Réalisation d'une carte génétique de *Nicotiana tabacum* . Identification de QTLs associés à des caractères d'intérêts et liés à la qualité

Construction of a genetic map of Nicotiana tabacum. Identification of QTLs linked to traits of interest for quality improvement

Emilie Julio[1] *et François Dorlhac de Borne*[1]

(1) ALTADIS - Institut du Tabac - Domaine de la Tour - 24100 Bergerac - France

Résumé

L'incidence du tabagisme sur la santé publique a entraîné une sensibilisation des industriels du tabac à la notion de risque. La composition de la fumée dépend des propriétés physiques et chimiques de la plante, c'est à dire de la qualité de la matière première. Or, ces paramètres dépendent de réactions enzymatiques régulées par l'expression des gènes. Cependant, ces critères peuvent être sensibles à de nombreux facteurs environnementaux, et il est nécessaire de mener la culture jusqu'au séchage afin de pouvoir les évaluer. Ceci impose de trouver des indicateurs plus fiables, en relation avec le potentiel réel de chaque variété, comme les marqueurs moléculaires. La réalisation d'une carte génétique de *Nicotiana tabacum* serait un outil efficace venant en aide au sélectionneur. L'identification des différentes zones du génome liées aux caractères complexes tels que le rendement en goudrons de la fumée permettrait de mieux définir les cibles dans le travail de sélection.

Différentes techniques sont utilisées pour obtenir des marqueurs moléculaires. Parmi elles, l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) et l'ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) ont été sélectionnées afin de réaliser ce travail. La réalisation d'une carte génétique est basée sur l'observation de la ségrégation des marqueurs dans une population d'individus issus de parents fixés. Deux variétés ont été sélectionnées afin de servir de géniteurs, un hybride a été obtenu et autofécondé pour obtenir une population d'individus F2. 395 marqueurs polymorphes ont été obtenus sur les parents. Les individus F2 sont en cours d'analyse avec ces marqueurs polymorphes.

Parallèlement, des travaux préparatifs pour la recherche de QTLs liés à des caractères d'intérêts ont commencé. Des croisements sont en cours de réalisation afin d'obtenir des lignées recombinantes à partir de parents différant pour un grand nombre de caractères. Cette recherche s'appuiera sur les résultats obtenus dans la réalisation de la carte, et permettront d'aller plus loin dans l'identification des zones du génome ayant un intérêt pour l'amélioration de la qualité du tabac.

Abstract

Effect of smoking on public health get industrials of tobacco to preocupate of risks for smokers. Composition of smoke depends on plant physicals and chemicals properties, so it first depends on leaf quality. These parameters depend on enzymatics reactions, regulated by genes expression. However it can be subjected to environnemental influences, and varieties must be cured to be evaluated. Then it is necessary to find tools to evaluate the real potential of each variety. The achievement of a genetic map of tobacco should be an effective tool to identify genomics loci linked to complex characters such as tar yield of smoke.

Genetic mapping requires genetic materials such as a F2 population to observe markers segregation. Various techniques permits to obtain moleculars markers, such as AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) or ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). 395 markers were obtained with these techniques on two varieties used to generate 100 F2 individuals. Analysis of these plants are in process.

At the same time, preliminar work to identify QTLs (Quantitative Traits Loci) has begun. Crosses between representative varieties of burley and flue-cured are performed to obtain recombinant inbred lines (RILs). Construction of a genetic map will serve of basis for this stuy. It will allow us to identify genomic areas which are important for tobacco quality improvement.

1 - Introduction

L'industrie du tabac est aujourd'hui soumise à des contraintes réglementaires strictes, ainsi qu'à une attitude exigeante des consommateurs. Afin de réagir à cet environnement, des changements dans la façon d'appréhender le travail de recherche sont nécessaires : l'avis des producteurs de tabac, des consommateurs et des responsables de la santé publique doivent être pris en compte. Les programmes d'amélioration variétale doivent aujourd'hui définir de nouveaux objectifs comme la qualité de la matière première et sa composition chimique. En effet, afin de satisfaire aux attentes de la société, des caractères quantitatifs tels que la teneur en nicotine et en goudron doivent être mieux maîtrisés. La sélection actuelle doit donc combiner, dans ses nouvelles créations variétales, les caractères de culture comme les résistances aux pathogènes mais aussi et surtout les caractères chimiques et physiques de la plante.

Bien que la sélection classique ait obtenu des résultats encourageants (diminution de la teneur en goudrons de 20 à 15% de la matière sèche depuis 1989), elle ne parvient plus aujourd'hui à évoluer aussi rapidement. Les marqueurs moléculaires peuvent être un outil de sélection efficace et précis, permettant de mieux cibler le potentiel réel de chaque lignée. La sélection assistée par marqueurs ou SAM permet d'éliminer un environnement génétique par rétrocroisement, afin de favoriser l'introduction de gènes ou de QTLs d'intérêt. Un grand nombre d'informations peuvent être obtenues à un stade précoce, tout en éliminant le biais des facteurs environnementaux.

De telles cartes sont déjà disponibles pour de nombreuses solanées, comme la tomate (*Lycopersicon esculentum*), la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) ou le poivron (*Capsicum annuum*) (Tanksley *et al*, 1992 ; Prince *et al.*, 1993). Des tabacs possédant des caractéristiques chimiques plus en adéquation avec les attentes des différents acteurs de la filière tabac et des consommateurs pourraient ainsi être obtenus (potentiel en goudrons, alcaloïdes ou sucres). Chez le tabac, il existe quelques marqueurs liés à des gènes de résistance à certain pathogènes. Certains sont utilisés en sélection à un stade précoce pour éliminer des plantes ne contenant pas le gène cible recherché. Des marqueurs RAPD sont par ailleurs exploités en SAM pour introduire la résistance au PVY (Tajima *et al.*, 2002).

2 - Stratégie et outils

2.1. Principe de la réalisation d'une carte génétique

L'établissement d'une carte génétique nécessite la création d'une descendance en ségrégation issue d'un croisement par reproduction sexuée, ainsi que la caractérisation moléculaire des individus de la descendance. L'utilisation d'outils d'analyse statistique et de méthodes de calculs mathématiques permet alors d'estimer les distances génétiques entre les marqueurs moléculaires d'un même groupe de liaison, puis de les ordonner à l'intérieur de chaque groupe.

2.2. Choix des techniques d'études

Divers types de marqueurs moléculaires peuvent être utilisés : RFLP, RAPD, AFLP, microsatellites... Leur développement est assez récent sur tabac. A l'Institut du Tabac de Bergerac, les techniques de recherche de marqueurs moléculaires ont débuté avec la RAPD en 1993 (Coussirat, 1993). Plus répétable que la RAPD, l'AFLP a été choisi dès 1997 dans le cadre d'une étude interspécifique du genre Tabacum (Isidore, 1996). Elle a ensuite été reprise en 1999 pour l'évaluation du polymorphisme au sein de l'espèce *Nicotiana tabacum* (Julio, 1999).

2.2.1. L'AFLP

L'AFLP est une des 2 techniques choisies pour cette étude (**Fig. 1**). Elle a été mise au point par la société Keygene (Wageningen, Pays-Bas), et est protégée par un brevet (Vos *et al.*, 1995).

Elle est basée sur la révélation du polymorphisme de position des sites de restriction d'enzymes.

Suivant le génome étudié, la taille des fragments obtenus peut varier en jouant sur la combinaison des enzymes de restriction. Le couple EcoRI /MseI permet d'obtenir des fragments de taille inférieure à 500 pb, puisque MseI coupe en théorie toutes les 256 pb, son site de reconnaissance étant composé de 4 paires de bases. Il existe d'autres enzymes utilisables, comme PstI par exemple. La particularité de cette enzyme est d'être sensible à la méthylation de l'ADN. Dans ce cas, elle ne coupe pas (Castiglioni *et al.*, 1999). Cette particularité permet de modifier la répartition des marqueurs sur le génome.

Le polymorphisme est révélé à la fois par les enzymes de restriction et les bases sélectives, la plupart des fragments correspondant à des positions uniques dans le génome (Vos *et al*, 1995).

Les avantages de cette technique sont les suivants :
- seule une faible quantité d'ADN est nécessaire.
- à l'inverse de la RAPD, qui utilise des amorces arbitraires avec une faible température d'hybridation pendant la PCR, et conduit à des résultats peu reproductibles, les conditions de haute stringence en AFLP et l'utilisation de deux amorces correspondant à des adaptateurs permettent d'obtenir une bonne reproductibilité.
- de nombreux fragments amplifiés peuvent être révélés en changeant le couple d'enzymes de restriction ou les bases sélectives.
- aucune connaissance particulière de l'ADN génomique n'est requise.

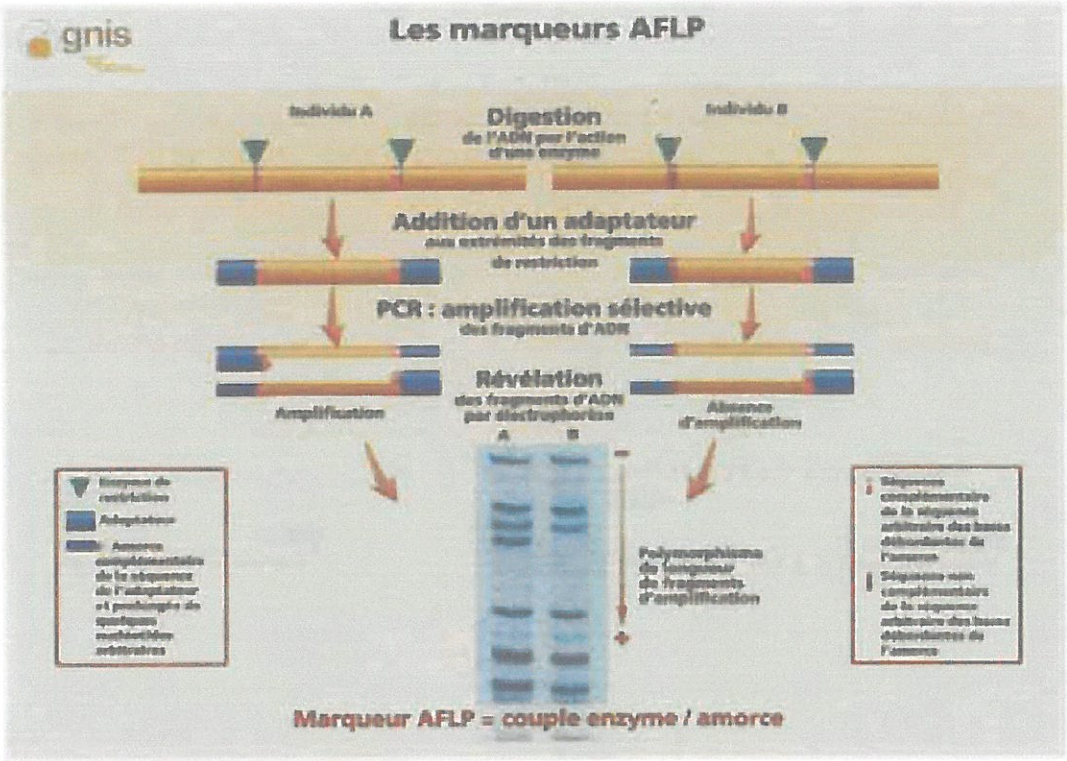

Figure 1

Principe de la technique AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

L'ADN génomique est dans un premier temps hydrolysé par un couple d'enzymes de restriction, à sites de reconnaissance de 6 et 4 paires de bases. Deux adaptateurs sont ensuite flanqués aux fragments de restriction. Ces oligonucléotides contiennent chacun un des deux sites de restriction, plus une vingtaine de paires de bases.

Dans un deuxième temps, les fragments subissent une amplification présélective par PCR, en utilisant des amorces correspondant à la séquence des adaptateurs, plus une base sélective arbitraire en 3' (vers l'intérieur du fragment à amplifier). 1/16 du génome est ainsi amplifié. Une amplification sélective est ensuite réalisée, avec deux bases sélectives supplémentaire.

2.2.2. L'ISSR

L'ISSR est une technique s'appuyant sur la présence des microsatellites dans les génomes végétaux. Les microsatellites sont des séquences de 2 à 5 paires de bases répétées en tandem (**Fig. 2**).

Ex : $(AT)_n$ (le plus abondant chez les végétaux), $(GA)_n$, $(CAA)_n$, $(GACA)_n$.

Les microsatellites de 2 nucléotides sont répartis tous les 30 à 100 kb dans le génome des végétaux supérieurs. Les microsatellites de 4 nucléotides sont plutôt localisés aux centromères et aux télomères. On leur attribue un rôle dans la recombinaison méiotique (points chauds de recombinaison)(Li *et al.*, 2002). Le polymorphisme est déterminé par le nombre d'unités de répétitions, ils peuvent être révélés individuellement par le clonage des régions bordantes, ou en masse.

La technique ISSR consiste à révéler en masse des microsatellites. Les amorces sont constituées d'une partie d'une séquence de microsatellite (4 à 6 répétitions selon sa taille) et d'une à trois bases arbitraires sélectives en 3' ou en 5'. L'amplification par PCR va révéler de

nombreux fragments flanqués de part et d'autre du même microsatellite en orientation inversée. Le polymorphisme dépend ici du nombre d'unité de répétitions, il est très élevé pour une technicité et un coût faible (Zietkiewicz *et al.*, 1994). L'avantage de cette technique est qu'elle ne nécessite pas de connaissance particulière des séquences d'ADN, et que les cibles des amorces sont très abondantes dans le génome des plantes.

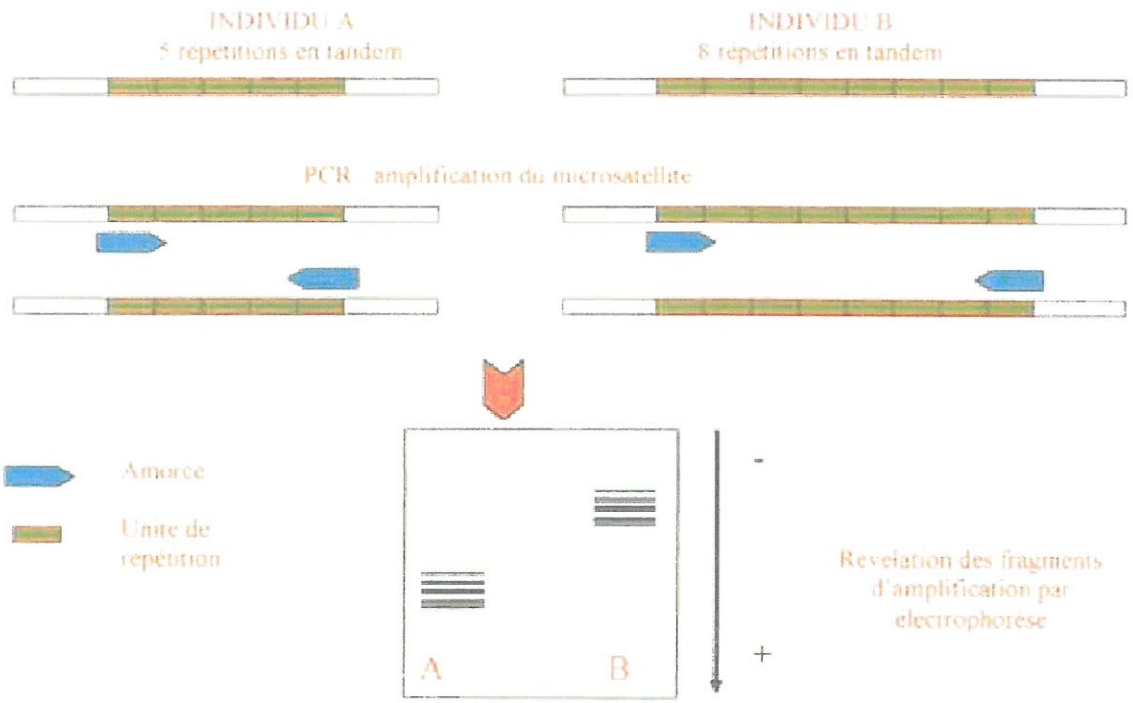

Figure 2

Polymorphisme du nombre d'unités de répétitions des motifs microsatellites entre un individu A et un individu B. Le nombre de répétitions du motif microsatellite est supérieur chez l'individu B, ce qui génère un fragment amplifié plus long. La visualisation sur gel de plusieurs bandes pour l'amplification d'un seul fragment correspond à des « dérapages » de la Taq polymérase sur ces motifs hautement répétés.

2.3. L'analyse par électrophorèse capillaire ABI310

Un appareil d'analyse automatique ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, commercialisé par Applied Biosystems, permet de remplacer les analyses classiques sur gel de polyacrylamide, et d'identifier avec précision la taille des fragments obtenus.

Le principe est celui d'une électrophorèse capillaire, pilotée par un micro ordinateur pour l'automatisation des analyses et le traitement des données. Chaque échantillon est étiqueté avec un fluorochrome, qui peut être soit une cytosine marquée, soit directement une amorce marquée en 5' utilisée pour les réactions de PCR. Chaque échantillon comprend également un standard de taille interne marqué allant de 50 à 500 kb, qui permet de déterminer la taille des fragments analysés. Les avantages de cette technique sont nombreux : tout d'abord, l'appareil peut fonctionner en continue grâce à la programmation du passage des échantillons. L'échantillonneur est semblable à une plaque ELISA et peut porter jusqu'à 96 puits. De plus, le système de détection peut reconnaître 4 molécules fluorescentes différentes, ce qui permet

d'analyser 4 échantillons dans un seul puit. D'autre part, la détection s'effectue avec une précision de 0,5 base et permet une analyse fine. Enfin, le traitement informatique des données par des logiciels adaptés permet un gain de temps important et réduit les risques d'erreurs.

L'utilisation de ce type d'appareil présente un autre avantage important : il permet de «quantifier» les fragments, ainsi les hétérozygotes peuvent être distingués des homozygotes positifs. Ceci est avantageux car les populations F2 sont hétérozygotes. Les marqueurs AFLP sont en général dominants. Avec ce type d'analyse, certains peuvent devenir codominants.

3 - Résultats obtenus

3.1. Carte génétique

3.1.1. Choix des parents

La plupart des cartes sont basées sur des F2 issues de croisements interspécifiques, ce qui permet d'obtenir un polymorphisme supérieur. L'espèce *Nicotiana tabacum* semble très récalcitrante à ces croisements (Kostoff, 1941). Des croisements entre *N. tabacum*, du genre Tabacum, et des espèces du genre Pétunioïdes ou Rustica n'ont pas permis d'obtenir d'hybride fertile. Afin d'obtenir un nombre de marqueurs suffisant, nous avons choisi d'explorer la voie des tabacs «ancestraux». Contrairement aux tabacs de l'ITB, ils ont subi peu de croisements et donc leur génome ne tend pas à s'uniformiser. De plus, ils appartiennent à l'espèce *N. tabacum*, ils devraient donc pouvoir s'hybrider plus facilement avec les tabacs de l'ITB.

Parmi les tabacs ancestraux, les suivants ont été testés : Alipes, Calycina, Chinensis, Fructicosa, Lacerata, Lancifolia. By21, K399, Xanthi NC, et Samsoun H ont été retenus pour les variétés plus classiques.

Figure 3
Variété K399 de type Virginie (*Nicotiana tabacum*)

Figure 4
Variété Alipes, «archétype» (*Nicotiana tabacum*)

Ces deux variétés, différentes visuellement et surtout moléculairement, ont été choisies comme parents pour obtenir une population F2 en ségrégation servant à réaliser une carte génétique du tabac.

K399 a été sélectionné d'après une étude antérieure (Julio E., 2001), où les analyses AFLP l'ont montré plus éloigné génétiquement des autres. Alipes a été retenu parmi les archétypes, car il est un des plus anciens entré en collection à l'ITB. De plus, il donne, avec quelques couples d'amorces AFLP, plus de polymorphisme avec K399 que les autres tabacs ancestraux.

Ces 2 variétés ont été croisées dans les deux sens, une F1 a été obtenue et autofécondée. Une centaine d'individus F2 ont été retenus de façon aléatoire pour réaliser la carte génétique (**Fig. 3 et 4**).

3.1.2. Marqueurs polymorphes obtenus sur les parents

Utilisation des enzymes EcoRI et MseI (**Fig. 5**) :

Le kit AFLP Analysis System I (Invitrogen) a été utilisé. 256 combinaisons d'amorces ont été testées, et 95 marqueurs ont été révélés. Une moyenne de 0,37 marqueurs par combinaison d'amorces est obtenue. Certaines amorces sont plus susceptibles de révéler du polymorphisme : les amorces EcoRI E-ACA, E-ACC, E-AAC sont les plus efficaces. M-CGC, M-CGG et M-CGT sont à privilégier pour les amorces du type MseI .

L'utilisation de bases sélectives différentes a permis de doubler le nombre de combinaisons d'amorces possibles : lors de l'étape de préamplification, la base sélective A sur l'amorce EcoRI a été remplacée par C, et la base sélective C sur l'amorce MseI a été remplacée par G. Cette stratégie a permis d'obtenir 64 marqueurs AFLP supplémentaires, soient 159 marqueurs AFLP EcoRI/MseI au total.

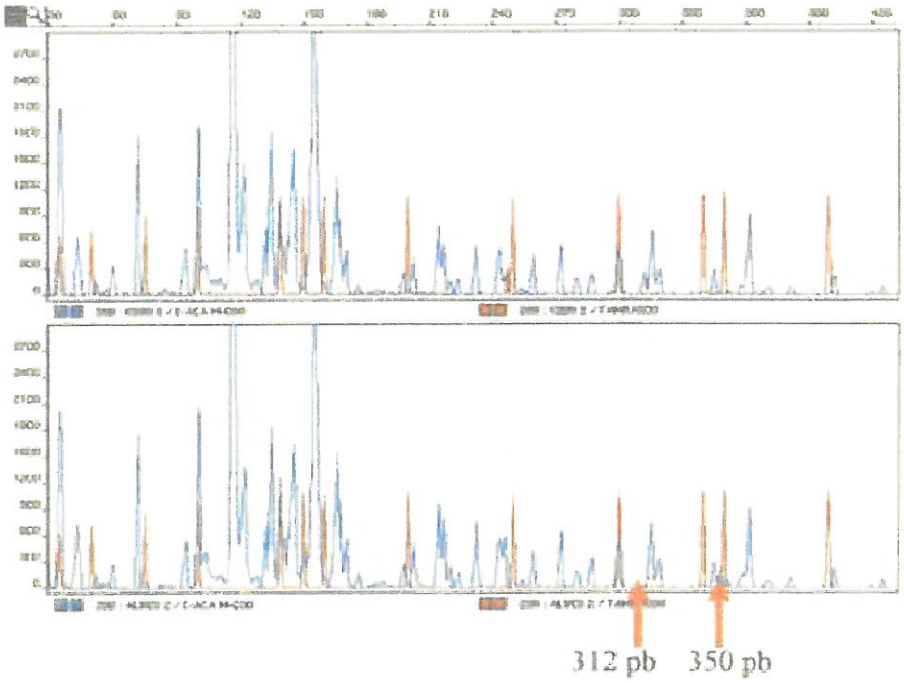

Figure 5

Profils AFLP obtenus sur les variétés K399 et Alipes. Les enzymes EcoRI et MseI ont été utilisées, les amorces E-ACA M-CGG ont permis d'obtenir deux fragments polymorphes, dont un à 312 pb, présent chez K399 et l'autre à 350 pb, présent chez Alipes.

Utilisation des enzymes PstI et MseI en AFLP :

L'enzyme «rare cutter» (coupure rare) PstI a été utilisée en combinaison avec MseI.

Les 256 combinaisons d'amorces testées ont permis d'obtenir 104 marqueurs polymorphes, soit 0,40 marqueurs par combinaison. De même, certaines amorces se sont montrées plus efficaces, comme P-AAA, P-ACG, P-ATA, M-CAT, M-CTC et M-CTG.

De la même façon, les bases sélectives ont été modifiées. La base sélective A sur l'amorce PstI a été remplacée par C, et la base sélective C sur l'amorce MseI a été remplacée par G. 83 marqueurs supplémentaires ont été obtenus, soient 187 marqueurs AFLP PstI/MseI au total.

Obtention de marqueurs ISSR

A ce jour, 228 combinaisons d'amorces ont permis de détecter 50 marqueurs polymorphes potentiels, dont :

- 15 marqueurs codominants de taille différente (**Fig. 6**)
- 35 marqueurs dominants différents par leur présence ou leur absence (**Fig. 7**)

Par la suite, les séquences de ces marqueurs seront déterminées. L'utilisation de la technique de révélation au nitrate d'argent devrait permettre d'isoler les microsatellites sur gel de polyacrylamide. De plus, l'électrophorèse capillaire ne permet de visualiser que les fragments de taille inférieure à 600-700 pb. Les fragments amplifiés par ISSR peuvent avoir une taille supérieure à 1 kb. Ils seront visibles sur gel de polyacrylamide, ce qui devrait augmenter le nombre de marqueurs ISSR polymorphes.

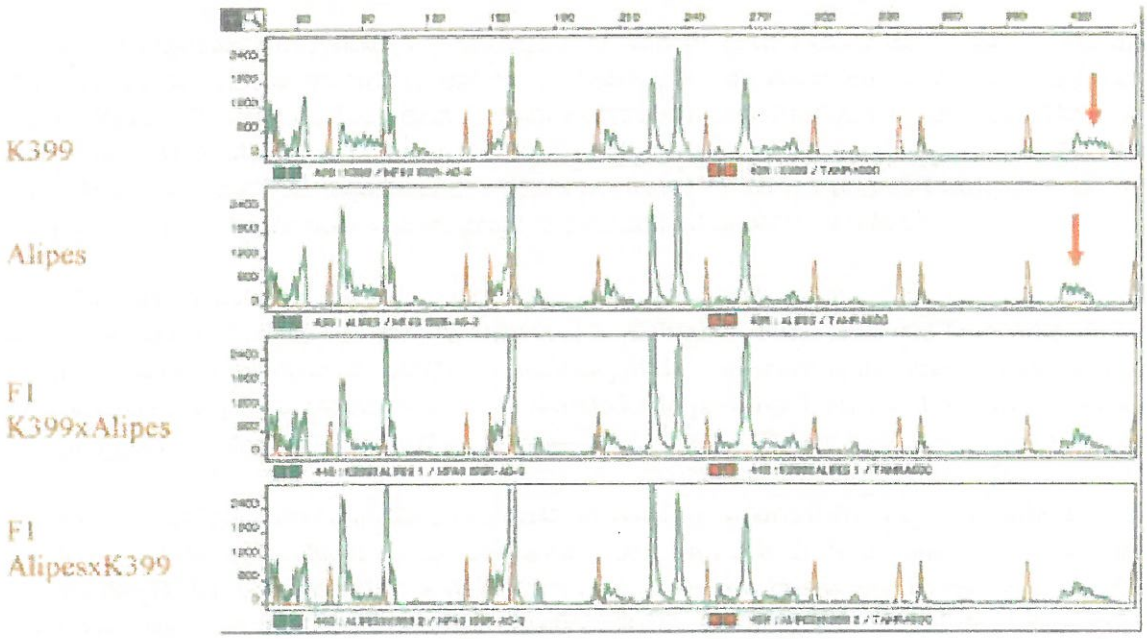

Figure 6

Amplification ISSR avec les amorces MF43 (ctcaagaagaagaagaag) et AG-3 (cyagagagagagagag) chez les individus K399, Alipes, un individu F1 (K399 x Alipes) et un individu F1 (Alipes x K399). Chez K399, un fragment de 422 à 432 pb est amplifié, il se situe entre 416 et 424 pb chez Alipes. Chez les individus F1 hétérozygotes, les fragments amplifiés sont la somme des fragments parentaux (416 à 432 pb).

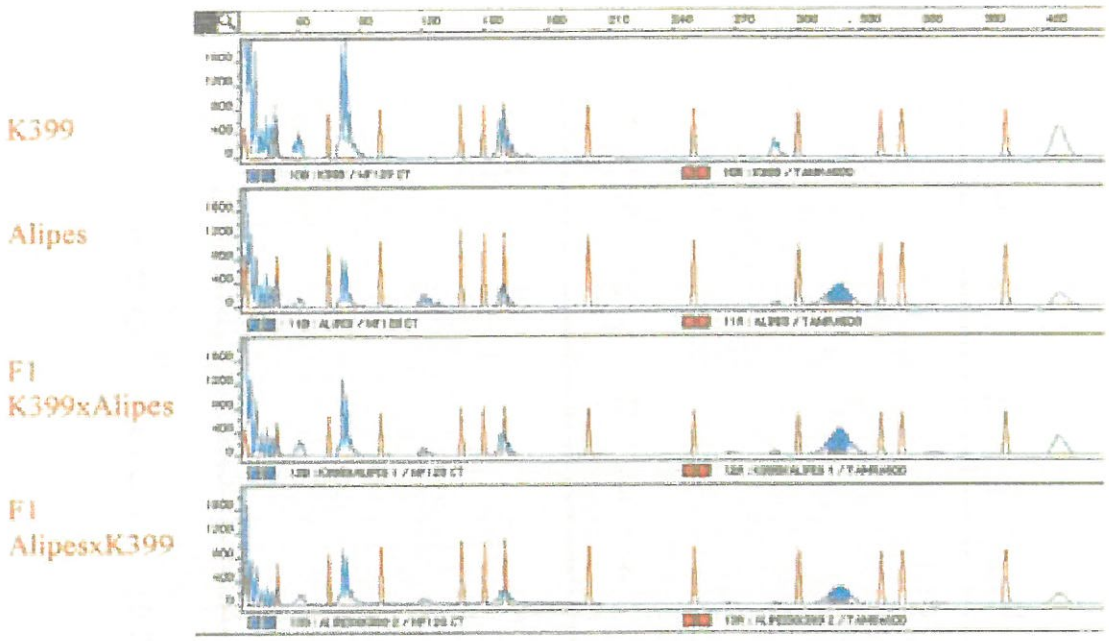

Figure 7

Amplification ISSR avec les amorces MF129 (HVHTGTGTGTGTGTGTG) et CT (ctctctctctctctctt) chez les individus K399, Alipes, un individu F1 (K399 x Alipes) et un individu F1 (Alipes x K399). Un fragment centré à 320 pb est amplifié chez K399, et aucun fragment n'est amplifié chez Alipes. On retrouve le fragment centré à 320 pb chez les individus F1. C'est un marqueur dominant.

4 - Nouvelles voies de recherche

Les marqueurs moléculaires sont largement utilisés pour l'étude de l'organisation des génomes, et des cartes génétiques ont été réalisées pour de nombreuses espèces. Les marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) sont des séquences ADNc, de gènes, ou d'ADN aléatoire, pouvant révéler du polymorphisme de site de restriction. Le haut degré de conservation de séquences des gènes pendant l'évolution permet l'utilisation de ces marqueurs d'une espèce pour la cartographie génétique d'espèces proches.

Chez les solanacées, des études de cartographie comparative ont été réalisées : la plupart des marqueurs sont conservés entre la tomate et la pomme de terre, ainsi que leur ordre sur les chromosomes (Tanksley *et al.*, 1992). Un haut degré de conservation du répertoire de gènes a été trouvé en comparant les génomes de la tomate et du poivron, bien que des réarrangements fassent apparaître des différences (Livigstone *et al.*, 1999)(**Fig. 8**).

Cette propriété, aussi appelée colinéarité ou synténie, pourrait être exploitée afin de faciliter le travail de recherche et de positionnement de gènes d'intérêts sur une carte génétique. Des sondes RFLP correspondant à des gènes de tomate pourraient être testée sur tabac. Le choix des sondes permettant ces comparaisons peut être facilité par le travail de Fulton, qui a déjà identifié les séquences uniques conservées entre la tomate et le tabac.

Le même principe peut être appliqué à d'autres types de structure de l'ADN, comme les microsatellites par exemple. Il suffit de tester les amorces connues pour amplifier des microsatellites hautement polymorphes chez la tomate sur le tabac.

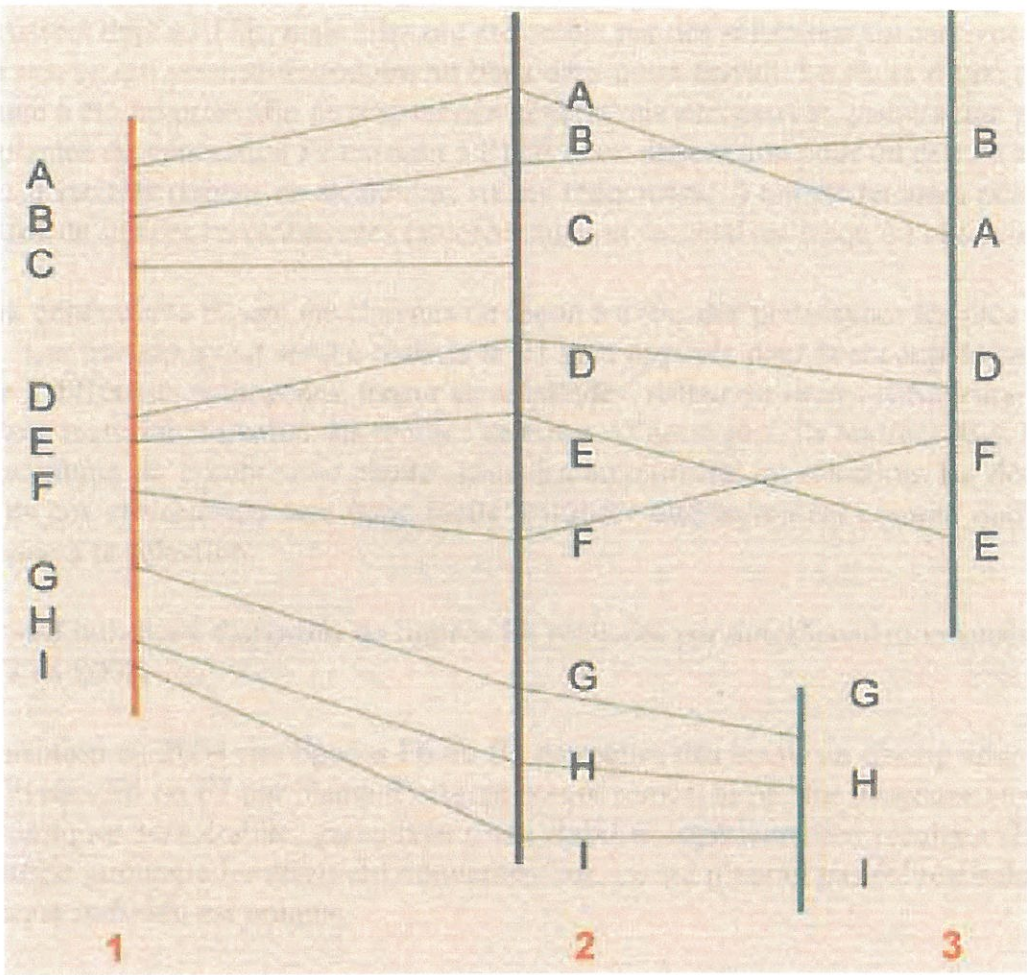

Figure 8

exemples de colinéarité

L'utilisation du même type de marqueurs moléculaires (A-F) pour des cartographies génétiques permet l'alignement des cartes des chromosomes. Les cartes 1 et 2 montrent une colinéarité complète, tous les marqueurs sont retrouvés dans le même ordre. A gauche, en comparant les cartes 2 et 3, on trouve 3 sortes d'évènements :

- une inversion : l'ordre des marqueurs peut être inversée (A et B, F et E)
- une délétion : un marqueur est absent (C)
- une translocation : une partie des marqueurs se retrouvent sur un autre chromosome (G, H et I)

5 - Travaux préliminaires pour la recherche de QTls

La localisation de QTLs s'appuiera sur la carte génétique de *Nicotiana tabacum* réalisée à partir de la génération F2 issue du croisement initial entre K399 et Alipes.

Lors d'une étude de recherche de QTLs, la nature de la population utilisée est essentielle : les hétérozygotes de population F2 ont un haut pouvoir informatif, mais qui peut s'avérer nul si l'on considère uniquement des marqueurs dominants (AFLP). Le polymorphisme étant plus faible dans des croisements de tabacs appartenant au même type (virginie ou burley), il sera important d'obtenir un grand nombre de marqueurs polymorphes.

Une très haute densité de marqueurs dominants peut compenser le manque de polymorphisme dans des populations fixées homozygotes à plus de 96 %, comme des lignées recombinantes, même si elles proviennent de parents assez proches.

C'est donc l'étude d'une population de lignées recombinantes qui a été choisie. De telles lignées existent déjà à l'ITB, mais elles ont été créées par des sélections successives selon certains critères, ce qui pourrait introduire un biais dans notre travail. Le choix d'une population F2 existante a été favorisé afin de réaliser des générations successives, jusqu'à une population F6. Des plantes de génération F2 existant à l'ITB et en disjonction pour un certain nombre de caractères d'intérêts (teneur en alcaloïdes, sucres réducteurs...) ont été retenues pour préparer une centaine de lignées recombinantes (autofécondation successives jusqu'à l'obtention de F6).

Deux générations F2 ont été choisies de façon à avoir des phénotypes les plus différents possibles. Les parents ayant servi à réaliser la F1 sont opposés pour beaucoup de caractères : résistance à différents pathogènes, teneur en alcaloïdes, teneur en sucres réducteurs, précocité de floraison, maturité et qualité des feuilles de tabac. D'autre part, ils rentrent dans la composition génomique de nombreuses plantes utilisées aujourd'hui en sélection. La détection de QTLs dans ces croisements sera donc facile à utiliser ultérieurement comme outil pouvant venir en aide à la sélection.

Aujourd'hui, nous disposons de lignées F4 réalisées par autofécondation successives de plantes F2 en 2002.

L'obtention en 2004 des lignées F6 ou F7 permettra des essais au champ adaptés : plusieurs individus F6 ou F7 par plante d'origine seront semés, ainsi, une moyenne sur les paramètres chimiques sera établie, garantissant une fiabilité supérieure des résultats (**Fig. 9**). Cette stratégie gommera les effets environnementaux, ce qui n'aurait pas été réalisable sur une F2 ou chaque individu est unique.

Les plantes de génération F2 , ainsi que les parents ayant servi à réaliser les croisements et à obtenir les hybrides F1 sont :

- Une F2 issue d'une F1 dont les parents sont de type Virginie.
- Une F2 issue d'une F1 dont les parents sont de type Burley.

Observations prévues

Burleys et Virginies sont cultivés pour des caractéristiques et des utilisations différentes. Ils seront évalués sur un certain nombre de critères communs et des critères propres à chaque type de tabac :

Burley	**Virginie**
Observations morphologiques en champs	
gommes	gommes
forme de feuille	forme de feuille : pétiole
	coloration
Observations des feuilles après cueillette et durant séchage	
	durée de jaunissement
	durée de végétation
indice qualité	indice qualité

expertise	expertise
Etude de la composition chimique	
alcaloïdes totaux	alcaloïdes totaux
cendres	cendres
azote	azote
	sucres réducteurs
amoniac	
nornicotine	nornicotine
Marqueyrs moléculaires	
test PCR de marqueur de résistance à des pathogènes	test PCR de marqueur de résistance à des pathogènes
détection QTLs : marqueurs AFLP, ISSR, SSAP	détection QTLs : marqueurs AFLP, ISSR, SSAP

Pour l'instant, l'autofécondation des F2 a permis d'obtenir des plantules F3, puis des F4 qui sont actuellement cultivées en serre pour obtenir la génération suivante.

6 - Conclusion et perspectives

Nous disposons actuellement de 346 marqueurs AFLP et de 50 marqueurs ISSR. Les 159 marqueurs EcoRI/MseI ont été obtenus avec 119 combinaisons d'amorces, et les 187 marqueurs PstI/MseI ont été obtenus avec 138 combinaisons d'amorces. 257 combinaisons au total sont donc à tester sur la centaine d'individus F2.

A ces marqueurs AFLP et ISSR, des marqueurs SSAP développés par M.A. Grandbastien (INRA Versailles) viendront s'ajouter. Ces marqueurs, basés sur le polymorphisme d'insertions de rétrotransposons, seront complémentaires par leur positionnement différent sur le génome.

L'analyse de la centaine d'individus F2 par AFLP est largement commencé mais il pourrait être accéléré par l'acquisition d'une électrophorèse capillaire multicanaux.

Le faible polymorphisme existant au sein de N. tabacum a été observé avec diverses techniques d'obtention de marqueurs moléculaires. Il en résulte un nombre d'analyses important, puisqu'un couple d'amorces AFLP ne donne que de 1 à 3 marqueurs polymorphes au maximum. L'utilisation de diverses techniques de marqueurs moléculaires a pour but d'accroître le polymorphisme entre les variétés choisies, afin de couvrir la majeure partie du génome du tabac.

Les lignées recombinantes seront testées avec les marqueurs moléculaires présents sur la carte génétique (marqueurs AFLP, ISSR et S-SAP). Les évaluations morphologiques et chimiques de ces plantes seront corrélées à la répartition des marqueurs moléculaires par

l'intermédiaire d'un logiciel adapté tel que Mapmaker QTLs ou Mapmanager XP. Ces logiciels devraient nous permettre de détecter les régions du génome impliquées dans l'expression de ces caractères, grâce aux marqueurs moléculaires se trouvant en bordure ou dans ces régions.

Ce travail de longue haleine devrait trouver de nombreuses applications dans le processus de sélection de variétés de tabac de qualité, répondant à un maximum de critères d'intérêts agronomiques ou commerciaux.

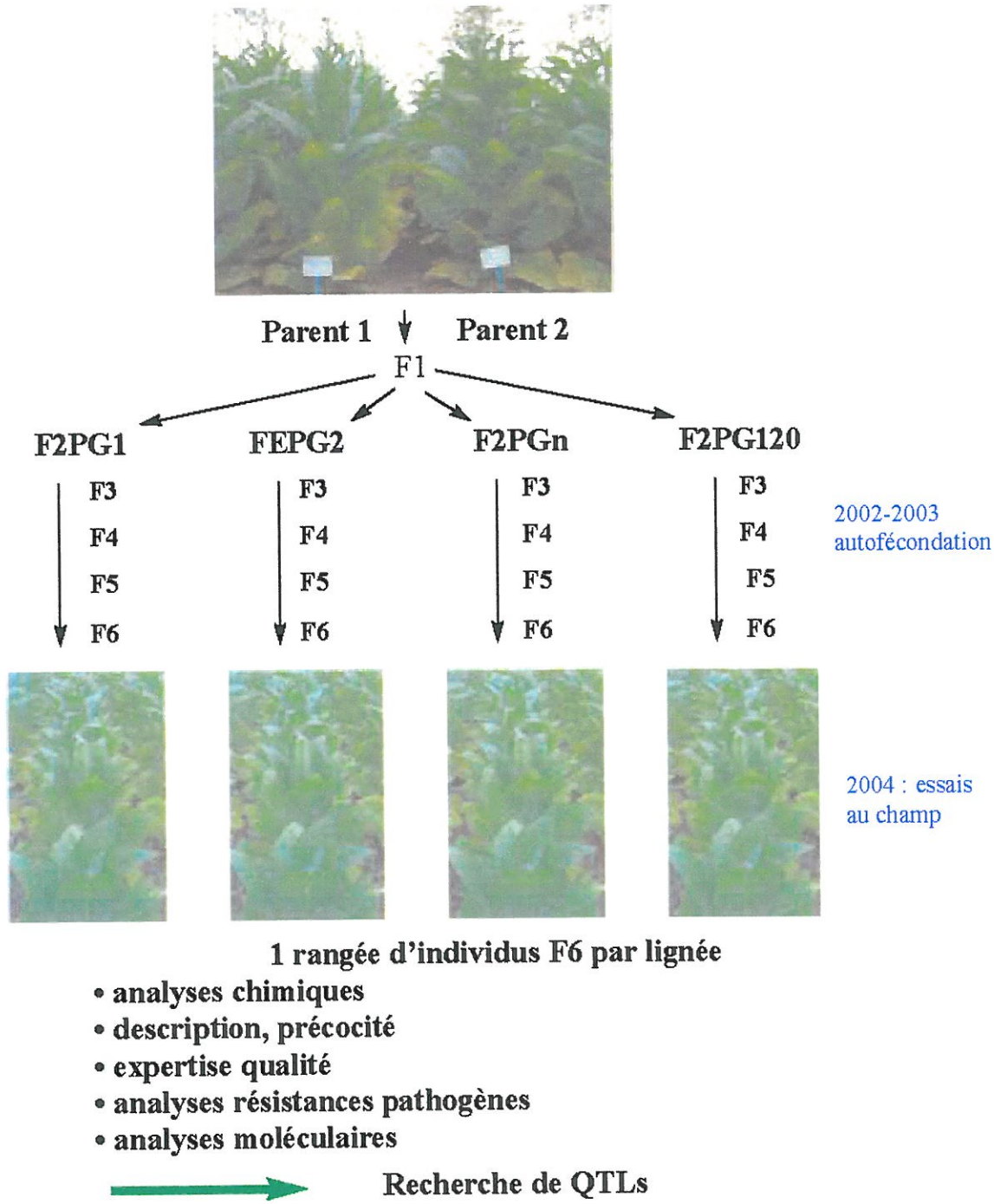

Figure 9
Résumé des travaux prévus pour la recherche de QTLs

Bibliographie

Castiglioni P., Ajmone Marsan P., van Wijk R., Motto M. (1999) AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution. *Theor Appl Genet* 99:425-431

Coussirat J. (1993) Empreintes génétiques du tabac par RAPD. Utilisation de marqueurs pour identifier des hybrides somatiques entre Nicotiana tabacum et Nicotiana rustica L. *In Annales du Tabac*, pp 1-6 Seita

Fulton TM, Van der Hoeven R, Eannetta NT, Tanksley SD. (2002) Identification, analysis, and utilization of conserved ortholog set markers for comparative genomics in higher plants. *Plant Cell Jul*,14(7):1457-67

Isidore E., (1996) Elaboration d'un arbre phylogénétique des Nicotianées en vue de l'étude du mode de transmission du rétrotransposon TNT1. Soutenance de DESS.

Julio E. (2001) Obtention de marqueurs moléculaires impliqués dans l'amélioration qualitative du tabac. Mémoire de DRT, Université Paul Sabatier , Toulouse

Kostoff D. (1941) Ontogeny, genetics, and cytology of Nicotiana hybrids (Sofia university) Genetica XII

Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol Dec*,11(12):2453-65

Livingstone KD, Lackney VK, Blauth JR, van Wijk R, Jahn MK. (1999) Genome mapping in capsicum and the evolution of genome structure in the solanaceae. *Genetics Jul*,152(3):1183-202

Prince J.P., Pochard E., Tanksley SD. (1993) Construction of a molecular linkage map of pepper and comparison of synteny with tomato. *Genome 1993*; 36:404-417

Tanksley SD, Ganal MW., Prince J.P. (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics 132*:1141-1160

Tajima T., Noguchi S., Tanoue W., Negishi H., Nakakawaji T., Ohno T. (2002) Background selection using DNA markers in backcross breeding program for Potato Virus Y resistance of tobacco. *Breeding Science* 52 : 253-257

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M ., (1995) AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research 21* : 4407-4414

Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. (1994) Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)- Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics 20*: 176-183