

Empreintes génétiques de produits d'amplification d'ADN de variétés de riz irrigué de la vallée du fleuve Sénégal

Daba Ndour, Diaga Diouf, Moussa Sié, Kouamé Miézan, Marie-Madeleine Spencer

Le genre *Oryza* comprend une vingtaine d'espèces dont *Oryza sativa* et *O. glaberrima* constituent les formes cultivées [1] avec une grande diversité d'environ 100 000 variétés. Les marqueurs iso-enzymatiques ont amélioré la classification des riz, mais ils peuvent être fortement influencés par des facteurs environnementaux et le nombre de *loci* détectables est limité [2]. Le polymorphisme des séquences d'ADN a été analysé par RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*: polymorphisme de longueur des fragments de restriction) [3], RAPD (*Randomly amplified polymorphic DNA*: ADN polymorphe amplifié au hasard) [4], DAF (*DNA amplification fingerprinting*: empreintes génétiques de produits d'amplification) [5], microsatellites [6], AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*: polymorphisme de longueur des fragments d'amplification) [7] et ISSR (*Inter simple sequence repeats*: amplification intermicrosatellites) [8], toutes techniques utilisant l'amplification et/ou la digestion enzymatique. Ces techniques détectent les mutations, addition/délétion, substitution de base et

transposition et analysent à la fois les séquences exprimées et les séquences silencieuses du génome [9, 10]. La DAF est basée sur le même principe que la RAPD mais utilise une petite quantité d'ADN cible (20 à 100 pg/μl), une forte concentration d'amorces (3 μM à 30 μM) dont la taille varie entre 5 et 15 nucléotides, une concentration de magnésium de 1 à 10 mM et une température d'hybridation de 30 à 55 °C. Le ratio amorce/ADN cible est très élevé ce qui permet d'amplifier un plus grand nombre de *loci* et de corrélérer cette complexité des amplifiats à la variabilité génétique des individus. Comme en RAPD, la technique DAF met en évidence des marqueurs dominants mais le nombre de fragments amplifiés est 10 fois plus élevé, variant entre 10 et 100. Une détection des amplifiats DAF en gel d'agarose suivie d'une coloration au bromure d'éthidium entraînerait une perte importante d'informations, d'où l'utilisation d'un gel de polyacrylamide pour séparer les amplifiats avec coloration au nitrate d'argent lequel permet de détecter une petite quantité d'ADN (1 pg/mm²). Notre travail caractérise quelques variétés sélectionnées de riz irrigué, en cours d'études à l'ADRAO de Saint-Louis du Sénégal.

Les semences de riz (V87, V36, V77, V28, V33, V24, V12, V5, V4, T1) utilisées ont été fournies par l'ADRAO (tableau 1).

L'ADN des différentes variétés de riz a été extrait selon le protocole de Fulton *et al.* [11]. Les extraits d'ADN sont quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre (Jasco MHT-344), conservés à -20 °C ou utili-

sés pour l'amplification par Taq polymérase tronquée ou modifiée (Stoffel fragment) délétée de 289 acides aminés à son extrémité N-terminale et de l'activité exonucléase 5'-3' ce qui permet d'avoir des résultats très reproductibles [12]. En effet, l'activité exonucléase 5'-3' peut couper à leur extrémité 5' les fragments d'oligonucléotides hybridés à l'ADN cible durant la phase d'élongation, ce qui entraîne le décrochage de l'amorce [13]. La réaction d'amplification est réalisée dans un tube Eppendorf de 0,2 ml contenant 200 μM pour chaque dNTPs (Appligène), 2 U de Taq (Perkin Elmer, Roche), 2,5 mM de MgCl₂ (Perkin Elmer, Roche), 3 μM d'amorce (10.6e : GTGAGCTAGG ; B4 : GCAGGCCA ; B5 : GCAGGCTC ; B7 : GCAGGCTG ; OR30 : GTCCAA-GA), 2 ng d'ADN, un tampon de réaction x 1 (Stoffel buffer, Perkin Elmer, Roche) dans un volume final de 10 μl. Cinq microlitres environ d'huile de paraffine (Sigma) sont ajoutés afin de limiter l'évaporation. La réaction d'amplification est réalisée à l'aide d'un thermocycleur (PCT 100, MJ Research INC) programmé à 95 °C pendant 2 min pour une pré-dénaturation, et 35 cycles de 95 °C 30 s, 55 °C 2 min, 72 °C 30 s. À chaque cycle la quantité d'ADN cible dans le milieu réactionnel est doublée. Chaque amplification est répétée trois fois afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats.

Après amplification, 3 μl de la solution d'amplifiats sont mélangés à 3 μl d'un tampon de coloration (40 % W/V d'urée, 3 % W/V de ficoll, Sigma ; Tris, 0,12 % W/V, EDTA 1,12 % W/V, Xylène cyanol 0,02 % W/V) puis sont

D. Ndour, D. Diouf, M.-M. Spencer : Laboratoire de biotechnologies végétales, Facultés des sciences et techniques, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal. <ddiouf@ucad.sn>

M. Sié, K. Miézan : ADRAO, Programme riz irrigué, BP 96, Saint-Louis, Sénégal.

Tirés à part : D. Diouf

Thèmes : Génétique et amélioration des plantes.

Tableau 1

Liste des variétés utilisées

Numéro de la variété	Nom de la variété	Origine	Parents
T1	IR4630-22-2	IRRI	Pelita1-1/Pokkali/IR2061-464-2/IR1820-52-2
V4	IR62140-138-3-2-2-3	IRRI	IR50401-77-2-1-3/IR35366-28-3-1-2-2
V5	IR62141-106-2-3-2-3-3	IRRI	IR50401-77-2-1-3/IR42068-22-3-3-1-3
V12	IR63870-123-2-2-2-2	IRRI	PSBRC10/IR48613-21-3-2-2
V24	TOX3081-136-1-2-3	IITA	C1158-8/Chakuregi
V28	IR59544-110-2-3-2	IRRI	IR29723-88-2-3-3/IR28143-51-3-3-1-3
V33	IR19090-136-2-2-3	IRRI	BPI 121-407/BAS 370//IR4432-52-6-4
V36	ITA344	IITA	ITA312/UPLRI7
V77	WAT317-WAS-B-70-8-3-5-11	ADRAO	IR31785-58-1-2-3-3/ITA306
V87	IR63307-4B-4-3	IRRI	IR51511-B-B-34-B/TCC 266-2-49-B-B-3

List of the varieties used

déposés dans un gel vertical de polyacrylamide dénaturant à 5 % composé de 5 ml d'acrylamide à 5 % (4,9 % W/V d'acrylamide, de 0,1 % W/V de PDA (Bio-Rad), de 5 % W/V d'urée dans 20 % V/V de 5XTBE (89 mM Tris ; 89 mM d'acide borique ; 2 mM EDTA, pH 8,3), et 2,5 % V/V de glycérol), de 7,5 µl de TEMED (Poly Labo) et de 75 µl d'une solution de Persulfate d'ammonium (Bio-Rad) à 10 %. L'électrophorèse est réalisée à 170 V pendant 40 min à l'aide d'un générateur (EC105-Apparatus Corporation St. Peterburg, Florida). Les fragments d'ADN sont colorés au nitrate d'argent [14]. Dans le but d'assurer une bonne conservation du gel, on l'immerge dans une solution contenant 10 % d'acide acétique, 35 % d'éthanol, 1 % de glycérol pendant 15 à 20 min à la température ambiante. Le gel est séché en position verticale à la température ambiante pendant 18 h.

pour cent des amorces utilisées lors des réactions d'amplification se sont montrées discriminantes. Ce résultat indique que la

DAF est efficace pour mettre en évidence une différence génétique entre les variétés de riz étudiées. Nous avons également

Résultats et conclusion

Sur la *figure 1* est représentée l'amplification avec l'amorce B4, l'ADN du phage λ digéré par BstEII servant de marqueur moléculaire. Dans le puits E se trouve le témoin négatif et du puits V87 au puits V4, l'ADN des échantillons amplifié en utilisant l'amorce B4 avec un nombre de bandes très élevé. Trois cent douze bandes en moyenne ont été obtenues, reproductibles par amorce (*figure 1*). Soixante-deux

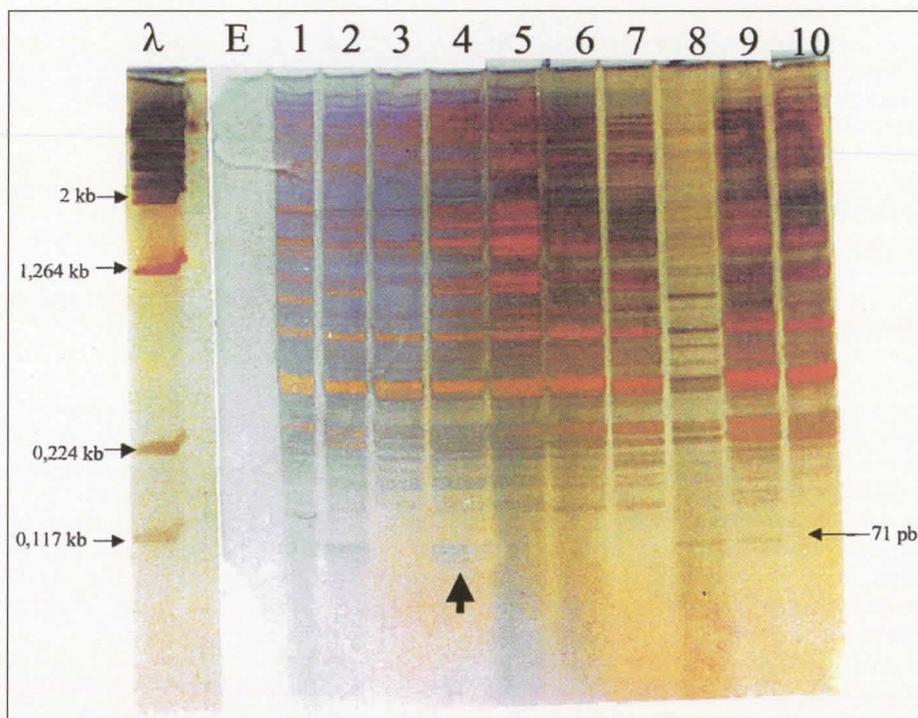


Figure 1. Profils DAF (DNA amplification fingerprinting) obtenus après amplification avec l'amorce B4 de l'ADN génomique de 10 variétés d'*Oryza sativa* (L.).
 λ : marqueur de taille moléculaire, ADN de λ digéré par BstEII.
 E : témoin négatif.
 1 à 10 : ADN des différentes variétés d'*Oryza sativa* (L.).
 1 : V87 ; 2 : V36 ; 3 : V28 ; 4 : V24 ; 5 : V5 ; 6 : T1 ; 7 : V77 ; 8 : V33 ; 9 : V12 ; 10 : V4.
 63 pb →

Figure 1. DAF profiles obtained after genomic DNA amplification of 10 *Oryza sativa* (L.) varieties with B4 primer.
 λ : molecular marker, λ DNA digested by BstEII.
 E : control.

noté que la taille des bandes varie entre 10 000 pb et 63 pb mais nous n'avons tenu compte que de celles qui sont reproductibles. Les résultats mettent en évidence une bande de 63 pb exclusivement présente chez les variétés V87, V36, et V24. Des études préalablement réalisées au champ ont montré que ces variétés sont tolérantes à la salinité. Quant à la bande de 71 pb, on la trouve chez les variétés V87, V36, V24, V33 et V12. Ces variétés, à l'exception de V12, font partie des variétés hautes, à cycle long et à nombre de grains par panicule élevé.

Le dendrogramme présenté sur la *figure 2*, réalisé selon le modèle de Nei [15] illustre la variabilité génétique entre ces variétés de riz. Nous avons tenu à réaliser un ré-échantillonnage de notre matériel d'études afin de vérifier la robustesse de nos résultats. Ces résultats suggèrent que les 10 variétés de la sous-espèce *Oryza sativa indica* présentent une forte similarité répartie en deux groupes. Le premier groupe composé des variétés V4, V28, V5, T1, V12 et V77 est lui-même subdivisé en plusieurs sous-groupes. Quant au deuxième groupe, il est constitué des variétés V33, V36, V24 et V87. Cette faible variabilité s'expliquerait d'une part par le stade avancé de sélection des variétés et d'autre part par leur fort lien de parenté. Les études réalisées au champ ont montré que les variétés du deuxième groupe se caractérisent par leur haute taille, un cycle long et un nombre de grains par panicule élevé. Les variétés V33 et V36 ont des rendements plus élevés que la variété V24. La variété V87 présente un petit nombre de panicules et un rendement faible, ce qui correspond à son isolement sur le dendrogramme.

Au niveau des profils électrophorétiques, la présence exclusive de fragments d'ADN chez certaines variétés suggère que la technique DAF pourra être utilisée dans les programmes de sélection afin de réorganiser les germoplasmes nationaux. La présence exclusive des fragments d'ADN de 71 et 63 pb chez les variétés V87, V36 et V24 à rendement élevé peut être une piste intéressante dans le choix de parents dans un programme de cartographie génétique ■

Références

1. Second G. *Relation évolutive chez le genre Oryza et processus de domestication des riz*. Thèse d'État Univ. Paris VI. 1984 ; 189 p.

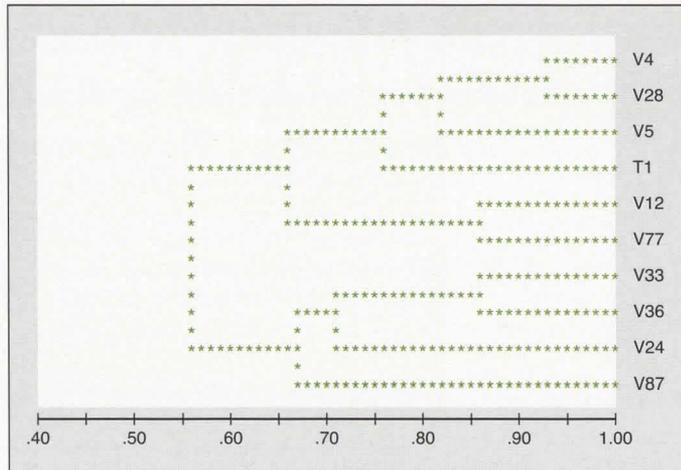


Figure 2. Relation entre les différentes variétés de riz cultivées dans la vallée du fleuve Sénégal. L'arbre a été réalisé en utilisant l'identité génétique (d'après Nei, 1978 [15]) avec 14 bandes discriminantes générées à partir de 10 amorces.

Figure 2. Relationship among rice varieties cultivated in the Senegal river valley. The tree was generated using unbiased genetic identity (after Nei, 1978 [15]) with 14 polymorphic bands generated by 10 primers.

Summary

DNA amplification fingerprinting (DAF) of irrigated rice varieties in the Senegal river valley

D. Ndour, D. Diouf, M. Sié, K. Miézan, M.-M. Spencer

DAF technology was used to characterize irrigated rice varieties cultivated in the Senegal River Valley. For this purpose, ten primers were tested in ten different varieties. DNA amplification products were electrophoresed on 5% denaturing polyacrylamide gel and visualized by silver staining. Average 312 scorable bands for each primer were obtained, of which 1% were polymorphic. Data were scored based on the presence/absence of bands. The resulting dendrogram showed two major groups. These results can serve as a reference to choose the parent plants in a mapping programme.

Cahiers Agricultures 2001 ; 10 : 339-41.

2. Glaszmann JC. Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theor Appl Genet* 1987 ; 74 : 21-30.

3. Botstein D, White R, Skolnic M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Hum Gen* 1980 ; 32 : 314-31.

4. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc Acid Res* 1990 ; 18 : 6531-5.

5. Caetano-Anollés G, Bassam BG, Gresshoff PM. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Tech* 1991 ; 9 : 553-6.

6. Estoup A, Presa P, Krieg F, Viaman D, Guyomard R. (CT)_n and (GT)_n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity* 1993 ; 71 : 488-96.

7. Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995 ; 23 : 4407-14.

8. Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 1994 ; 20 : 176-83.

9. Kidwell MG, Lisch D. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc Natl Acad Sci* 1997 ; 94 : 7704-11.

10. Clegg MT, Cummings MP, Durbin ML. The evolution of plant nuclear genes. *Proc Natl Acad Sci* 1997 ; 94 : 7791-8.

11. Fulton TM, Chungwongse J, Tanksley SD. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and herbaceous plants. *Plant Molecular Biology* 1995 ; 13 : 207-9.

12. Caetano-Anollés G, Bassam BJ, Gresshoff PM. DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. *Plant Mol Biol Reporter* 1991 ; 9 : 294-307.

13. Erlich HA, Gelfand D, Sninsky JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 1991 ; 252 : 1643-50.

14. Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1991 ; 196 : 80-3.

15. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 1978 ; 89 : 583-90.