ms8 chez *Phaseolus vulgaris* L.

Joseph Martin Bell, Jean-Baptiste Noubissie Tchiagam, Hermine Bille Ngalle

Une stérilité mâle a été identifiée chez le haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.) au début des années 80. L'étude de son déterminisme génétique, la description de son expression phénotypique et l'intérêt de son utilisation en amélioration de cette espèce autogame ont déjà été rapportés [1, 2].

Avant de pouvoir généraliser l'utilisation de la stérilité mâle, contrôlée par un gène dominant, deux inconvénients, signalés par les auteurs, doivent être supprimés : l'uniformité cytoplasmique de toutes les variétés issues des programmes utilisant ce gène de stérilité mâle et l'absence d'un gène « avertisseur » permettant de faire un tri précoce de plantes mâle-stériles ou mâle-fertiles. Les travaux réalisés chez d'autres espèces permettent d'envisager des solutions par la recherche de liaisons entre la stérilité mâle et des marqueurs s'exprimant au stade plantule, afin d'aboutir au repérage précoce de ce caractère. De telles liaisons ont été décelées chez le tournesol [3], le bégonia et l'impatiens [4], l'orge [5], le chou [6] et la tomate [7, 8].

Le risque d'uniformité cytoplasmique pourrait être évité en réalisant des transferts de ce gène dans d'autres cyto-

plasmes de l'espèce, grâce au génie génétique utilisé actuellement chez de nombreuses espèces végétales [9-11].

L'identification du chromosome ou du groupe de liaison au sein duquel se situe le gène concerné constituerait dès lors un apport indéniable à la résolution des problèmes évoqués [12].

Notre objectif général a été de réaliser une cartographie génétique du locus du gène Ms8, en étudiant la liaison entre ce dernier et deux loci dont les gènes contrôlent des caractères de coloration facilement identifiables.

### Matériels et méthodes

Nous avons utilisé des phénotypes contrôlés par trois loci : le locus V, le locus Y et le locus Ms8.

Le locus V (violet) est situé sur le groupe de liaison VII de la carte classique [13]. L'allèle dominant  $\underline{V}$  contrôle de manière pléiotropique les couleurs violette des fleurs et noire des graines [14] ; l'allèle récessif  $\underline{v}$  détermine la couleur blanche des fleurs et des graines.

Le locus Y (*yellow wax pod*) est situé sur le groupe de liaison VI de la carte classique. L'allèle récessif  $\underline{y}$  détermine la coloration « beurre » (aspect jaune ciré des gousses au stade « grossissement » des graines) [14] ; l'allèle dominant  $\underline{Y}$  détermine la coloration verte des gousses au même stade.

Le locus Ms8 (stérilité mâle dominante) est celui dont on recherche le groupe de

liaison. L'allèle dominant  $\underline{Ms}$  détermine la stérilité mâle et l'allèle récessif  $\underline{ms}$ , la fertilité mâle [1, 2].

Le matériel végétal de départ est constitué de deux lignées pures MM3 et Maxidor, gracieusement offertes par l'INRA de Versailles (France). Le gène Ms8 a été introduit dans la variété MM3 par rétro-croisements. La lignée mâle stérile (Ms) de MM3 utilisée dans nos expériences est issue du 13<sup>e</sup> rétro-croisement. La variété MM3 possède des fleurs violettes (V) et des gousses vertes (Y) au stade « grossissement » des graines. Maxidor est mâle-fertile (ms), a des fleurs blanches (v) et porte des gousses jaune ciré (y) au stade « grossissement » des graines (gousses jaunes). Le *tableau 1* présente les caractéristiques des deux variétés.

L'étude des liaisons est fondée sur un test trilocal. Un parent (femelle) exprimant les formes dominantes des trois caractères est croisé par un parent (mâle) exprimant les formes récessives de ces mêmes caractères. L'hybride F<sub>1</sub> (triple hétérozygote) obtenu est rétro-croisé par le parent mâle triple homozygote récessif. Si les trois caractères étudiés sont indépendants deux à deux, la descendance du rétro-croisement doit présenter huit classes phénotypiques de même fréquence.

Dans nos essais, nous avons semé vingt-huit graines de la lignée mâle-stérile MM3 dans huit pots. À la floraison, nous avons éliminé les plantes mâle-fertiles et nous avons fécondé les plantes clairement identifiées comme mâle-stériles (Ms, V, Y), par du pollen des fleurs

J.M. Bell, J.-B. Noubissie Tchiagam, H.B. Ngalle : Unité de génétique et amélioration des plantes, Département de biologie et physiologie végétales, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I, BP 812 Yaoundé, Cameroun.

Tirés à part : J.M. Bell

## Tableau 1

Caractéristiques des parents et de la F<sub>1</sub> obtenue par croisement entre les CV Maxidor et MM3 de *Phaseolus vulgaris*

Variétés ou génération	Graine (phénotype)	Durée semis-floraison (jours)	Nombre de nœuds à la floraison	Mode de croissance	Poids de 100 graines (g)	Surface foliaire (cm <sup>2</sup> )	Durée semi-maturité (jours)
Maxidor	Blanche arrondie	30 ± 1	6 ± 1	Déterminé (type I)	17,1 ± 1,3	121,4 ± 3,6	78 ± 3
MM3	Noire réniforme	32 ± 2	12 ± 3	Indéterminé (type III)	25,4 ± 1,6	195,1 ± 5,3	80 ± 4
F <sub>1</sub>	Noire plus ou moins réniforme	31 ± 1	13 ± 3	Indéterminé (type III)	22,3 ± 4,1	201,0 ± 3,5	78 ± 2

Characteristics of parental varieties and the F<sub>1</sub> progeny obtained by crossing CV Maxidor and MM3 of *Phaseolus vulgaris*

de Maxidor (ms, v, y). Nous avons semé la descendance de ce croisement (génération F<sub>1</sub>) dans quinze pots.

À la floraison, nous avons laissé s'autoféconder les plantes fertiles F<sub>1</sub> (ms, V, Y) pour obtenir la génération F<sub>2</sub>. Nous avons rétro-croisé les plantes mâle-stériles F<sub>1</sub> (Ms, V, Y) par Maxidor (ms, v, y) pour obtenir la première génération de rétro-croisement (RC<sub>1</sub>).

Les générations parentales et F<sub>1</sub> sont cultivées dans des pots de 10 litres, remplis d'un mélange de 50 % de compost et 50 % de sable, placés dans une serre d'ombrage qui protège les plantes des insectes pollinisateurs.

Les descendance F<sub>2</sub> et RC<sub>1</sub> sont semées en champ sur billons pendant la saison des pluies ; à la floraison, les plantes sont étiquetées.

La F<sub>2</sub> permet de vérifier le déterminisme génétique des caractères de coloration et l'absence de liaison entre les loci V et Y. La RC<sub>1</sub> permet d'étudier les liaisons entre le locus Ms8 et les loci V et Y.

Sur le plan de l'analyse statistique, nous avons utilisé le test d'indépendance de chi-carré de Pearson pour confronter nos résultats expérimentaux aux différentes hypothèses théoriques émises pour chaque génération.

Au cas où le test trilocal révèle l'existence d'une liaison entre loci, les résultats sont décomposés en trois tests bilocaux, ce qui permet d'identifier les loci génétiquement liés et de calculer la distance qui les sépare. Cette dernière est estimée

comme étant le pourcentage des classes recombinées dans un test bilocal. L'écart type de cette estimation est égal à :

$$\left( \frac{pq}{n} \right)^{\frac{1}{2}}$$

avec p = fréquence des classes recombinées, q = 1 - p, fréquence des classes parentales et n = effectif de la génération RC<sub>1</sub>.

## Résultats et discussion

À la génération F<sub>1</sub>, on a obtenu 53 plantes dont 24 mâle-stériles, à fleurs violettes et gousses vertes et 29 plantes mâle-fertiles, à fleurs violettes et gousses vertes également. Les résultats de la ségrégation des caractères de coloration en F<sub>2</sub> et le résultat du test trilocal en RC<sub>1</sub> figurent aux *tableaux 2* et *3*.

En F<sub>2</sub>, on constate que toutes les plantes sont fertiles. On observe quatre classes phénotypiques représentées par les effectifs suivants : 48 plantes à fleurs violettes et gousses vertes (V, Y), 22 plantes à fleurs violettes et gousses jaunes (V, y), 17 plantes à fleurs blanches et gousses vertes (v, Y) et 7 plantes à fleurs blanches et gousses jaunes (v, y) pour un total de 94 plantes.

En RC<sub>1</sub>, on observe huit classes phénotypiques représentées par les effectifs suivants : 22 plantes mâle-stériles à fleurs violettes et gousses vertes (Ms, V, Y), 7 plantes mâle-stériles à fleurs violettes et gousses jaunes (Ms, V, y), 21 plantes mâle-stériles à fleurs blanches et gousses vertes (Ms, v, Y), 6 plantes mâle-stériles à fleurs blanches et gousses jaunes (Ms, v, y), 6 plantes fertiles à fleurs violettes et gousses vertes (ms, V, Y), 23 plantes fertiles à fleurs violettes et gousses jaunes (ms, V, y), 13 plantes fertiles à fleurs blanches et gousses vertes (ms, v, Y), 19 plantes fertiles à fleurs blanches et gousses jaunes (ms, v, y). Le total des plantes de cette descendance RC<sub>1</sub> est de 117.

À la génération F<sub>1</sub>, on trouve une homogénéité pour les caractères de coloration et une hétérogénéité pour la fertilité. La ségrégation entre les plantes stériles et fertiles est compatible avec un rapport 1 : 1 ( $\chi^2 = 1,0$  pour 1 ddl ;  $0,3 < p < 0,5$ ). Cette compatibilité est également vérifiée à la RC<sub>1</sub>. Par ailleurs, toutes les plantes F<sub>1</sub> fertiles donnent une descendance totalement fertile en F<sub>2</sub>. Ces résultats confirment le déterminisme génétique de cette stérilité mâle, déjà évoqué ci-dessus [1, 2]. En F<sub>2</sub>, on obtient quatre classes phénotypiques dont les effectifs sont compatibles avec le rapport 9 : 3 : 3 : 1 ( $\chi^2 = 1,77$  pour 3 ddl ;  $0,5 < p < 0,9$ ), ce qui confirme l'indépendance génétique de ces caractères de coloration déjà supposée par l'appartenance des deux loci à deux groupes de liaison différents.

## Tableau 2

Classes phénotypiques et leurs effectifs en F<sub>2</sub> du croisement entre les CV Maxidor et MM3 de *Phaseolus vulgaris*

Phénotype F <sub>2</sub>	Effectifs observés	Effectifs attendus (9 : 3 : 3 : 1)	$\chi^2$	p
(V, Y)	48	52,875	0,45	0,5 - 0,9
(V, y)	22	17,625	1,09	0,2 - 0,3
(v, Y)	17	17,625	0,02	0,5 - 0,9
(v, y)	7	5,875	0,21	0,5 - 0,9
Total	94	94	1,77	0,5 - 0,9

V : fleur violette, v : fleur blanche, Y : gousse verte, y : gousse jaune ciré

Phenotypes and frequencies in the F<sub>2</sub> progeny of crosses between CV Maxidor and MM3 of *Phaseolus vulgaris*

En RC<sub>1</sub>, les ségrégations observées conduisent à huit classes phénotypiques de fréquences inégales ( $\chi^2 = 26,91$  pour 7 ddl ;  $p < 0,01$ ), ce qui indique que les trois loci ne sont pas indépendants.

Le test bilocal tiré des ségrégations en RC<sub>1</sub> et intéressant les loci V et Y donnent quatre classes phénotypiques de même fréquence ( $\chi^2 = 1,46$  pour 3 ddl ;  $0,3 < p < 0,5$ ), les deux loci sont ici indépendants.

Le test bilocal, tiré lui aussi des ségrégations en RC<sub>1</sub>, mais intéressant les loci Ms8 et V, donne quatre classes phénotypiques de même fréquence ( $\chi^2 = 0,43$  pour 3 ddl ;  $0,5 < p < 0,9$ ), ce qui révèle l'indépendance des deux loci.

Enfin, le dernier test bilocal tiré de la RC<sub>1</sub> intéresse les loci Ms8 et Y. On y trouve quatre classes phénotypiques de fréquences inégales ( $\chi^2 = 24,96$  pour 3 ddl ;  $p < 0,01$ ). De plus, les deux classes parentales ont des effectifs similaires (43 plantes mâle-stériles et gosses vertes, 42 plantes mâle-fertiles et gosses jaunes). Ceci est valable également pour les deux classes recombinées (13 plantes mâle-stériles et gosses jaunes, 19 plantes mâle-fertiles et gosses vertes). Enfin, les classes parentales ont des effectifs supérieurs à ceux des classes recombinées ( $\chi^2 = 1,25$  pour 1 ddl ;  $0,2 < p < 0,3$ ). Le résultat de ce test bilocal montre que les loci Ms8 et Y sont génétiquement liés et devraient appartenir au même chromosome, leur distance estimée étant de  $27,35 \pm 4,12$  cM.

La taille du génome de *Phaseolus vulgaris* étant de l'ordre de 1 200 cM, soit 637 000 kpb [15], la longueur moyenne d'un chromosome serait de l'ordre de 100 cM, soit 60 000 kpb [15-18]. Ces caractéristiques du génome chez *P. vul-*

*garis*, permettent de proposer une distance physique, de l'ordre de  $15\,316 \pm 2\,307$  kpb, entre les loci Ms8 et Y.

## Conclusion

En conclusion, notre étude donne une orientation claire sur la localisation chromosomique du locus Ms8, qui n'appartient pas au groupe VII de la carte classique [13]. Il se trouverait dans le groupe VI de cette même carte, ou dans le groupe D<sub>2</sub> de la carte de l'Université de Californie [17], ou encore dans le groupe D de la carte de l'Université de

## Summary

### Genetic mapping of Ms8 male sterility in *Phaseolus vulgaris* L.

J.M. Bell, J.-B. Noubissie Tchiagam, H.B. Ngalle

*In the early 80s, a new male sterility (Ms8) was identified in Phaseolus vulgaris. Premature abortion of anthers characterizes its phenotype, which is controlled by a dominant gene. Such male sterility presents an interest in breeding programmes requiring many hybridizations, controlled or not. However, it has two disadvantages to deal with before spreading its use in breeding: cytoplasmic uniformity of progeny and phenotypical trait of male sterility localized in the anthers, making it impossible to identify male sterile individuals at an early stage.*

*With the aim to solve this problem by the localization of Ms8 gene on one of the 11 chromosomes of the species, we launched a large scale of research programme on linkage, including Ms8 male sterility and about 20 morphological traits whose genes are clearly located on one or another of the 11 chromosomes of P. vulgaris. The results presented here were obtained from the linkage's study between Ms8 male sterility and two coloration traits, pod and flower colour, using the two varieties: MM3 and Maxidor. After 13 back-crosses, the Ms8 male sterility trait was transferred to MM3 variety with violet flowers (V) and green pods (Y). Maxidor used as male parent was fertile (ms), with white flowers (v) and yellow wax pod (y) (Table 1).*

*The following test-crosses were used: a male sterile plant of the MM3 male sterile pedigree was hybridized with Maxidor. The F<sub>1</sub> progeny obtained comprised male sterile and fertile plants. The F<sub>1</sub> male sterile plants were in turn hybridized with Maxidor to obtain the first back-cross progeny (BC<sub>1</sub>); the F<sub>1</sub> male fertile plants were then self fertilized to obtain the F<sub>2</sub> progeny.*

*The results obtained (Tables 2 and 3) confirm the genetic independence of the two coloration traits, and their monogenic control. They prove that Ms8 male sterility and the flower's coloration are independent characters and also show the linkage between Ms8 male sterility and pod's coloration. The genes controlling these two traits are located on the same VI linkage group of the classical map (group D2 of California University's map or group D of Florida University's map). The genetic distance between the two loci is  $27.35 \pm 4.12$  cM.*

*Cahiers Agricultures 1997 ; 6 : 11-4.*

## Tableau 3

### Classes phénotypiques et leurs effectifs en RC<sub>1</sub> entre les CV Maxidor et MM3 de *Phaseolus vulgaris*

Phénotype RC <sub>1</sub>	Effectifs observés	Effectifs attendus (1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1)	$\chi^2$	P
(Ms, V, Y)	22	14,625	3,72	0,05 - 0,10
(Ms, V, y)	7	14,625	3,92	0,02 - 0,05
(Ms, v, Y)	21	14,625	2,78	0,05 - 0,10
(Ms, v, y)	6	14,625	5,08	0,02 - 0,05
(ms, V, Y)	6	14,625	5,08	0,02 - 0,05
(ms, V, y)	23	14,625	4,79	0,02 - 0,05
(ms, v, Y)	13	14,625	0,18	0,50 - 0,90
(ms, v, y)	19	14,625	1,31	0,20 - 0,30
Total	117	117	26,86	< 0,01

Ms : mâle-stérile, ms : mâle-fertile, V : fleur violette, v : fleur blanche, Y : gousse verte, y : gousse jaune ciré

### Phenotypes and frequencies in BC<sub>1</sub> progeny between CV Maxidor and MM3 of *Phaseolus vulgaris*

Floride [16]. En focalisant les recherches sur le chromosome concerné, nous pensons qu'une localisation plus précise couplée à l'analyse de ce gène, au niveau moléculaire, ne devrait pas tarder ■

### Références

- Bell JM. *Étude génétique, cytologique et physiologique de différentes stérilités mâle géniques et cytoplasmique chez Phaseolus vulgaris L.* Paris XI Orsay : Thèse Université, 1986 ; 177 p.
- Bannerot H, Bell JM, Bosc B, Camut R. Un gène dominant de stérilité mâle chez le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agronomie* 1987 ; 7 : 563-6.
- Leclercq P. Une stérilité mâle utilisable pour la production d'hybrides de tournesol. *Ann Amélior Plantes* 1966 ; 16 : 135-44.
- Demarly Y. *Génétique et amélioration des plantes.* Paris : Masson, 1977 ; 287 p.

5. Wiebe GA. Use of genic male sterility in hybrid barley breeding. In : *Proceeding International Congress Genetic Tokyo*, 1968 ; 2 : 234-7.

6. Sampson DR. Close linkage of genes for male sterility and anthocyanins synthesis in *Brassica oleracea* promising for F1 hybrid seed production : multivalents at meiosis not involved in linkage. *Can J Genet Cytol* 1970 ; 12 : 677-84.

7. Philouze J. Gènes marqueurs liés aux gènes de stérilité mâle ms32 et ms35 chez la tomate. *Ann Amélior Plantes* 1974 ; 21 : 77-82.

8. Corneau G, Cracium C, Rosu N, Cracium V. The ultrastructural expression of the male sterility in *Lycopersicon esculentum* Mill. In : *Résumés des articles XIII<sup>e</sup> Congrès Eucarpia, Angers (France)*, 1992 ; 73-4.

9. Potrykus I. Gene transfer to plants : assessments and perspectives. *Plant Physiol*, 1990 ; 79 : 125-34.

10. Cao J, Duan X, McElroy D, Wu R. Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile mediated transformation of suspension culture cells. *Plant Cell Rep* 1992 ; 11 : 586-91.

11. Guiderdoni E. Progrès récents des biotechnologies du riz. *Agron Trop* 1992 ; 46 : 137-53.

12. Gepts P. The use of molecular and biochemical markers in crops evolution studies. *Evolutionary Biology* 1993 ; 27 : 51-94.

13. Gepts P. Linkages map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., 2n = 22). In : *Locus map of complex genomes.* Cold Spring Harbor : Laboratory Press, 1993 : 101-9.

14. Bassett JM. List of genes. *Phaseolus vulgaris L. Annu Rept Bean Improv Coop* 1993 ; 36 : VI-XXIII.

15. Vallejos CE, Sakiyama NS, Chase CD. A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics* 1992 ; 131 : 733-40.

16. Gepts P, Nodari R, Tsai SM, et al. Linkage mapping in common bean. *BIC Invited Paper* 1993 : 24-38.

17. Nodari RO, Tsai SM, Gilbertson RL, Gepts P. Towards and integrated linkage map of common bean 2. Development of an RFLP based map. *Theor Appl Genet* 1993 ; 85 : 513-20.

18. Nodari RO, Tsai SM, Guzman P, Gilbertson RL, Gepts P. Towards an integrated linkage map of common bean 3. Mapping genetic factors controlling host-bacterial interactions. *Genetics* 1993 ; 134 : 341-50.

## Résumé

La liaison entre le gène de la stérilité mâle Ms8 et deux gènes contrôlant des caractères de coloration chez *Phaseolus vulgaris* L. est étudiée au moyen d'un test trilocal.

Les résultats montrent que cette stérilité mâle est, génétiquement, indépendante de la coloration de la fleur mais liée à la coloration de la gousse. Les loci des deux caractères liés sont distants de 27,35 ± 4,12 cM.

Le gène de la stérilité étudiée peut être localisé dans les trois cartes génétiques du haricot actuellement disponibles : dans le groupe de liaison VI de la carte classique, dans le groupe de liaison D de la carte de l'Université de Floride ou, enfin, dans le groupe de liaison D<sub>2</sub> de la carte de l'Université de Californie.