

Cartographie du génome d'un hybride intergénérique d'agrumes à l'aide de marqueurs moléculaires

F. LURO¹, M. LORIEUX², F. LAIGRET³, J.M. BOVÉ³ ET P. OLLITRAULT⁴

(1) Station de recherches agronomiques INRA/CIRAD-FLHOR, San Giuliano, 20230 San Nicolao, France.

(2) Laboratoire AGETROP, CIRAD, BP 5035, 34032 Montpellier cedex 01, France.

(3) Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, INRA Bordeaux, BP 81, 33883 Villenave-d'Ornon cedex, France.

(4) CIRAD-FLHOR, BP 5035, 34032 Montpellier cedex 01, France.

Une carte génétique des agrumes a été établie : elle peut être utilisée pour l'étude de l'hérédité chez les hybrides interspécifiques et intergénériques et pour la localisation des gènes d'intérêt agronomique.

introduction

Chez les agrumes, l'analyse génétique des croisements 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 (GMITTER *et al.*, 1992). L'évolution des biotechnologies et le développement des techniques de marquage moléculaire apportent de nouvelles possibilités d'amélioration génétique des agrumes cultivés. La cartographie du génome a été entreprise par plusieurs laboratoires (DURHAM *et al.*, 1992 ; JARRELL *et al.*, 1992).

Une carte génétique des agrumes a été développée 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 et intergénériques,
- l'évaluation du nombre et de l'impact des mutations délétères, ou défavorables, dans des croisements entre espèces polyembryonnées,
- la localisation de gènes qui interviennent dans la constitution des caractères intéressants au sens agronomique. 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, l'utilisation des marqueurs peut être envisagée à long terme pour l'isolement et le transfert de gènes par génie génétique (GANAL *et al.*, 1991).

La carte génétique d'un génome d'agrumes, obtenue à partir d'une descendance hybride 3 voies, est présentée ici en portant une attention particulière aux distorsions de ségrégation. Les différentes approches analytiques sont discutées en fonction des modèles biologiques sous-jacents.

matériel et méthodes

le croisement

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* Hort. ex Tan. (mandarinier Cléopâtre) et un *Poncirus trifoliata* L. Raf. (Swingle).

les marqueurs

Une centaine de marqueurs ont été obtenus. Environ la moitié est de type RFLP et provient de 2 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*). Quatre autres sondes, provenant d'une banque de *Citrus jambhiri*, ont été fournies par le Pr. Roose de l'université de Riverside, en Californie (JARRELL *et al.*, 1992). Seuls les ADNc représentant des séquences faiblement répétées, ou des séquences uniques révélant du polymorphisme entre les parents du croisement, ont été retenus.

Le système de marquage de type RAPD (WILLIAMS *et al.*, 1990) utilisant des amorces opéron a permis de sélec-

tionner une quarantaine de fragments amplifiés ségré-gant dans la descendance. Le tri a été effectué sur la répétabilité des amplifications et sur l'intensité des frag-ments amplifiés. De même, l'hérédité de quelques frag-ments amplifiés à partir d'amorces représentant des séquences microsatellites [(TCC)₅ ; (GACA)₄] a été étu-diée.

Sept systèmes isoenzymatiques ont été exploités : isoci-trate déshydrogénase (ICD), malate déshydrogénase (MDH), phosphoglucose isomérase (PGI), endopeptidase (End), leucine aminopeptidase (LAP), aspartate transami-nase (GOT) et phosphoglucomutase (PGM). Trois loci isoenzymatiques (LAP, GOT et PGI) sont hétérozygotes chez le pamplemoussier et 6 (End, PGM2, LAP, GOT, ICD et MDH1) chez l'hybride intergénérique (mâle).

cartographie

La cartographie a été réalisée au moyen du logiciel Mapmaker (LANDER *et al.*, 1987). Plusieurs seuils de *Lod score* (Logarithm of odds ratios) ont été testés pour construire les groupes de liaison. La fonction de carto-graphie retenue est celle de HALDANE (1919). Le calcul des fréquences de recombinaison a été effectué par le logiciel Mapmaker.

Les liaisons et les fréquences de recombinaison (*r*), pour chaque couple de marqueurs, ont été calculées 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.

résultats et discussion

la carte génétique

La différence allélique entre les parents du croisement est telle que pour chaque individu de la descendance, dans tous les cas, les compositions alléliques des gamètes mâles et femelles pour l'hybride intergénérique (*C. reshni* x *P. trifoliata*) ont pu être déduites (figure 1). De ce fait, cette descendance a pu être analysée comme celle d'un testcross, pour tous les marqueurs.

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 ségrèguent dans la descendance (figure 2).

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 3). 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 2/3 de la longueur totale du génome (JARRELL *et al.*, 1992). Ces groupes ont été établis avec un *Lod score* > 3 et une fréquence de recombinaison maximale de 0,3. Cette dernière valeur correspond approximative-ment à la fréquence maximale détectable pour un back-cross de 52 individus.

distorsions de ségrégation

Sur 104 marqueurs cartographiés, 39, soit 37,5 %, présen-tent une distorsion par rapport à la ségrégation théorique 1:1, avec un χ^2 significatif au seuil de 5 %. A l'inverse, chez le pamplemoussier, seuls 3 marqueurs sur 45, soit 6,5 %, ségrèguent de manière non mendélienne. Des ségrégations anormales de marqueurs ont déjà été obser-vées 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).

Il faut noter que le groupe de liaison 1 de la carte géné-tique de l'hybride intergénérique est constitué exclusiv-ement de marqueurs caractérisés par une distorsion de ségrégation et regroupe presque la moitié des loci affectés. 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. Deux hypo-thèses peuvent être envisagées :

- ce groupe n'en est pas un, les distorsions induisant des fausses liaisons ;
- ce groupe correspond vraiment à un chromosome et, dans ce cas, il est probable que cette distorsion générali-sée est liée aux conséquences d'une hétérozygotie struc-turelle au niveau de cette paire chromosomique.

L'hypothèse d'un faux groupe de liaison est peu vraisem-blable car les χ^2 d'indépendance qui testent l'hypo-thèse de liaison pour chaque couple de marqueurs sont tous significatifs. La contre-sélection d'un chromosome entier pourrait provenir des conséquences d'une hétéro-zygotie structurelle et d'une sélection gamétique favo-rable à un ou plusieurs allèles du mandarinier Cléopâtre.

Le groupe de liaison 3 comprend, à l'une de ses extré-mités, 5 marqueurs présentant des distorsions de ségré-gation. Un gradient de distorsion unimodal est obtenu avec un maximum au niveau des marqueurs VLc3.18 et VLc0.37. Ce profil semble suggérer la présence d'1 seul gène sélectionné au voisinage de ces deux marqueurs.

Les différences très marquées observées pour les taux de distorsions de ségrégation des marqueurs moléculaires, bien plus importants chez l'hybride intergénérique mâle que chez le pamplemoussier femelle, sont cohérentes 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 2 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) (Luro *et al.* 1995). Par ailleurs, la présence d'hétérozygotie structurelle 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 distorsions 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 sont généralement plus marquées du côté du parent mâle que du parent femelle.

conclusions

La réalisation d'une carte génétique à partir de marqueurs moléculaires est la première étape qui permet d'accéder à une meilleure connaissance de la génétique de reproduction des agrumes et à la localisation de gènes d'intérêt agronomique tels que les résistances aux maladies (tristeza, chancre citrique, phytophthora, etc.). Néanmoins, une carte génétique partielle comprenant une centaine de marqueurs répartis sur 12 groupes de liaison est insuffisante ; elle doit être complétée par de nouveaux marqueurs. Dans le cadre d'un programme d'amélioration, la présence de distorsions de ségrégation dans une région génomique particulière pourrait cependant compromettre l'utilisation de ces marqueurs moléculaires soumis aux effets de sélection. 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'introgession d'un fragment chromosomique, assisté par un marqueur moléculaire dont l'effet de distorsion entraîne une fausse liaison avec un caractère recherché dans un programme d'amélioration, est vouée à l'échec. Par conséquent, les connaissances sur la génétique de l'espèce étudiée apparaissent déterminantes pour connaître l'origine des distorsions et, donc, pour utiliser la méthode d'estimation la mieux appropriée à un programme de cartographie. ●

.....
Bibliographie, illustrations, voir version anglaise p. 404-408