

F3-CONTRÔLE GÉNÉTIQUE DE L'ORGANOGENESE *IN VITRO* CHEZ LE TOURNESOL (*HELIANTHUS ANNUUS L.*) ET IDENTIFICATIONS DES REGIONS CHROMOSOMIQUES IMPLIQUEES

Ericka Flores Berrios¹, Ahmad Sarafi¹, Gilbert Alibert¹, Georges Bertoni¹, André Bervillé² and Laurent Gentsbittel¹.

¹Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes, INP-ENSAT/UA INRA, Pôle de Biotechnologie Végétale, 18 chemin Borde Rouge, BP 107, 31326 Castanet, France, Fax : (33) 05.62.19.35.89, ² INRA, URGAP, Grande Cultures - 2 place Pierre Viala Bât. 33, 34060 Montpellier, France

Résumé : L'aptitude à la régénération d'un ensemble de lignées recombinantes et de leurs parents ('PAC-2' et 'RHA-266') a été testé par organogénèse. Le dispositif employé consistait en un essai en blocs randomisés avec trois répétitions. Une importante variabilité génétique a été observée chez les lignées recombinantes pour tous les caractères étudiés. Une comparaison entre la meilleure lignée recombinante et le meilleur parent fait apparaître un gain génétique significatif.

Le marquage moléculaire par AFLP, effectué sur un ensemble de quatre-vingt-dix-neuf lignées recombinantes et leurs parents a permis de construire une carte génétique comprenant 18 groupes de liaisons et 254 marqueurs. Des régions chromosomiques ayant un effet majeur sur l'organogénèse, ont été identifiées sur le groupe de liaison IX. Deux QTLs du groupe de liaison IX pourraient être impliqués dans le processus de l'organogénèse.

Mots clés : Tournesol, *Helianthus annuus L.*, Régénération *in vitro*, AFLP, QTL, Lignées recombinantes.

Summary : The present study was conducted to identify the genetic factors controlling *in vitro* regeneration in sunflower. Organogenesis, ability was investigated in a set of recombinant inbred lines (RILs) and their two parents (PAC-2 and RHA-266). The experiments was designed as randomized complete block with three replications. Genetic variability was observed among the RILs for all the regeneration traits studied. Some RILs presented significant differences when compared with the best parental line. Genetic gain in percentage of the best parent for the best RIL was significant.

A set of ninety nine RILs from the same cross and their two parents were screened with AFLP markers, a map with 18 linkage groups was constructed based on 254 linked loci. Two QTLs with large effect for organogenesis, in IX linkage group were detected which are likely to contain genes, important for the establishment of regenerable cultures.

Key words : Sunflower, *Helianthus annuus L.*, *in vitro* regeneration, AFLP, QTL, RIL.

INTRODUCTION

Parmi les différentes méthodes de culture *in vitro* utilisées chez le tournesol, l'organogénèse, a un intérêt particulier en raison de son application dans l'amélioration de cette espèce. Les travaux publiés par Pugliesi *et al.* (1991) montrent que l'aptitude à la régénération chez *Helianthus annuus* L. est contrôlée par l'interaction entre les régulateurs de croissance et par l'état physiologique de l'explant. Cependant, ces auteurs ne décèlent pas d'effet génotypique. Chraïbi *et al.* (1992) développent un système de régénération par organogénèse à partir de cotylédons de tournesol, démontrant un rôle important de l'éthylène dans le contrôle de la régénération, indépendant du facteur génotype. Flores *et al.* (1999) réalisent une étude comparative de l'effet de différents agents gélifiants sur l'organogénèse chez le tournesol.

Le contrôle génétique de la régénération par l'organogénèse *in vitro* chez le tournesol a fait l'objet d'un nombre limité de publications. Nestares *et al.* (1996) ont étudié un ensemble de lignées et des hybrides F₁ pour leurs aptitudes à la régénération à partir de cotylédons, montrant un effet génétique significatif. Ces résultats sont en accord avec les conclusions décrites par Sarrafi *et al.* (1996 a et b) qui soulignent la présence d'un contrôle additif pour la réponse à l'organogénèse *in vitro* chez 25 hybrides et leurs parents. Des résultats obtenus par Deglene *et al.* (1997) confirment l'importance de cet effet additif et mettent en évidence l'effet d'une interaction nucléo-cytoplasmique sur l'organogénèse.

L'optimisation de l'organogénèse *in vitro* et le transfert de cette aptitude aux génotypes récalcitrants, nécessitent la mise en place d'une approche permettant une connaissance approfondie du contrôle génétique de la réponse à la régénération. L'utilisation des marqueurs moléculaires, fournissent un outil performant dans la recherche de régions chromosomiques liées à un caractère d'intérêt. Les travaux de cartographie génétique chez le tournesol sont encore limités, ils portent majoritairement sur la systématique et la diversité génétique (Gentzbittel *et al.*, 1992 ; Lawson *et al.*, 1994 ; Gentzbittel *et al.*, 1995 ; Hongtrakul *et al.*, 1997 ; Sossey-Alaoui *et al.*, 1998).

Récemment, les cartes génétiques disponibles chez le tournesol ont permis l'identification de marqueurs liés à des gènes d'intérêt agronomique tels que la résistance aux maladies. La maladie causée par le champignon *Sclerotinia sclerotiorum* a fait l'objet de deux études, la première concerne l'analyse des QTLs associés à cette maladie (Mestriet *et al.*, 1998) et la

deuxième porte sur le clonage moléculaire de marqueurs liés à des QTLs majeurs pour la résistance à *Sclerotinia* (Gentzbittel *et al.*, 1998).

MATERIEL ET METHODES

Des lignées recombinantes F₈ utilisées dans nos expérimentations ont été créées par la méthode SSD (Single Seed Descent) par l'INRA (France) à partir du croisement entre les génotypes 'PAC-2' et 'RHA-266' d'*Helianthus annuus* L. Une analyse préalable appliquée sur les deux parents avait montré une différence significative entre ces deux génotypes concernant les paramètres de l'organogénèse.

Les amandes sont mises à germer dans des boîtes « Magenta » contenant 75 ml de milieu de germination MS (Murashige et Skoog, 1962, modifié par Chraïbi *et al.*, 1992). Quarante-huit heures après la mise en germination, les deux cotylédons développés à partir de chaque amande sont prélevés. Chaque cotylédon est excisé transversalement pour l'obtention de quatre explants par amande. Les quatre explants sont déposés dans une boîte de Petri (Ø 55mm) contenant 10 ml de milieu de régénération (Chraïbi *et al.*, 1991). Ils sont ensuite placés en chambre de culture, pendant quatre semaines, dans les mêmes conditions que pour la germination. Le dispositif expérimental consiste en un essai en blocs randomisés avec 77 génotypes (75 lignées recombinantes et leurs deux parents : 'PAC-2' et 'RHA-266' en trois répétitions. Chaque répétition comporte 10 boîtes de 4 explants. Après quatre semaines de culture, la régénération par organogénèse à partir de cotylédons a été évaluée à l'aide des paramètres suivants :

nombre de bourgeons par explant mis en culture (B/E).

nombre de bourgeons par explant organogène (B/EO).

Les données concernant les paramètres de l'organogénèse, ont été soumis à une analyse de variance à un facteur et les moyennes ont été comparées par le test de Newman et Keuls (P=0,05).

Des semis en serre de 99 lignées recombinantes et de leurs deux génotypes parentaux ('PAC-2' et 'RHA-266') ont été réalisés pour obtenir le matériel végétal nécessaire aux extractions d'ADN. Le protocole proposé par Amersham Life Sciences : (Nucleon Phytopure kit extraction and purification) a été utilisé, sur la base des rendements et de la qualité d'ADN obtenu ainsi que de la rapidité de la manipulation. Les réactions ont été réalisées conformément à la notice délivrée avec le kit : « AFLP™ Analysis System-I » et « AFLP Starter Primer kit protocole » commercialisé par Life Technologies. Les données issues du marquage AFLP ont été analysées par le logiciel MAPMAKER version 3.0 (Lander *et al.*,

1987). La recherche de QTLs liés aux paramètres de la régénération a été réalisée avec le logiciel QTL Cartographer Version 1.13 en utilisant le modèle 3 (SIM) et le modèle 6 (CIM). (Basten *et al*,1999)

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats présentés dans le chapitre concernant l'aptitude à la régénération *in vitro* de lignées recombinantes et de leurs parents par organogénèse, montrent une différence significative entre les deux parents pour les deux paramètres étudiés. Le génotype parental 'RHA-266' présente des valeurs significativement plus importantes que celles de la lignée parentale 'PAC-2' pour ce qui concerne les paramètres de l'organogénèse (Table 1). Plusieurs lignées recombinantes, montrent des valeurs plus importantes que le meilleur parent pour les deux paramètres de l'organogénèse étudiés. Ces lignées possèdent donc certainement un nombre important d'allèles positifs pour la régénération, venant de chacun de leurs deux parents par recombinaison génétique.

Le gain génétique chez la meilleure lignée recombinante sélectionnée par rapport au meilleur parent est significatif pour les deux paramètres de l'organogénèse étudiés (Table 1). Ces résultats montrent l'effet additif des gènes contrôlant la régénération évalués dans nos études.

Table 1. Comparaison des moyennes et le gain génétique des paramètres de l'organogénèse chez les parents (PAC-2 et RHA-266) et leurs lignées recombinantes F8.

	¹ B/E	² B/OE
'RHA266'	30.64	39.16
'PAC2'	7.84	10.67
'RHA266' - 'PAC2'	22.80*	28.49*
$\overline{X} P = ('RHA266' + 'PAC2') / 2$	19.24	24.91
$\overline{X} F_8$	30.34	39.41
$\overline{X} F_8 - \overline{X} P$	11.10	14.50
MLF ₈	88.91	97.26
MLF ₈ - 'RHA266'	58.27*	58.10*
LSD (0.05)	18.68	21.49

*: différence significative à P= 0.05

¹B/E : nombre de bourgeon par explant.

²B/EO : nombre de bourgeon par explant organogène.

³MLF₈ : meilleures lignée F₈.

La variabilité génétique et l'effet additif des gènes dans le contrôle des paramètres de la régénération à été également démontré par Sarrafi *et al.* (1996 a et b) et Deglene *et al.* (1997). Le tournesol possède un génome de grande taille, par conséquent la construction d'une carte génétique nécessite la mise en place de techniques susceptibles de fournir un grand nombre de marqueurs. La technique AFLP nous a permis de générer un grand nombre de marqueurs polymorphes, dans un intervalle de temps relativement court. Hongtrakul *et al.* (1997) ont également montré les avantages de cette méthode dans l'analyse de la diversité génétique chez le tournesol.

Un ensemble de 333 marqueurs a été retenu dans les analyses et 254 se sont placés dans 18 groupes de liaison. Pour les 89 marqueurs restants aucun liaison n'a été trouvée. La carte génétique obtenue possède une longueur génétique de 2833.7 cM, cette distance est plus importante que celle des cartes RFLP présentées par Gentzbittel *et al.* (1999).

Dans notre étude, les QTLs liés à l'aptitude à l'organogénèse ont été identifiés (Table 2).

Table 2. Position et effet des QTLs détectés chez les lignées recombinantes pour les paramètres de l'organogénèse chez le Tournesol.

Paramètres	QTL	Groupe de liaison	Intervalle	Log- de vrais semblance.	Longueur (cM)	Proportion de la variance expliquée ¹	Effet Additif (a)
B/E ¹	<i>ose2</i>	IX	catc20-catc7	2.37	5.9	0.13	4.32
	<i>ose3</i>	IX	ctat20-cgtg6	2.66	2.7	0.15	4.58
B/EO ²	<i>osr2</i>	IX	catc20-catc7	2.91	5.9	0.18	5.72
	<i>osr3</i>	IX	acag35-ctat20	3.15	3.0	0.16	5.03

¹B/E = Nombre de bourgeons par explant.

²B/EO = Nombre de bourgeons par explants organogène.

Les QTLs associés aux deux paramètres de l'organogénèse dans nos expérimentations sont co-localisés sur les groupes de liaison IX. Cette association peut être expliquée par la présence d'un locus affectant plusieurs caractères ou par différents loci étroitement associés.

La possibilité d'identifier des génotypes avec une bonne aptitude à la régénération par l'intermédiaire des marqueurs moléculaires peut être un moyen important pour le choix de génotypes et/ou la création de lignées adaptées à l'application des méthodes de biotechnologie telles que la transformation génétique.

References

- Basten CJ, Weir BS, Zeng Z-B (1999) QTL Cartographer Version 1.13 : Program in Statistical Genetics. Department of statistics. North Carolina State University.
- Berry ST, Leon AJ, Hanfrey CC, Challis P, Burkholz A, Barnes SR, Rufener GK, Lee M, Caligari PDS (1995) Molecular-marker analysis of *Helianthus annuus* L. 2. Construction of an RFLP map for cultivated sunflower. *Theor Appl Genet* 91 :195-199
- Chraïbi B, Latche A, Roustan JP, Fallot J (1991) Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of *Helianthus annuus* L. by the ethylene inhibitors, silver and cobalt. *Plant Cell Rep.* 10 :204-207
- Chraïbi M B, Castelle JC, Latche A, Roustan JP, Fallot J (1992) A genotype-independent system of regeneration from cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). The role of ethylene. *Plant Science* 89 :215-221
- Deglène L, Lesingnes P, Alibert G, Sarrafi A (1997) Genetic control of organogenesis in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell Tiss and Org Cult* 48 :127-130
- Flores Berrios E., Gentzbittel L., Serieys H., Alibert G., Sarafi A., (1999). Influence of genotype and gelling agents on *in vitro* regeneration by organogenesis in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell. Tiss. Cult.* (in press).
- Gentzbittel L., Perrault A., Nicolas P., (1992). Molecular phylogeny of the *Helianthus* genus, based on nuclear restriction-fragment-length-polymorphism (RFLP). *Mol. Biol. Evol.* 9(5) : 872-892.
- Gentzbittel L, Vear F, Zhang X-Y, Bervillé A, Nicolas P (1995) Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor Appl Genet* 90 :1079-1086
- Gentzbittel L., Mouzeyar S., Badaoui S., Mestries E., Vear F., Tourvieille De Labrouhe D., Nicolas P., (1998). Cloning of molecular markers for disease resistance in sunflower, *Helianthus annuus* L. *Theor. Appl. Genet.* 96 : 519-525
- Gentzbittel L, Mestries E, Mouzeyar S, Mazeyrat F, Badaoui S, Vear F, Tourvieille de Labrouhe D, Nicolas P (1999) A composite map of expressed sequences and phenotypic traits of the sunflower (*Helianthus annuus* L.) genome. *Theor Appl Genet* 99 :218-234
- Hongtrakul V, Huestis GM, Knapp S (1997) Amplified fragment length polymorphism as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm : genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theor Appl Genet* 95 :400-407
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L (1987) MAPMAKER : an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1 :174-181
- Lawson WR, Henry RJ, Kochman JK, Kong GA (1994) Genetic diversity in sunflower (*Helianthus annuus* L.) as revealed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Aust J Agric Res* 45 :1319-1327
- Mestries E, Gentzbittel L, Tourvieille de Labrouhe D, Nicolas P, Vear F (1998) Analysis of quantitative trait loci associated with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) using molecular markers. *Mol Breed* 4 :215-226
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15 :473-497
- Nestares G., Zorzoli R., Mro ginsky L., Picardi L., (1996). Plant regeneration from cotyledons derived from mature sunflower seedds. *Helia* 19(24) : 107-112
- Pugliesi C, Cecconi F, Mandolfo A, Baroncelli S (1991) Plant regeneration and genetic variability from tissue cultures of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breeding* 106 :114-121
- Sarrafi A, Bolandi AR, Serieys H, Bervillé A, Alibert G (1996a) Analysis of cotyledon culture to measure genetic variability for organogenesis parameters in sunflower (*Helianthus annuus* L.) *Plant Science* 121 :213-219
- Sarrafi A, Roustan JP, Fallot J, Alibert G (1996b) Genetic analysis of organogenesis in the cotyledons of zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus* L) *Theor Appl Genet* 92 :225-229
- Sossey-Alaoui K., Serieys H., Tersac M., Lambert P., Schilling E., Griveau Y., Kaan F., Bervillé A., (1998). Evidence for several genomes in *Helianthus annuus* L. *Theor. Appl. Genet.* 97 : 422-430