

Suivi des introgressions dans les croisements interspécifiques chez le riz : utilisation des marqueurs moléculaires

A Ghesquière¹, O Panaud², P Marmey¹,
MC Gavalda¹, O Leblanc¹, D Grimanelli¹

¹ Centre ORSTOM de Montpellier, laboratoire de ressources génétiques et d'amélioration des plantes, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France ;

² Cornell University, Plant Breeding and Biometry Department,
Ithaca NY 14853, États-Unis

Résumé – La diversité génétique des espèces sauvages de riz est d'un grand intérêt en amélioration des plantes. Malgré de fortes barrières reproductives, des hybrides interspécifiques peuvent être obtenus grâce à la récupération des embryons par culture *in vitro* et être recroisés ensuite pour introduire des caractères utiles dans les riz cultivés. Au fur et à mesure que la carte de liaison génétique RFLP (polymorphisme de longueur de fragment de restriction) devient de plus en plus saturée, les marqueurs moléculaires constituent un nouvel outil puissant pour analyser et comprendre les mécanismes de la recombinaison dans les croisements éloignés. Trois exemples d'application des marqueurs moléculaires au suivi des introgressions sont présentés à partir d'activités développées à l'ORSTOM (Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération) de Montpellier ou de collaborations avec l'IRRI (Institut international de recherche sur le riz, Philippines) et l'Université Cornell (États-Unis). Ils concernent l'analyse de générations précoces ou de lignées isogéniques développées avec des espèces sauvages de riz possédant le même génome que le riz cultivé (*O longistaminata*) ou des génomes cytogénétiquement différents (*O brachyantha*, génome F) et (*O australiensis*, génome E).

riz / hybridation interspécifique / marqueur moléculaire / recombinaison / carte génétique

Summary – Analysis of introgressions in interspecific crosses of rice: utilization of molecular markers. Genetic diversity of wild rice species is of great interest to breeding. Although there are strong reproductive barriers, interspecific hybrids can be obtained through embryo rescue, and back-crossed to introduce useful characters into cultivated rice. As the rice RFLP (restriction fragment length polymorphism) linkage map becomes more and more saturated, mapped molecular markers provide a new and powerful

ORSTOM Fonds Documentaire

N° 41.177 ex 1

Cote : B

16 MARS 1995

tool to investigate and understand the recombination process in distant crosses. Three different examples of application of molecular markers for introgression monitoring are presented. They include work at ORSTOM (Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération) Montpellier and collaborative research with IRRI (International Rice Research Institute, Philippines) and Cornell University (USA). This work involves the analysis of early generations or isogenic lines developed with wild rice species possessing the same genome as cultivated rice (*O. longistaminata*) or cytogenetically different genomes (*O. brachyantha*, F genome; *O. australiensis*, E genome).

rice / interspecific hybridization / molecular marker / recombination / genetic map

INTRODUCTION

Le développement de cartes de liaison génétique basées sur les marqueurs moléculaires permet d'identifier et de localiser des marqueurs de caractères d'intérêt agronomique. Chez le riz, l'établissement de telles cartes de liaison génétique est en constante progression et la première carte complète avec 12 groupes de liaison a été développée à partir d'une population *back cross* dérivée d'un hybride interspécifique *O. sativa* × *O. longistaminata* (Causse *et al.*, 1992); cette carte comporte désormais plus de 600 marqueurs sur 1222 cM (Tanksley *et al.*, 1992). Une autre carte est en cours d'élaboration au Japon à partir de croisements entre variétés *indica* et *japonica* avec l'objectif d'intégrer en même temps des marqueurs morphologiques et physiologiques (Saito *et al.*, 1991); elle comporte également plus de 600 marqueurs cartographiés (Kurata *et al.*, 1992). Des échanges concernant 70 sondes RFLP ont permis de comparer les différentes cartes obtenues et de vérifier la colinéarité des marqueurs tout en mettant en évidence des zones plus ou moins densément marquées (Xiao *et al.*, 1992). L'identification de gènes d'intérêt agronomique est entreprise et se base essentiellement sur la comparaison du polymorphisme RFLP entre lignées isogéniques-donneur-parent récurrent; elle a permis de localiser des résistances spécifiques à certaines maladies comme la pyriculariose (*Pyricularia oryzae*), (Yu *et al.*, 1991) ou la bactériose foliaire (*Xanthomonas oryzae*), (Yoshimura *et al.*, 1992), ainsi qu'à d'autres caractères : photopériode (MacKill *et al.*, 1992), arôme des grains (Ahn *et al.*, 1992). Il existe dans le genre *Oryza* de nombreuses espèces sauvages et 5 génomes cytogénétiquement différents de celui des riz cultivés (A) ont été identifiés avec des formes tétraploïdes BBCC et CCDD (Nayar, 1973). L'utilisation de ces espèces sauvages connaît un développement important parce que d'une part ces espèces présentent un potentiel de diversité adaptative très important, particulièrement en gènes de résistance à des pathogènes variés (Bonman *et al.*, 1992) et d'autre part parce que les possibilités de sauvetage d'embryons par culture *in vitro* permettent de s'affranchir des barrières reproductives et de réaliser des hybridations interspécifiques avec un très grand nombre d'espèces (Jena et Khush 1984; Brar *et al.*, 1991). L'utilisation des marqueurs moléculaires cartographiés constitue un nouveau moyen d'étudier la recombinaison et de suivre les introgressions dans les hybridations interspécifiques éloignées. Trois exemples d'application des marqueurs moléculaires dans ce domaine sont présentés à partir de travaux réalisés au centre ORSTOM de Montpellier ainsi que sur des descendance

étudiées à l'Institut international de recherche sur le riz aux Philippines (IRRI) et l'Université Cornell (États-Unis).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Développement du matériel végétal

La création du matériel végétal mettant en jeu les espèces sauvages possédant des génomes différents fait partie d'un programme d'hybridation distante développé à l'IRRI et suit un schéma similaire quelles que soient les espèces (fig 1) : à partir d'un très grand nombre de pollinisations, la récupération des embryons par culture *in vitro* permet d'obtenir quelques hybrides F1; ceux-ci sont complètement mâle et femelle stériles, ils montrent en méiose 24 univalents correspondant au stock haploïde du génome A et du génome de l'espèce sauvage utilisé dans le croisement. Dans les combinaisons réalisées entre *O sativa* et *O australiensis*, la stérilité totale des hybrides F1 diploïde a été contournée en tétraploïdisant au préalable la variété IR 31917 pour obtenir un hybride F1 triploïde (AAE) à 36 chromosomes (fig 1). La récupération des embryons par culture *in vitro* est encore nécessaire pour obtenir les embryons de la génération suivante (BC2 pour les croisements avec *O brachyantha*, BC1 pour les croisements avec *O australiensis*).

La stratégie adoptée ensuite dépend totalement des produits de cette première génération de recombinaison et consiste à identifier parmi les plantes obtenues celles qui présentent les caractères recherchés tout en ayant une fertilité suffisante pour continuer le processus de recroisement par voie naturelle. Ainsi, les croisements entre *O sativa* et *O australiensis* ont été entrepris dans l'objectif d'introduire de nouvelles sources de résistance à la bactériose foliaire du riz provoquée par *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (*Xoo*); cette maladie, très importante en Asie, fait l'objet d'une intense recherche de nouveaux gènes de résistance particulièrement à travers les croisements distants. Deux plantes BC1 à 28 chromosomes (AA+4E) ont pu être obtenues et donner 18 plantes BC2 dont seules les plantes ayant au maximum 2 chromosomes surnuméraires E étaient suffisamment fertiles pour être exploitées dans les recroisements ultérieurs. En particulier, une plante à $2n + 1$ chromosomes et correspondant à la lignée d'addition du chromosome 12 présentait les caractères recherchés : d'une part une résistance à la race 6 de *Xoo* et d'autre part une résistance à la cicadèle brune qui est un agent vecteur de viroses du riz. C'est à partir de cette lignée d'addition que les recroisements avec la lignée récurrente IR 31917 ont permis d'aboutir à des lignées isogéniques diploïdes et fertiles.

Les hybridations avec *O longistaminata* sont de nature différente car les 2 espèces partagent le même génome; néanmoins, *O longistaminata* manifeste une très forte barrière reproductive nécessitant également la récupération des embryons pour obtenir des hybrides F1. *O longistaminata* présente par ailleurs 2 originalités biologiques dans le genre *Oryza* : allogamie stricte grâce à un système d'auto-incompatibilité et pérennité par l'expression de rhizomes L'analyse génétique et cytologique des croisements F1 s'accorde avec un modèle basé sur la complémentarité de gènes létaux dominants D1 (*O longistaminata*) et D2 (*O sativa*), provoquant une détérioration plus ou moins précoce suivant le dosage de ces gènes dans l'albumen F1 (Chu et Oka, 1970). La composante essentielle de l'isolement reproductif

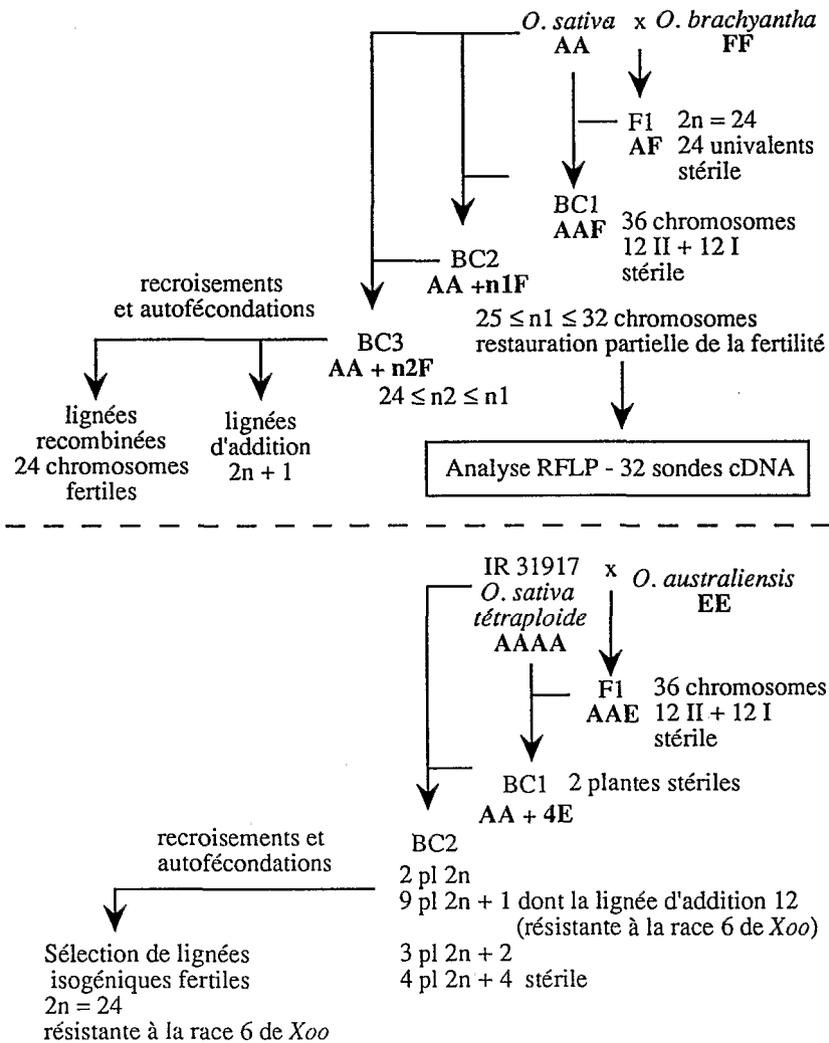


Fig 1. Schémas des croisements réalisés à l'Institut international de recherche sur le riz (IRRI, Philippines) entre *O. sativa* et des espèces de riz sauvage possédant des génomes différents (*O. brachyantha*, génome F, *O. australiensis*, génome E) pour introduire de nouvelles résistances à des pathogènes.

entre les 2 espèces agit au niveau des hybridations interspécifiques car la fraction de graines normales obtenues sur les hybrides F1 au cours des recroisements permet d'obtenir facilement les *back cross* de première génération et des suivantes (Causse et Ghesquière, 1991). Sur ces générations, le modèle génétique de barrière reproductive reste globalement valide mais montre un fonctionnement plus quantitatif qui s'accorde mieux à un modèle suivant lequel le gène D1 est modifié consécutivement à l'hybridation F1 et ne complète plus face à D2 (Ghesquière, 1991). Treize

souches d'*O. longistaminata* d'origine différente ont été croisées avec un hybride F1 ; cette première génération de recroisement montre une majorité de plantes stériles ou auto-incompatibles avec une expression variée des rhizomes. Seuls, quelques individus sont suffisamment fertiles pour obtenir des descendance en autofécondation qui montrent en accord avec le modèle une large ségrégation pour de nombreux caractères phénologiques (vigueur, fertilité, expression des rhizomes) ; 17 descendance BC1F2 correspondant à 46 individus ont servi de base pour suivre les introgressions sur 31 marqueurs cartographiés (fig 2).

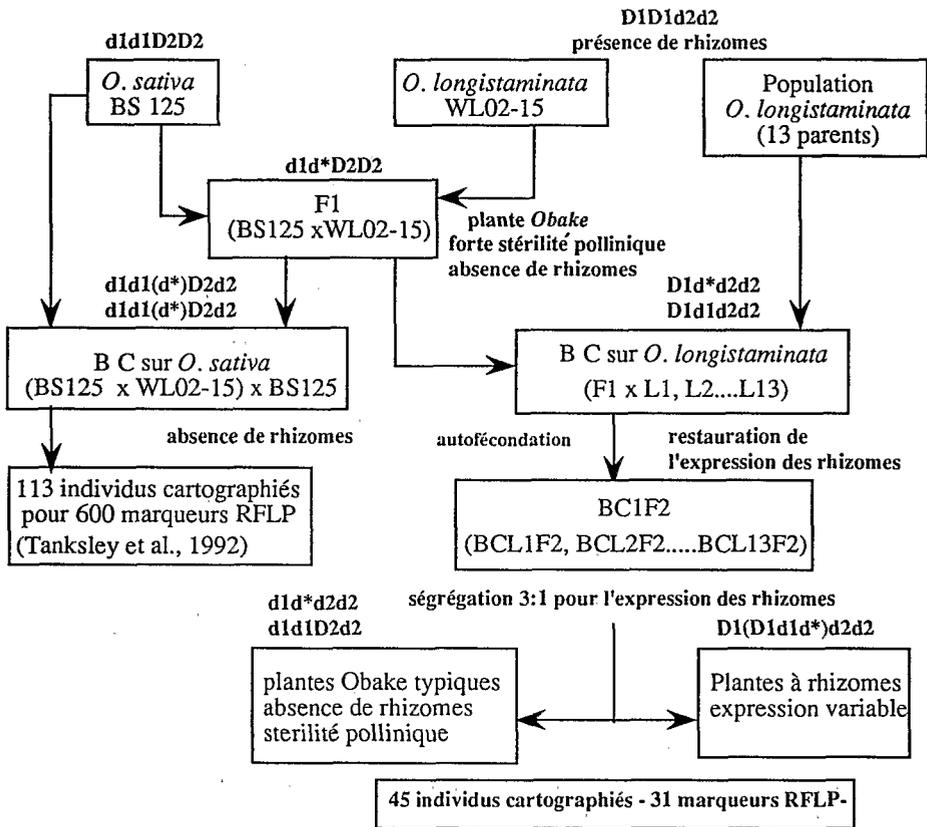


Fig 2. Schéma d'obtention des différentes populations *back cross* développées à partir des hybridations interspécifiques *O sativa* x *O longistaminata*. Les génotypes présumés vis-à-vis de la barrière reproductive dans les différentes générations sont indiqués en gras ; *d** indique une modification du gène D1 en provenance d'*O longistaminata* qui se caractérise par la perte de l'aptitude à compléter vis-à-vis de D2.

MÉTHODES

Le suivi des introgressions a été réalisé en utilisant les marqueurs développés par le programme de carte génétique des riz (Tanksley *et al*, 1992). Le choix des sondes a été réalisé en fonction de leur distribution le long des chromosomes et également de leur origine; ainsi l'étude des introgressions avec *O brachyantha* a exigé l'utilisation des sondes développées à partir d'une banque de cDNA d'avoine car la librairie génomique réalisée à partir de la variété d'*O sativa* IR 36 ne s'hybridait pas ou très peu avec l'ADN d'*O brachyantha* (Panaud, 1992). La distance génétique importante entre les parents permet d'identifier des marqueurs spécifiques avec seulement quelques couples enzymes/sondes. Ainsi, la comparaison du polymorphisme des parents impliqués dans les hybridations avec *O longistaminata* (lignée d'*O sativa*, hybride F1, parent *O longistaminata*, souches d'*O longistaminata* utilisées dans les croisements) permet pour la majorité des sondes testées avec les 2 enzymes de restriction EcoRV et HindIII d'identifier une bande diagnostic «sativa» et d'en suivre l'hérédité sans ambiguïté dans la génération BC1F2 (Leblanc *et al*, 1992). L'ADN de cette descendance et des parents a été alors digéré, transféré sur membrane et hybridé avec les sondes retenues suivant les protocoles standards (Mc Couch *et al*, 1988). À l'IRRI, le marquage des sondes a été réalisé en utilisant une méthode originale de chemiluminescence appliquée à la détection de séquences uniques (Digoxigenine-dUTP-AMPPD) (Panaud, 1992; Ishii *et al*, 1990).

RÉSULTATS

Recombinaison entre le riz cultivé (O sativa) et l'espèce de riz sauvage (O brachyantha)

Les plantes BC1 sont très homogènes et leur méiose révèle 12 univalents correspondant au génome F par suite de la non réduction chromatique des gamètes femelles F1. En revanche, les plantes BC2 sont beaucoup plus hétérogènes phénotypiquement et montrent un nombre de chromosomes variant de 26 à 32 chromosomes; les plantes présentent 12 bivalents et donc un nombre d'univalents du génome F allant de 2 à 8. Cette génération BC2 est donc particulièrement propice mettre en évidence et comprendre les recombinaisons intergénomiques, car celles-ci sont progressivement éliminées dans les générations avancées par le processus de croisement et d'autofécondation nécessaire pour créer des lignées recombinantes.

L'observation des patrons d'hybridation montre que toutes les plantes ont au moins un locus RFLP révélant un marqueur spécifique d'*O brachyantha*. L'absence de marqueurs d'*O brachyantha* (- - -) pour un chromosome donné s'accorde avec l'élimination du chromosome venant d'*O brachyantha* au cours de la méiose BC1, alors que les patrons où tous les marqueurs d'*O brachyantha* sont observés (+ + +) correspondent vraisemblablement à une situation aneuploïde à $2n + 1$ chromosomes. À côté de ces cas de figure classique, d'autres situations sont observées (+ - +), (- + -), (- + +), (+ + -) et suggèrent des possibilités de recombinaisons entre les chromosomes des génomes A et F (fig 3).

Les données de la cytogénétique ne militent pas pour ce genre de phénomène; néanmoins les observations de la méiose chez le riz se pratiquent le plus souvent

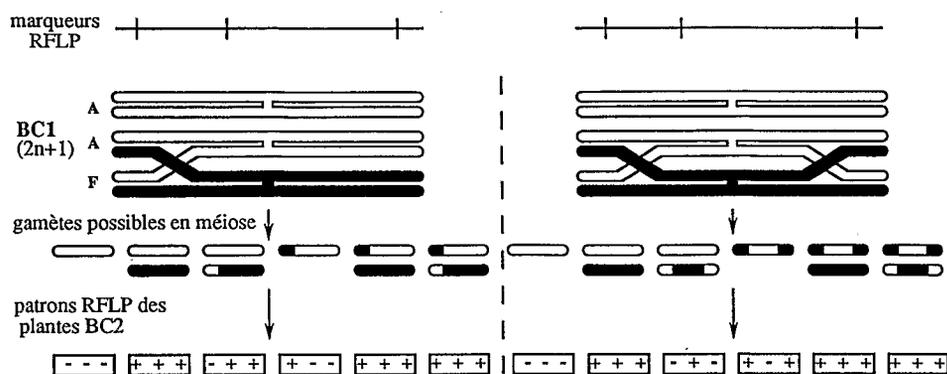


Fig 3. Interprétation du polymorphisme RFLP des plantes BC2 issues du croisement interspécifique (*O sativa* × *O brachyantha*) à partir de recombinaisons simple ou double entre les chromosomes A et F au cours de la méiose BC1 (d'après Panaud, 1992).

au stade diacinèse qui peut ne pas rendre compte complètement des possibilités réelles de recombinaison si à ce stade la terminalisation des crossing over est déjà achevée par suite du manque d'affinité des chromosomes des 2 génomes (Panaud, 1992). Les préparations cytologiques à un stade plus précoce (pachytène) bien que plus difficiles à réaliser techniquement semblent donner des arguments pour des possibilités de recombinaisons (Brar, IRRI, Philippines, comm. pers.). Ces résultats montrent que si les recombinaisons dans les générations précoces semblent non négligeables, elles ne doivent pas masquer le fait que les plantes obtenues ont en général des phénotypes très altérés et une très forte stérilité. Il est probable que toutes ces recombinaisons sont fortement contresélectionnées car l'utilisation de ces plantes dans les générations suivantes se limite le plus souvent à celles qui présentent 24 chromosomes associés à un phénotype de plante cultivée et à une restauration de la fertilité.

Localisation d'un gène de résistance à la bactériose foliaire dans les lignées isogéniques issues du croisement entre *O sativa* et *O australiensis*

Le développement de lignées isogéniques à partir de la lignée d'addition 12 a conduit à rechercher en priorité des marqueurs sur ce chromosome en comparant le parent donneur (*O australiensis*), le parent récurrent (IR 31917) et 5 lignées isogéniques. Quinze sondes cartographiées du chromosome 12 ont été analysées; seules les sondes RG 901 et 190 ont manifesté un polymorphisme entre la lignée récurrente et les lignées isogéniques et suggèrent que la résistance est située à l'extrémité du chromosome 12 (fig 4).

Néanmoins, les bandes observées chez les lignées isogéniques ne correspondent pas complètement au patron de restriction observé chez *O australiensis* et l'amplification de la sonde RG 901 par des amorces spécifiques ne révèle plus le polymorphisme mis en évidence auparavant. Une explication à cette observation pourrait provenir du matériel lui-même qui n'aurait pas été fixé complètement avant les croisements interspécifiques; de fait, la lignée d'*O sativa* IR 31917 a été utilisée

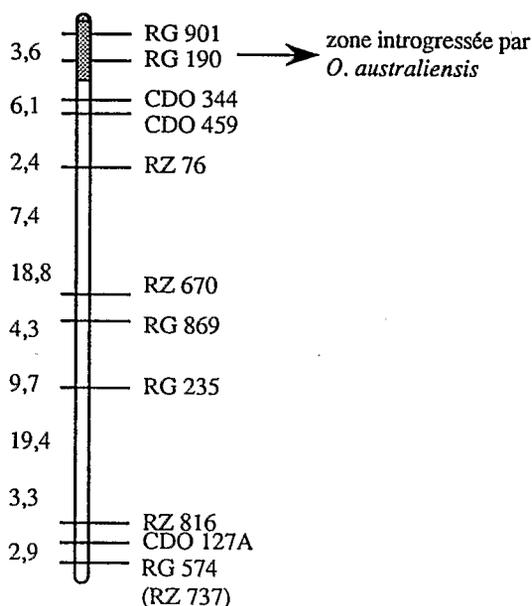


Fig 4. Carte RFLP du chromosome 12 du riz développée à partir d'une population *back cross* dérivée d'un hybride interspécifique *O sativa* × *O longistaminata*. La nomenclature des clones indique leur origine : RG : banque génomique de riz; CDO : banque d'ADNc d'avoine; RZ : banque d'ADNc de riz. Les distances sont indiquées en cM Kosambi (d'après Tanksley et al, 1992).

également dans d'autres programmes d'hybridation distante et l'analyse de générations avancées issues de croisement avec *O officinalis* montre un polymorphisme que l'on peut attribuer à une hétérozygotie résiduelle de cette lignée (Jena et al, 1992).

La recherche de marqueurs a été complétée en testant 466 amorces de 10 bases en utilisant la technique RAPD et permet de retenir 4 amorces pour lesquelles les produits d'amplification de l'ADN de 2 des lignées isogéniques manifestent une bande du parent sauvage *O australiensis*. Ces 4 marqueurs ont été clonés pour être hybridés sur des membranes avec l'ADN des 2 parents et les 5 lignées isogéniques. Deux de ces marqueurs correspondent à des séquences répétées et ne sont donc pas utilisables, un autre ne donne aucun signal et le dernier ne donne plus de signal positif. Une autre série d'amorces de 10 bases sera testée pour identifier un marqueur qui puisse correspondre à une séquence unique ou en petit nombre de copies afin d'être cartographié. Deux des lignées isogéniques ont été croisées avec le parent récurrent pour mettre en évidence les coségrégations entre la résistance et les marqueurs RFLP et RAPD préalablement identifiés. De la même manière que les 2 marqueurs RFLP RG901 et RG190, de nombreux marqueurs RAPD révèlent chez les lignées isogéniques un polymorphisme différent de celui des 2 parents *O australiensis* et *O sativa*; ils peuvent peut-être témoigner d'événements

de recombinaison non homologue ou mutationnel consécutifs à la confrontation de génomes différents chez l'hybride F1.

Suivi des recombinaisons dans les hybridations entre *O sativa* et *O longistaminata*

Les taux de recombinaisons entre les marqueurs ont été estimés à partir des équations de maximum de vraisemblance établies pour ces descendance dans le cas de 2 ou 3 loci (Allard, 1956). Dans les situations à 3 loci, une simulation a été réalisée pour obtenir les valeurs du couple (x, y) optimisant l'ajustement entre les fréquences simulées et observées. Pour la plupart des chromosomes, on constate que les distances entre marqueurs sont sensiblement plus faibles comparativement à la population back cross de référence (fig 5).

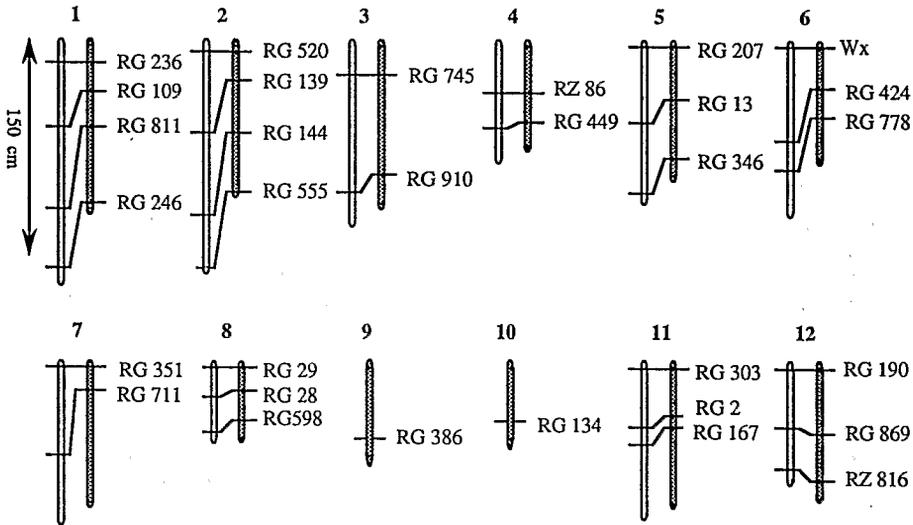


Fig 5. Distances comparées entre les marqueurs RFLP de la descendance BC1F2 (gris) et de la population back cross interspécifique de référence (blanc).

La taille de la carte développée sur la population back cross interspécifique est de 1222 cM et représente déjà une relativement forte restriction à la recombinaison (70%) comparativement à ce qui est observé dans les croisements intraspécifiques où les valeurs présumées sont de 1950 cM (Tanksley *et al*, 1992). Cette variation importante des taux de recombinaison suivant que les marqueurs sont placés à partir de croisements intraspécifiques ou interspécifiques peut être due à un effet direct de l'hybridation interspécifique qui «rapproche» d'une certaine manière les marqueurs consécutivement à une forte sélection gamétique chez l'hybride F1. Cette restriction à la recombinaison, dans la mesure où elle est généralisée sur l'ensemble des chromosomes, peut également provenir d'une aptitude moindre à recombiner de la part des chromosomes d'une espèce allogame comme *O longistaminata*.

Les distorsions de ségrégation de chaque marqueur ont été analysées pour les 2 méioses séparant la génération étudiée de l'hybride interspécifique F1 (tableau I).

Tableau I. Liste des marqueurs RFLP analysés dans la population BC1F2 montrant des distorsions de ségrégations significatives dans la première génération (BC1) et/ou dans la génération d'autofécondation (BC1F2).

Locus	Chromosome	Ségrégation en BC1		Ségrégation en BC1F2	
		(nombre de descendances)		Fréquence en marqueur «sativa» S	X2 (1ddl)
		LL:LS	X2 (1 ddl)		
RG 811	1	10:7	0,53	0,34	5,5*
RG 520	2	8:9	0,05	0,32	8,4**
RG 139	2	8:9	0,05	0,34	7,7**
RG 555	2	10:7	0,53	0,34	6,11*
RG 745	3	6:11	1,47	0,37	4,89*
RG 449	4	3:14	7,11**	0,44	0,6
RG 207	5	6:11	1,47	0,38	4,95*
RG 598	8	4:13	4,76*	0,55	0,85
RG 134	10	0:17	17***	0,69	13,4***
RG 869	12	13:4	4,8*	0,37	3,2
RZ 816	12	6:11	1,47	0,64	4,5*
Ensemble des 31 locus			6,6**	0,43	36,1***

* : $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$; *** : $P < 0,001$

En *back cross* de première génération, les ségrégations sont équilibrées avec un léger excès global de plantes en ségrégation pour le marqueur *sativa*; 2 exceptions sont observées : RG 134 où le marqueur venant d'*O sativa* est systématiquement présent dans toutes les descendances et RG 869 qui est le seul marqueur montrant à l'inverse des autres une forte dérive à l'encontre de l'allèle d'*O sativa*. La bonne régularité de la première génération peut venir du fait que les descendances étudiées proviennent toutes de plantes autocompatibles avec une fertilité suffisamment restaurée; ces plantes peuvent constituer un biais en faveur des marqueurs d'*O sativa* car l'hérédité de marqueurs isozymiques sur l'ensemble de la génération de recroisement montre plutôt un retour vers *O longistaminata* (Ghesquière et Causse, 1992). Une distorsion de ségrégation dans cette génération peut être indicative d'une liaison avec le gène de barrière reproductive venant d'*O sativa* (D2) surtout si elle s'accompagne localement d'un accroissement de recombinaison. Ces 2 conditions sont réunies pour le marqueur RG 869 sur le chromosome 12 et fournissent un bon argument pour localiser D2 à proximité de ce marqueur. Au niveau de la génération d'autofécondation, la difficulté de mettre en place et de maintenir la population recombinante (plantes albinos, faiblesse) pouvait présager de forts effets de distorsions qui n'ont pas été confirmés par la régularité des ségrégations (tableau I). Il est probable que de forts effets de dépression consanguine liés à *O longistaminata*

viennent compenser une dérive attendue beaucoup plus forte en marqueurs venant d'*O. sativa*. La régularité de cette génération BC₁F₂ du point de vue introgression apparaît ainsi comme la résultante de ces 2 éléments : sélection de plantes auto-compatibles fertiles à l'origine des descendances étudiées et effets de dépression consanguine due au fardeau génétique d'*O. longistaminata*.

L'observation du développement végétatif des plantes montre une grande diversité dans la mise en place de l'appareil rhizomateux que l'on peut caractériser par la date d'apparition des premières tiges aériennes par rhizomes (d) et leur importance relative dans la constitution globale de la plante (R) au bout de 6 mois de croissance. Le rapport R/d est un bon indicateur de la pérennité des plantes pour caractériser des plantes annulant la phase de tallage pour émettre très précocement de nombreuses tiges aériennes par rhizomes (type *O. longistaminata*) jusqu'à des plantes émettant quelques rhizomes très tardifs. Sur l'ensemble des descendances, il y a un bon ajustement pour une ségrégation 3 : 1 entre plantes à rhizomes et plantes totalement dépourvues de rhizomes (phénotype *obake* analogue aux hybrides F₁). Le caractère R/d pris comme un indicateur phénologique d'introgression entre les 2 espèces montre une bonne relation avec le taux d'introgression mis en évidence sur les marqueurs. La recherche de QTL par analyse de variance ne permet de retenir que le marqueur RG 109 sur le chromosome 1 ($P < 0,001 - R^2 = 0,23$); cette analyse est confirmée par la recherche de liaison génétique lorsqu'on ne considère le caractère «rhizome» que sous forme présence ou absence ($r = 0,26; P < 0,01$). RG 109 apparaît donc comme un bon candidat pour localiser le gène permettant l'expression des «rhizomes» et par la même occasion celui qui chez *O. longistaminata* gouverne la barrière reproductive entre les 2 espèces.

DISCUSSION

L'une des motivations essentielles qui a conduit à s'intéresser aux hybridations interspécifiques a été la recherche de nouveaux gènes de résistance spécifique (Jena et Khush, 1990). En outre, il existe une diversité de résistance très importante dans les espèces sauvages, y compris parmi des espèces non confrontées naturellement aux pathogènes vis-à-vis desquelles ces résistances sont observées (résistance des espèces sauvages africaines et américaines vis-à-vis d'agents pathogènes présents en Asie) (Ikeda et Vaughan, 1991). La localisation et le transfert de ces résistances se fondent en général sur l'évaluation de lignées d'addition à $2n + 1$ chromosomes avant leur sélection sous forme de lignées recombinées (Kobayashi *et al.*, 1992). La génétique de l'introduction de ces résistances n'est pas toujours très claire car si certaines résistances semblent bien avoir été transférées pour s'hériter ensuite de façon mendélienne, de nouveaux spectres de résistance apparaissent qui ne correspondent pas forcément aux résistances présentes dans les parents mis en jeu dans les croisements. C'est ainsi les lignées isogéniques issues du croisement avec *O. australiensis* sont totalement résistantes à la race 5 de *Xoo* bien qu'elles n'aient pas été sélectionnées pour cette résistance étant donnée que le parent récurrent présentait déjà un certain niveau de résistance à cette race grâce au gène *Xa-4*. Il est donc probable que cette nouvelle résistance totale soit d'une autre nature du point de vue gène de résistance.

De la même manière, certains gènes provenant d'espèces sauvages présentent l'intérêt de donner une résistance à plusieurs races en même temps : le gène *Xa-21* provenant d'*O longistaminata* confère la résistance aux 6 races de *Xoo* présentes aux Philippines et a été localisé sur le chromosome 11 (Ronald *et al*, 1992; Ikeda *et al*, 1991). Des résistances multiples ont été également transférées à partir d'un croisement avec *O minuta* (génome BBCC); la génération BC2 issue de cette combinaison montre une décorrélation de résistances pourtant bien associées par des gènes de résistance dans le parent récurrent (Amante-Bordeos *et al*, 1992) et confirme, comme l'observation des polymorphismes moléculaires, cette variabilité nouvelle qui semble provenir des hybridations interspécifiques.

Jusqu'à présent, tous les transferts de résistances à partir d'espèces éloignées qui ont été tentés semblent avoir été obtenus; si seuls des phénomènes de recombinaison sont en cause, cette réussite semble en contradiction avec la très forte sélection qui s'opère dans les premières générations pour obtenir quelques génotypes viables. Dans ces conditions le transfert de caractères adaptatifs à dominante polygénique, outre les problèmes d'évaluation qu'il pose, risque d'être une sévère limitation à l'intérêt des croisements distants. L'utilisation des marqueurs moléculaires cartographiés fournit un outil d'investigation d'un grand intérêt pour étudier la recombinaison entre génomes différents. Le suivi du devenir des fragments introgressés dans les générations avancées au fur et à mesure de la sélection pour des plantes fertiles à 24 chromosomes pourra indiquer les niveaux d'introgessions et les corrélations effectives de ces zones avec les caractères recherchés. Un premier exemple de ce genre d'approche est donné par l'étude de descendances BC2F8 issues de croisements entre *O sativa* × *O officinalis*; ces descendances montrent des introgressions qui sont structurées en fragments de petite taille répartis sur l'ensemble des chromosomes et sans relation évidente avec la résistance transférée (Jena *et al*, 1992). Les hybridations avec *O longistaminata* montrent qu'une fois que les barrières de reproduction sont surmontées, les possibilités de recombinaison peuvent être favorables. La construction d'une carte de liaison RFLP à partir d'un *back cross* interspécifique et la bonne colinéarité des marqueurs entre les cartes intra et interspécifique en sont une preuve manifeste. Même si la recombinaison en BC1F2 apparaît quantitativement plus faible, sa régularité contraste avec les distorsions de ségrégation qui peuvent être ponctuellement très fortes dans certains croisements *indica-japonica* et être la conséquence de la domestication des riz cultivés. Indépendamment de la création de variabilité nouvelle qui n'est pas à négliger et dont les mécanismes sont à élucider, la compréhension de facteurs comme le fonctionnement des barrières reproductives, le bon déroulement de la méiose (appariements chromosomiques et possibilités de crossing over) peut contribuer à mieux déterminer les potentialités de recombinaisons favorables et les conditions d'exploitation des ressources génétiques éloignées des espèces cultivées.

REMERCIEMENTS

Les travaux réalisés à l'IRRI et à l'Université Cornell ont été financés en partie grâce à une bourse post-doctorale du ministère des Affaires étrangères.

RÉFÉRENCES

- Ahn N, Bollich CN, SD Tanksley (1992) RFLP tagging of a gene for aroma in rice. *Theor Appl Genet* 84, 825-828
- Allard RW (1956) Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. *Hilgardia* 24, 235-378
- Amante-Bordeos M, Sitch A, Nelson R, Nalmacio RD, Oliva NP, Aswidinoor H, Leung H (1992) Transfer of bacterial blight resistance from the tetraploid wild rice *Oryza minuta* to cultivated rice *O sativa*. *Theor Appl Genet* 84, 345-354
- Bonman JM, Khush GS, Nelson RJ (1992) Breeding rice for resistance to pests. *Annu Rev Phytopathol* 30, 507-528
- Brar DS, Elloran R, GS Khush (1991) Interspecific hybrids produced through embryo rescue between cultivated and eight wild species of rice *RGN* 8, 91-93
- Causse M, Ghesquière A (1991) Prospective use of *O longistaminata* for rice breeding program. In: *Rice genetic II. Proc of the 2nd Int Rice Genet Symp IRRRI* Los Banos, Philippines, 14-18/5/90, 81-90
- Causse M, Second G, Tanksley S (1992) Construction d'une carte saturée du génome des riz grâce à l'utilisation d'hybrides interspécifiques. In: *Complexes d'espèces, Flux de gènes et ressources génétiques des plantes*. Colloque en hommage à Jean Pernès, Bureau des Ressources Génétiques, Paris, 8-10/1/92, 551-552
- Chu YE, Hi Oka (1970) The genetic basis of crossing barriers between *O perennis* subs *barthii* and its related taxa. *Evolution* 24, 135-144
- Ghesquière A (1991) Reexamination of the genetic control of the reproductive barrier between *O longistaminata* and *O sativa* and relationship with the rhizome expression. In: *Rice genetic II. Proc of the 2nd Int Rice Genet Symp IRRRI*, Lōs Banōs, Philippines. 14-18/5/90: 729-730
- Ghesquière A, Causse A (1992) Linkage study between molecular markers and genes controlling the reproductive barrier in interspecific back cross between *O sativa* and *O longistaminata*. *RGN* 9, 28-31
- Ikeda R, Vaughan A (1991) The distribution of resistance genes to brown planthopper in rice germplasm. *RGN* 8, 125-128
- Ikeda R, Tabien RE, Khush GS (1991) Chromosomal location of Xa-21. *RGN* 8, 102-103
- Ishii T, Panaud O, Brar DS, Khush GS (1990) Use of non-radioactive, digoxigenin-labelled probes for RFLP analysis in rice. *Plant Mol Biol Reprtr* 8, 167-171
- Jena KK, Khush GS (1984) Embryo rescue of interspecific hybrids and its scope in rice improvement. *RGN* 1, 133-134
- Jena KK, Khush GS (1990) Introgression of genes from *Oryza officinalis* Well ex-Wall to cultivated rice *O sativa* L. *Theor Appl Genet* 80, 735-745
- Jena KK, Khush GS, Kochert G (1992) RFLP analysis of rice (*Oryza sativa* L) introgression lines. *Theor Appl Genet* 84, 608-616
- Kobayashi N, Ikeda R, Khush GS, Brar DS (1992) Resistance to tungro spherical virus in monosomic alien addition lines (MAALs) of *Oryza officinalis*. *RGN* 9, 37-38
- Kurata N, Harushima Y, Nagamura Y, Yamamoto K, Wu JZ, Antonio BA, Sue N, Shomura A, Toyama T, Miyamoto Y, Yihihara T, Miyao A, Sasaki T, Yano M, Minobe Y (1992) Our current RFLP maps of rice. *RGN* 9, 130-132



- Leblanc O, Marmey P, Ghesquière A (1992) Application des marqueurs moléculaires à l'étude des introgressions interspécifiques: recherche de marqueurs spécifiques chez *O longistaminata* et *O sativa*. In: *Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes*. Colloque en hommage à Jean Pernès, Bureau des Ressources Génétiques, Paris, 8-10/1/92, 561-562
- McCouch SR, Kochert G, Yu ZH, Wang ZY, Khush GS, Coffman WR, Tanksley SD (1988) Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor Appl Genet* 76, 815-829
- MacKill DJ, Salam SA, Wang ZY, Tanksley SD (1993) A major photoperiodism-sensitivity gene tagged with RFLP and isozyme markers in rice. *Theor Appl Genet* 85, 536-540
- Nayar NM (1973) Origin and cytogenetics of rice. *Adv Genet* 17, 153-292
- Panaud O (1992) Utilisation de la technique RFLP pour l'étude de l'introgression du riz cultivé *O sativa* L par une espèce sauvage de riz *O brachyantha*. Thèse de Doctorat en Sciences, Université Paris XI, Orsay
- Panaud O, Magpantay G, McCouch S (1993) A protocol for non-radioactive DNA labelling and detection in the RFLP analysis of rice and tomato using single-copy probes. *Plant Mol Biol Repr* 11, 54-59
- Ronald PC, Albenez L, Albano B, McCouch S, Tanksley SD (1992) Genetic and physical analysis of the rice bacterial blight disease resistance locus, Xa-21. *Mol Gen Genet* 236, 113-120
- Saito AM, Yano M, Kishimoto N, Nakagahra M, Yoshimura A, Saito K, Kuhara S, Ukai Y, Kawase M, Nagamine T, Yoshimura S, Ideta O, Oshawa R, Hayano Y, Iwata N, Sugiura M (1991) Linkage map of restriction fragment length polymorphism loci in rice. *Jpn J Breeding* 41, 665-670
- Tanksley S, Causse M, Fulton T, Ahn A, Wang Z, Wu K, Xiao J, Wu Z, Second G, McCouch S (1992) A high density molecular map of the rice genome. *RGN* 9, 111-115
- Xiao J, Fulton T, McCouch S, Tanksley S, Kishimoto N, Oshawa R, Ukai Y, Saito A (1992) Progress in integration of the molecular maps of rice. *RGN* 9, 124-128
- Yu YH, Mackill DJ, Bonman MJ, Tanksley SD (1991) Tagging gene for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers. *Theor Appl Genet* 81, 471-476
- Yoshimura S, Yoshimura A, Saito A *et al* (1992) RFLP analysis of introgressed chromosomal segments in three near-isogenic lines of rice for bacterial blight resistance genes, Xa-1, Xa-3 and Xa-4. *Jpn J Genet* 67, 29-37