

Article original

Marquage et expression du génome chez le maïs

D de Vienne¹, JM Josse¹, A Maurice¹, M Causse¹,
A Leonardi¹, P Touzet¹, E Krejci¹, B Gouesnard²,
J Sanou³, A Panouille⁴, A Boyat², P Dubreuil¹, P Dufour¹,
A Gallais¹, M Lefort⁵, A Charcosset¹, C Damerval¹

¹ Institut national de la recherche agronomique, Université Paris XI/CNRS URA 1492, station de génétique végétale, La Ferme du Moulon, 91190 Gif-sur-Yvette;

² Institut national de la recherche agronomique, station de génétique et d'amélioration des plantes, Domaine de Melgueil, 34130 Mauguio, France;

³ Institut d'études et de recherches agricoles, CRRA de Farako Ba, BP 910, Bobo Dioulasso 01, Burkina Faso;

⁴ Institut national de la recherche agronomique, station expérimentale du maïs, 40590 Saint-Martin-de-Hinx;

⁵ Institut national de la recherche agronomique, département de génétique et amélioration des plantes, bât 1, Sciences du sol, rte de St-Cyr, 78026 Versailles Cedex, France

Résumé – Les marqueurs génétiques neutres, tels que les isoenzymes ou les polymorphismes de longueur des fragments de restriction (RFLP) ont désormais des applications dans des domaines très divers. Trois exemples en sont présentés. i) Près de 130 lignées de maïs ont été comparées en utilisant 46 sondes RFLP réparties sur les 10 chromosomes. Des analyses de données et des calculs de distances ont révélé une structuration très cohérente avec les classifications en groupes hétérotiques et avec les généalogies, ce qui souligne l'intérêt des marqueurs en sélection pour caractériser un matériel d'origine inconnue. Pour la prédiction de l'hétérosis, il apparaît que les indices de distances ne seront guère efficaces pour les hybrides entre lignées appartenant à des groupes génétiques différents. Il y a donc nécessité de rechercher des polymorphismes de gènes directement impliqués dans les caractères. ii) Des marqueurs enzymatiques ont été utilisés pour suivre l'introgession de matériel exotique dans du matériel adapté, dans le cadre d'une expérience d'amélioration de la tolérance du maïs aux basses températures. Il est apparu que la structuration observée était celle que l'on pouvait attendre en l'absence de dérive et de sélection. iii) Grâce à une carte génétique saturée construite à partir d'une descendance F2, nous avons localisé des QTL (*quantitative trait loci*) de caractères agromorphologiques, et de protéines quantifiées sur gels d'électrophorèse bidimensionnels à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images. Nous avons ainsi pu comparer, à 2 niveaux phénotypiques très différents, la complexité des déterminismes et les valeurs des paramètres génétiques des locus impliqués (effet de

substitution, dominance, épistasie), et avons montré qu'il y avait bien moins d'interactions intra- ou interlocus au niveau macroscopique qu'au niveau des produits de gènes.

Zea mays L / marquage moléculaire / ressources génétiques / QTL / expression génétique

Summary – Molecular markers as a tool for analyzing genetic diversity and genome expression in maize. *Neutral markers, such as isoenzymes and RFLPs (restriction fragment length polymorphism), have applications in various fields of genetics and breeding. Three examples are documented. Firstly, about 130 maize lines were compared using 46 RFLP probes distributed over the 10 chromosomes. Data analyses and distance indices gave a classification consistent with heterotic groups and pedigrees, showing the value of molecular markers for characterizing unknown material. Distance indices were not very useful for predicting heterosis when parental lines belong to different genetic groups: the identification of polymorphisms of genes involved in the traits analysed is required. Second, enzyme markers were used to follow introgression of exotic into adapted material, in an experiment on cold tolerance. The classification observed revealed neither genetic drift nor selection. Finally, using a saturated genetic map constructed from an F2 progeny, we located QTLs (quantitative trait loci) for agromorphological traits and QTLs for amounts of proteins as revealed by 2-dimensional electrophoresis and quantified with a computer-assisted system. The comparison of genetic parameters (dominance, epistasis) between these 2 contrasted phenotypic levels suggested that interactions are much more common at the gene product level than at the macroscopic level.*

Zea mays L / molecular markers / genetic resources / QTL / genetic expression

INTRODUCTION

La gestion et l'exploitation de la variabilité génétique ont longtemps reposé sur l'utilisation des seuls caractères morphologiques et/ou d'intérêt agronomique. On a désormais accès à d'autres niveaux d'étude de la variabilité génétique, comme par exemple celui des protéines, et, plus récemment, celui de l'ADN, qui se révèle être une source quasi illimitée de marqueurs. Cependant les relations entre ces différents niveaux ne sont pas directes, les polymorphismes moléculaires étant, dans leur grande majorité, sélectivement et phénotypiquement neutres.

Cet article décrit différentes utilisations des marqueurs neutres. Pour la gestion des ressources génétiques, ils permettent de se faire une idée de la diversité génétique potentielle pour l'ensemble du génome, au sein d'un matériel génétique donné, et indépendamment des influences du milieu. Cet aspect est illustré par la comparaison de 129 lignées de maïs d'origines diverses, toutes adaptées aux climats tempérés. Nous avons recherché si la structuration de la variabilité de ce matériel pouvait être reliée à l'origine génétique des lignées ou à une autre structuration établie sur la base des caractères agromorphologiques. D'autre part certains auteurs ont montré que des indices de distances entre lignées pouvaient être de bons outils de prédiction de la valeur de leurs hybrides. Nous avons donc évalué l'intérêt des profils moléculaires pour cette prédiction. En troisième lieu des marqueurs enzymatiques ont permis de suivre les conséquences génétiques de l'introgression de matériel «exotique» dans du matériel tempéré, dans un programme destiné à améliorer la tolérance aux basses

températures, c'est-à-dire à rendre le maïs plus précoce. Enfin les polymorphismes neutres permettent de repérer des polymorphismes non neutres chaque fois qu'il y a déséquilibre de liaison entre eux. Cette possibilité a été mise à profit pour cartographier non seulement des locus affectant des caractères agromorphologiques (QTL : *quantitative trait loci*), mais aussi des locus contrôlant l'abondance de protéines anonymes quantifiées sur des gels d'électrophorèse bidimensionnelle. Cette approche a permis de montrer l'importance des interactions (dominance, épistasie) lorsque l'on examine l'expression génétique au niveau même des produits de gènes plutôt qu'à celui des caractères macroscopiques, et de fournir les bases génétiques d'un phénomène d'hétérosis moléculaire mis précédemment en évidence.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Analyse de l'expression du génome par marquage moléculaire

Matériel végétal

Un croisement entre une lignée américaine du groupe Iodent, codée *Io*, et la lignée cornée INRA F2, que nous appellerons *Lc* pour éviter l'ambiguïté avec la descendance F2, a fourni les hybrides F1 analysés au niveau protéique, ainsi qu'une descendance F2 produite à Gif-sur-Yvette, utilisée pour la cartographie et la recherche de QTL morphologiques et protéiques. Les coléoptiles étiolés de plantules poussées à l'obscurité à 24°C pendant 8 jours ont été analysés par électrophorèse bidimensionnelle des protéines. Sur ces mêmes plantes adultes, après réimplantation en pépinière (St-Martin-de-Hinx), des fragments de feuilles ont été prélevés pour les analyses RFLP. Les familles F3, obtenues par autofécondation des plantes F2, ont été implantées dans le même lieu, dans un dispositif à 3 blocs randomisés.

Construction d'une carte de liaison génétique

Deux sources de marqueurs ont été utilisées.

Les marqueurs RFLP sont issus des banques génomiques fournies par B Burr (Upton, États-Unis) et D Hoisington (Columbia, États-Unis), et constituent un échantillon de sondes de référence pour tous les projets de cartographie génétique du maïs (sondes de la *core map*). L'ADN a été digéré par les enzymes *EcoRI* et *HindIII*, séparé par électrophorèse en gel d'agarose (0,8%), puis transféré sur membrane de nylon. Le marquage radioactif des sondes a été fait selon le protocole de Feinberg et Vogelstein (1983) et les hybridations selon Church et Gilbert (1984).

Les marqueurs protéiques ont été obtenus par électrophorèse bidimensionnelle (EBD) (O'Farrell, 1975). L'extraction dénaturante des protéines, la méthode d'EBD et la coloration au nitrate d'argent sont décrites par Damerval *et al* (1986), Leonardi *et al* (1991) et Burstin *et al* (1993). Des répétitions ont été faites pour tous les génotypes. Pour les lignées *Io* et *Lc* et leur hybride F1, 4 à 6 individus ont été analysés, et pour chacun des individus de la descendance F2, au moins 2 gels ont été réalisés. Des coélectrophorèses des extraits parentaux en proportions égales ont été faites pour confirmer les coïncidences de position des polypeptides, et pour

servir de référence dans la comparaison entre l'hybride F1 et ses 2 parents. Les polypeptides montrant une variation de position entre les 2 lignées parentales ont tous révélé un déterminisme monogénique. Ils ont donc été utilisés comme marqueurs supplémentaires pour la cartographie.

La carte génétique a été réalisée grâce au logiciel MAPMAKER 2.0 (Lander *et al* 1987), avec un LOD de 4 et un taux de recombinaison de 0,3 pour constituer les groupes de liaison, et un LOD de 2 pour ordonner les marqueurs à l'intérieur de chaque groupe.

Caractères agromorphologiques

Dix caractères agromorphologiques ont été mesurés au champ sur 95 individus F2 (nombre de nœuds au-dessous et au-dessus de l'épi, longueur des nœuds au-dessous et au-dessus de l'épi, diamètre de la tige au-dessous et au-dessus de l'épi, longueur et largeur de la feuille de l'épi, hauteur totale et hauteur d'insertion de l'épi). Pour les familles F3 issues des F2, 10 caractères ont été mesurés sur une dizaine d'individus par bloc (hauteur totale et hauteur d'insertion de l'épi, rendement en grains, verse, dates de floraison mâle et femelle, et 4 caractéristiques d'épi : diamètre, longueur, nombre de rangs, nombre de grains par rang). Les valeurs prises en compte pour la génération F3 étaient les moyennes familiales.

Quantités de protéines individuelles

Outre les variations de position, il existe de la variabilité génétique pour les quantités de certains polypeptides. La quantification d'un échantillon de polypeptides variables entre les lignées parentales a été réalisée par le logiciel d'analyse d'images KEPLER (LSB Corp, Washington, DC), pour 50 individus F2 en utilisant la méthode de détection de M Zivy (en préparation). Les différentes phases de l'analyse sont semblables à celles décrites dans Damerval et de Vienne (1993). L'hérédité des quantités de protéines a été testée par comparaison de l'hybride F1 avec la coélectrophorèse et avec ses parents (de Vienne *et al*, 1988; Leonardi, en préparation).

Recherche de QTL et de PQL

La recherche de QTL a été faite par analyse de variance, marqueur par marqueur, et à l'aide du logiciel MAPMAKER/QTL (version 2.0; Lander et Botstein, 1989). Pour les quantités de protéines comme pour les caractères agromorphologiques, seuls les QTL détectés par MAPMAKER/QTL avec un LOD > 2,4 (risque global 5%) et confirmés par analyse de variance (= 5%) ont été retenus. Pour distinguer les QTL de caractères agromorphologiques de ceux qui contrôlent les quantités de protéines, ces derniers ont été dénommés PQL (*protein quantity locus*).

L'existence d'effets de dominance a été recherchée pour chaque PQL par un test de Student au seuil de 5%, en comparant la moyenne des hétérozygotes à la demi-somme des homozygotes. L'épistasie a été recherchée pour tous les couples de marqueurs par analyse de variance à 2 facteurs croisés avec un seuil de 10^{-5} pour l'interaction.

Méthodologie de gestion de la variabilité génétique

Afin d'étudier l'intérêt des marqueurs RFLP pour décrire et analyser la variabilité génétique, une collection de 129 lignées a été analysée. Ces lignées ont été choisies pour représenter différentes origines génétiques adaptées aux climats tempérés. Elles appartiennent en majorité à des groupes génétiques bien connus : groupes américains Lancaster, Reid Yellow Dent, Minnesota 13, au groupe des lignées cornées européennes. D'autres lignées ont une origine mal déterminée ou inconnue, ou sont issues de croisements intergroupes, mais ont toutes un intérêt potentiel en sélection. Les lignées ont été analysées pour 46 sondes appartenant à la carte de référence du maïs. Ces sondes ont été choisies pour représenter au mieux le génome et couvrent les 10 chromosomes du maïs. Deux enzymes de restriction ont été utilisés : *EcoRI* (32 sondes) et *HindIII* (37 sondes), soit un total de 69 couples sonde-enzyme. Les analyses ont été conduites selon les protocoles cités plus haut.

Introgression de matériel exotique

Pour l'étude de l'introgression de matériel exotique dans du matériel tempéré, 3 pools exotique x tempéré ont été constitués. Dix-neuf populations tropicales d'altitude ont été croisées avec une population synthétique précoce (*SynFC*), puis les descendants ont été intercroisés 2 fois en panmixie. Ce pool, appelé *Pool 14*, qui contient en principe 50% de génome «exotique» et 50% de «tempéré», a ensuite subi une sélection sur la précocité, les caractéristiques de l'épi, la résistance aux maladies et à la verse, pour augmenter son degré d'adaptation. Le matériel obtenu, *Pool 14sel*, a été croisé par un hybride 3 voies (*M-Elite*), et les descendants ont été intercroisés en panmixie, produisant le *Pool 14A* (A pour amélioré), constitué en principe de 25% de génome exotique et 75% de génome tempéré.

Ces 3 pools, ainsi que la synthétique précoce, ont été analysés pour 4 locus enzymatiques, ACP1 (4 allèles), ADH1 (2 allèles), GOT1 (2 allèles) et GOT2 (2 allèles), et une analyse en composantes principales (ACP) sur la matrice populations x fréquences alléliques a permis de visualiser la structuration génétique obtenue. La variabilité agromorphologique au sein des *Pool 14sel* et *Pool 14A* a été analysée en croisement avec 2 testeurs complémentaires dans un réseau multilocal en 1992, à raison de 42 et 49 familles S1 pour le *Pool 14sel* et le *Pool 14A*, respectivement. Une série de caractères ont été mesurés sur ces populations, relatifs à la productivité, à la verse, et à la précocité.

RÉSULTATS

Analyse de l'expression du génome par marquage moléculaire

La carte génétique

Quatre-vingt-quinze individus de la descendance F2 ont été typés à l'aide de 76 marqueurs RFLP, 85 d'entre eux l'étant également pour 42 paires de variants protéiques de position. Ces marqueurs sont codominants, sans distorsions de ségrégation significatives. Cent-neuf marqueurs ont pu être organisés en 10 groupes de liaison qui

ont été assignés aux 10 chromosomes du maïs grâce aux sondes de référence de cette espèce. Même si les 2 types de marqueurs paraissent répartis au hasard, certains marqueurs protéiques ont comblé des «trous» de la carte de référence, comme cela a également été noté dans une autre descendance (A Murigneux, communication personnelle). La longueur de la carte est d'environ 1500 cM en distance de Kosambi, soit une longueur comparable aux autres cartes du maïs déjà publiées. Les 109 marqueurs cartographiés ont été utilisés pour la recherche de PQL et de QTL (fig 1).

Cartographie, effets et hérédité des facteurs contrôlant l'expression protéique

Parmi les quelque 500 spots révélés, 36% sont génétiquement variables entre *Lc* et *Io*. Pour 72 d'entre eux, choisis pour la fiabilité de leur quantification, une recherche de locus contrôlant la quantité (PQL) a été effectuée. Pour 42 protéines, 1 à 5 PQL ont été mis en évidence, qui ne sont pas plus souvent liés à des marqueurs protéiques qu'à des marqueurs RFLP. Il y en a au total 70, répartis sur l'ensemble du génome, même si quelques régions se caractérisent par des regroupements de PAL à très fort effet (chromosomes 8 et 9 notamment). Le microséquençage des protéines impliquées a été entrepris afin de rechercher d'éventuelles relations physiologiques entre elles, qui pourraient suggérer l'action de régulateurs à effet pléiotropes. Pour 20 protéines, au moins 2 PQL non liés ont été trouvés, ce qui indique que la régulation des quantités de produits de gènes par des facteurs éloignés du gène de structure est fréquente (Damerval *et al*, 1994).

Quel que soit le seuil de détection, à peu près autant de PQL à effet additif que dominant sont détectés. De plus, on observe environ 3 fois plus de PQL à effet dominant en faveur de la forte quantité que de PQL à effet inverse. Ce résultat est à rapprocher de l'hérédité observée dans les hybrides F1. En effet, tant par analyse visuelle (de Vienne *et al*, 1988) que par quantification automatique (Leonardi, en préparation), il apparaît que la quantité des polypeptides manifestant une hérédité non additive en F1 est dans 80% des cas déportée vers les fortes valeurs. Il s'agit d'un phénomène d'hétérosis moléculaire, qui trouve donc son origine dans la dominance de facteurs de contrôle de l'expression protéique.

Cette conclusion est valable en moyenne. En effet, pour des protéines prises individuellement, la prédiction de la valeur de la non-additivité en F1 à l'aide de la somme des effets de dominance des PQL détectés en F2 est souvent médiocre. Cela peut s'expliquer par le fait que les effectifs utilisés ne permettent pas de détecter de PQL à effet mineurs (la part de variation expliquée reste toujours inférieure à 100%), mais aussi par l'existence d'épistasie (voir ci-dessous).

Comparaison des paramètres génétiques des QTL et des PQL

Pour 17 des 20 caractères agromorphologiques étudiés, 36 QTL ont été trouvés, avec 1 à 4 QTL par caractère. La forme de la distribution des R^2 (pourcentage de la variation du caractère dans la descendance expliqué par le marqueur) et sa moyenne sont semblables pour les 2 types de caractères, protéiques et agromorphologiques. Cependant les effets de substitution (c'est-à-dire les effets des QTL/PQL sur les moyennes des caractères) sont bien plus élevés dans le cas des protéines, puisque

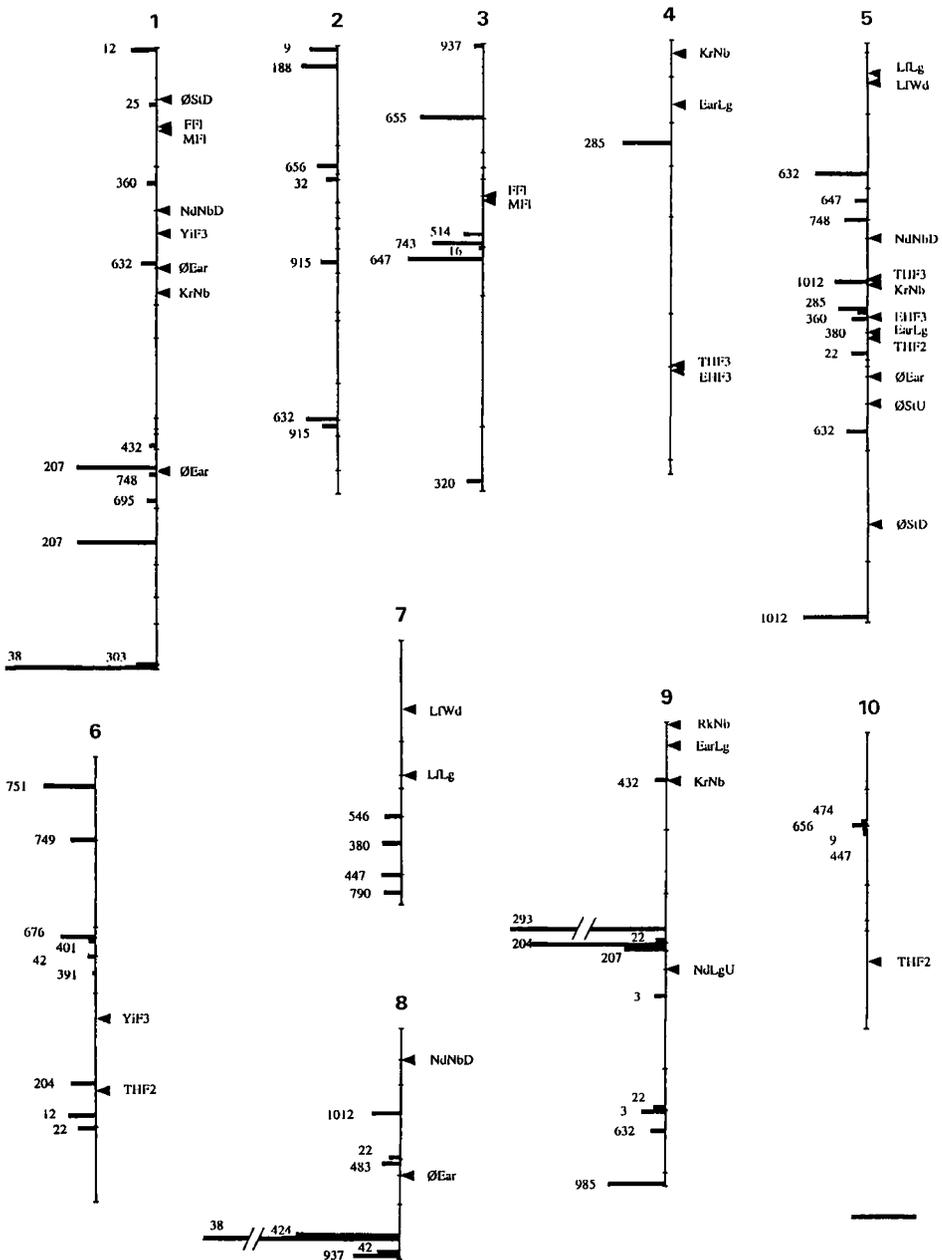


Fig 1. Carte génétique du maïs, constituée de 70 marqueurs RFLP et de 39 marqueurs protéiques répartis sur les 10 chromosomes. Les positions des QTL détectés pour 17 des 20 caractères agromorphologiques étudiés sont représentées à droite des chromosomes (triangles). ØStU et ØStD, diamètre de la tige au dessus et au-dessous de l'épi; FFI et MF1, précocité de floraison femelle et mâle; NdNbD, nombre de nœuds au-dessous de l'épi; YiF3, rendement en grains en F3; THF2 et EHF2 (resp F3), hauteur totale et d'insertion de l'épi en F2 (resp F3); LfLg et LfWd, longueur et largeur de la feuille de l'épi; NdLgU, longueur des nœuds au-dessus de l'épi; ØEar, diamètre de l'épi; KrNb, nombre de grains; RkNb, nombre de rangs; EarLg, longueur de l'épi. Les PQL sont représentés à gauche des chromosomes par des barres horizontales dont la longueur est proportionnelle à l'effet de substitution. L'échelle représente 200%, soit un triplement de la quantité de protéine. Les effets de substitution peuvent prendre des valeurs beaucoup plus élevées pour les PQL pour les QTL, puisque pour ces derniers, ils ne dépassent pas 65%.

27% des PQL entraînent au moins un doublement de la quantité de la protéine qu'ils contrôlent, 2 d'entre eux la multipliant même par plus de 15 (fig 1). Pour les QTL l'écart entre les classes génotypiques homozygotes est en général inférieur à 30%, et dans 2 cas seulement atteint 65%.

Une autre différence entre les QTL et les PQL concerne l'épistasie. Vingt-six zones chromosomiques interagissant pour le contrôle de 10 protéines ont été trouvées, alors qu'à un seuil de 10^{-5} environ 4 sont attendus du fait du hasard. En revanche il est frappant qu'aucune interaction significative n'ait pu être mise en évidence pour les caractères agromorphologiques en utilisant le même seuil.

La dominance est également moins fréquente au niveau des caractères agromorphologiques, puisque 1 QTL sur 4 en manifeste, contre 1 sur 2 pour les PQL. Comme on pouvait s'y attendre, les QTL qui manifestent de la dominance affectent en général des caractères très hétérotiques, comme par exemple des caractéristiques de l'épi (4 pour le diamètre, 2 pour la longueur).

Cette incidence nettement moindre des interactions intra- et inter-locus au niveau des caractères macroscopiques est d'autant plus robuste qu'il y avait presque 2 fois plus d'individus analysés pour la recherche de QTL que pour celle de PQL.

Dans le contexte de la théorie des contrôles métaboliques, on peut assimiler les protéines à autant de molécules impliquées dans les diverses étapes des chaînes métaboliques (enzymes, protéines membranaires, etc), et considérer que les valeurs des caractères macroscopiques sont proportionnelles aux flux qui parcourent ces chaînes (Kacser et Porteous, 1987). D'après cette théorie, et au prix de quelques hypothèses, une variation au niveau d'un enzyme particulier a d'autant moins d'influence sur le flux que le nombre d'étapes de la chaîne est élevé. Ce nombre étant considéré comme très élevé du fait de l'interconnexion des réactions dans la cellule, chaque enzyme (protéine) peut subir des variations de quantité ou d'activité très importantes sans conséquence sensible sur le flux. On conçoit ainsi que les effets de substitution observés pour les PQL, comme les interactions d'épistasie et de dominance, n'aient pas leur équivalent pour les QTL. Certes nous ne savons pas si les protéines analysées, toutes anonymes, jouent un rôle dans les caractères considérés. Mais dans un travail précédent, nous avons montré que statistiquement, la variation quantitative des protéines était positivement corrélée à celle de caractères agromorphologiques globaux (Damerval *et al*, 1987; Leonardi *et al*, 1991).

MÉTHODOLOGIE DE GESTION DE LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE

Diversité génétique

Les résultats illustrent l'ampleur du polymorphisme révélé par RFLP. En considérant le sous-ensemble de sondes ne révélant qu'un locus, 5,8 allèles sont en moyenne révélés par enzyme de restriction. Ce résultat est cohérent avec les résultats de Livini *et al* (1992). Le polymorphisme révélé est donc très nettement supérieur à celui mis en évidence au niveau isoenzymatique pour un matériel génétique comparable (2,3 allèles en moyenne par locus). L'étude des lignées appartenant

à des groupes connus montre leur différenciation très nette au niveau RFLP. Ainsi la figure 2 souligne-t-elle la différenciation entre les lignées d'origine américaine et les lignées d'origine européenne.

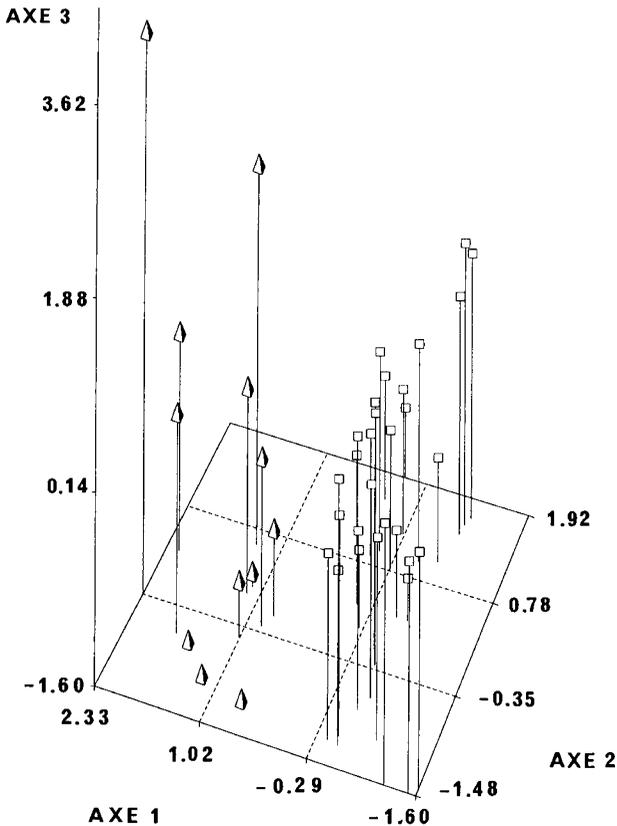


Fig 2. Structuration d'un ensemble de lignées de maïs par analyse en composantes principales sur données de RFLP (69 couples sondes-enzymes). Les pyramides représentent les lignées d'origine européenne, les carrés celles d'origine américaine. Les 3 premiers axes expliquent respectivement 8%, 6% et 5% de la variation.

Par ailleurs, les distances entre lignées ont été évaluées à l'aide de la formule de Rogers (1972) et analysées à l'aide de méthodes de classification. Les résultats, qui soulignent la cohérence entre les regroupements obtenus et la généalogie des lignées (Gallais *et al*, 1992), vont dans le sens d'autres études conduites chez le maïs (Godshalk *et al*, 1990; Dudley *et al*, 1991; Melchinger *et al*, 1991; Boppenmeier *et al*, 1992; Livini *et al*, 1992; Messmer *et al*, 1991 et 1992; Melchinger *et al*, 1992) : les groupes établis à partir de ce type de marqueurs apparaissent très cohérents avec les classifications en groupes hétérotiques et les généalogies (Smith *et al*, 1990). Cela peut avoir des conséquences pratiques en sélection. S'il existe dans le matériel étudié

une structure bien établie à partir d'études empiriques, il est possible, comme dans le travail présenté ici, d'utiliser les techniques de marquage pour déterminer comment du matériel d'origine inconnue se situe par rapport aux groupes hétérotiques, ce qui peut aider à choisir des testeurs appropriés.

Prédiction de l'hétérosis

Nous avons étudié l'intérêt d'indices de distance entre lignées, calculés à partir de données RFLP, pour prédire l'hétérosis. Dans le cadre de modèles classiques de génétique quantitative (Falconer, 1989), l'hétérosis est une fonction de la divergence des parents aux locus présentant des effets de dominance. Dans la mesure où l'on considère que les marqueurs RFLP représentent un échantillonnage de locus au sein du génome, on peut attendre une relation entre la divergence (aux marqueurs) des parents et l'hétérosis. Les résultats obtenus pour un premier ensemble de lignées (Charcosset, 1992) ont mis en évidence une relation significative entre la distance et l'hétérosis pour la productivité des hybrides en grain ou en ensilage. Toutefois cette relation dépend des hybrides considérés et n'est plus significative au niveau des hybrides entre lignées non apparentées. Cette observation est cohérente avec les résultats d'autres études (voir Charcosset, 1992 et Charcosset *et al*, 1993 pour une synthèse). Ces résultats, ainsi que des travaux théoriques (Charcosset *et al*, 1991; Groupe MMM 1993; Charcosset et Essieux), ont contribué à définir les conditions dans lesquelles cette approche de la prédiction était efficace. Il apparaît notamment que la prédiction de l'hétérosis au travers d'indices de distances ne sera pas efficace pour les hybrides entre lignées appartenant à des groupes génétiques différents. Ce résultat souligne la nécessité de mettre au point de nouveaux modèles statistiques, ou d'avoir accès à des techniques révélant un polymorphisme au niveau de gènes directement impliqués dans le phénomène d'hétérosis (Leonardi *et al*, 1991).

ANALYSE DE LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE AU SEIN DE CROISEMENTS EXOTIQUE × TEMPÉRÉ

Le premier plan de l'ACP sur la matrice populations et fréquences alléliques révèle une organisation de la variabilité telle qu'on pouvait l'attendre en l'absence de dérive et de sélection (fig 3).

L'axe 1 discrimine SynFC et Pool14, avec Pool14sel proche de Pool14, et l'axe 2 sépare Pool14A et M-Elite des autres populations. Ce résultat est confirmé si l'on suit un allèle en particulier. La fréquence de Got1-6 dans les différents matériels est conforme aux fréquences attendues en absence de dérive et de sélection (Sanou, 1992). L'utilisation de marqueurs enzymatiques a donc mis en évidence un simple phénomène de dilution de la variabilité exotique dans le matériel tempéré, ce qui signifie que les opérations de sélection n'ont pas entraîné de perte de variabilité. Cependant, ce résultat demande à être confirmé sur un nombre plus élevé de marqueurs.

Au niveau des caractères agromorphologiques, le croisement améliorateur a induit, comme prévu, une diminution de variance, et des modifications des moyennes : le Pool14A est plus précoce et résiste mieux à la verse. L'analyse des corrélations

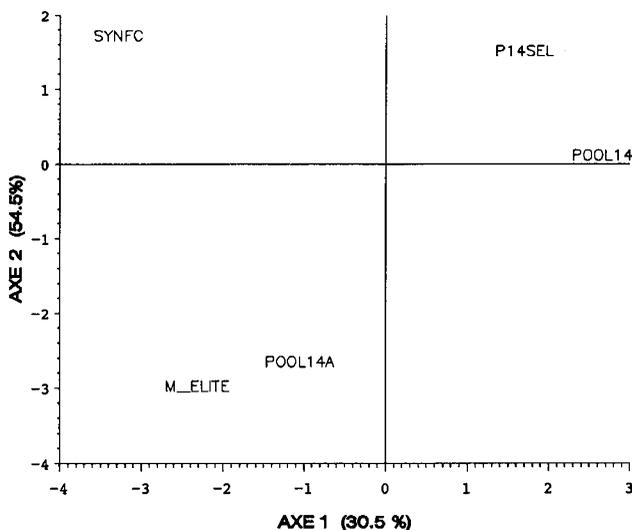


Fig 3. Introgression de matériel exotique dans du matériel tempéré. Premier plan d'une analyse en composantes principales effectuée sur les fréquences alléliques de 4 locus enzymatiques. Pour la définition des populations, voir texte.

productivité-précocité montre une inadaptation du Pool14 avec l'existence de génotypes tardifs et peu productifs, génotypes qui n'apparaissent pas dans le Pool14A, mieux adapté. Ces résultats indiquent que l'exploitation de la variabilité exotique par des croisements améliorateurs est efficace, puisqu'elle permet une meilleure adaptation du matériel, le rendant plus facilement utilisable en sélection.

Dans un programme d'introgression, la sélection permettrait donc de retenir les caractères désirés, tandis que les marqueurs neutres pourraient servir à accélérer l'élimination des régions de génome exotique non utiles.

CONCLUSION

À partir des travaux présentés sur l'utilisation des marqueurs neutres, il nous semble que 2 directions de recherche pourraient, entre autres, être privilégiées.

Pour les analyses de diversité ou de ressources génétiques, on ne tient en général pas compte de la position des marqueurs sur la carte génétique, pour la bonne raison que, jusqu'à une époque récente, celle-ci n'était disponible que sur très peu d'espèces. Or cette information donne accès au déséquilibre de liaison, facteur important de la structuration du polymorphisme. Même si le problème n'est pas simple, cela pourrait conduire à l'établissement de généalogies où les événements de recombinaisons entre génotypes seraient pris en compte (ce qu'ignorent les dendrogrammes). Sur un plan plus pratique de calcul de distances, il est important de contrôler la redondance éventuelle existant entre 2 locus proches.

D'autre part les marqueurs neutres ont des limites (par exemple pour la prédiction de l'hétérosis), limites que l'accès au polymorphisme des gènes directement

impliqués dans les caractères étudiés permettrait de lever. Cependant la caractérisation de QTL par marche chromosomique à partir des marqueurs moléculaires qui leur sont liés ne semble pas, au moins dans l'état actuel des techniques, être réalisable (1 cM représente en moyenne, chez le maïs, 2500 kb). Nous avons montré que l'électrophorèse bidimensionnelle était non seulement une source de marqueurs génétiques, mais aussi une source de variations quantitatives potentiellement non neutres. La constitution de bases de données d'EBD, à partir du séquençage des protéines ou de leur composition en acides aminés, nous semble donc un objectif important, susceptible de fournir de nombreuses protéines candidates.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier M Zivy pour l'aide qu'il nous a apportée pour l'analyse automatique des gels d'électrophorèse bidimensionnelle, S Santoni, M Le Guilloux et C Blanloeil pour leur assistance au laboratoire, P Moreau qui a initié les analyses de lignées par RFLP, et le groupe maïs de l'INRA pour la mise en place du réseau multilocal d'essais. Ce travail a été en partie financé par le programme INRA *ProDIGE* (ministère de l'Agriculture et de la Forêt).

RÉFÉRENCES

- Boppenmeier J, Melchinger AE, Brunklaus-Jung E, Geiger HH, Herrmann RG (1992) Genetic diversity for RFLPs in European maize inbreds: I. Relation to performance of Flint x Dent Crosses for forage traits. *Crop Sci* 32, 895-902
- Burstin J, Zivy M, de Vienne D, Damerval C (1993) Analysis of scaling methods to minimize the experimental variations in two-dimensional electrophoresis quantitative data. Application to the comparison of maize inbred lines. *Electrophoresis*, 14, 1067-1073
- Charcosset A (1992) Prediction of heterosis. In *Reproductive biology and plant breeding* (Dattée Y, Dumas C, Gallais A, eds). Proc XIIIth Eucarpia meeting, Springer-Verlag, Berlin, 355-369
- Charcosset A, Dubreuil P, Essioux L, Gallais A (1993) Utilisation des techniques de marquage génétique pour l'analyse de la variabilité génétique et la prédiction du phénomène d'hétérosis. *Le Sélectionneur Français* (sous presse)
- Charcosset A, Essioux L (1994) The effect of germplasm structure on the relationship between heterosis and heterozygosity at marker loci. *Theor Appl Genet* (sous presse)
- Charcosset A, Lefort M, Gallais A (1991) Relationship between heterosis and heterozygosity at marker loci: a theoretical computation. *Theor Appl Genet* 81, 571-575
- Church G, Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 1991-1995
- Damerval C, de Vienne D, Zivy M, Thiellement H (1986) Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of variation detected in wheat seedling proteins. *Electrophoresis* 6, 52-54

- Damerval C, de Vienne D (1993) Quantification of dominance for proteins pleiotropically affected by Opaque-2 in maize. *Heredity* 70, 38-51
- Damerval C, Maurice A, Josse JM, de Vienne D (1994) Quantitative trait loci underlying gene product variation. A novel perspective for analyzing regulation of genome expression. *Genetics* (sous presse)
- Dudley JW, Saghai-Marouf MA, Rufener GK (1991) Molecular markers and grouping of parents in Maize breeding programs. *Crop Sci* 31, 718-723
- Falconer DS (1989) *Introduction to quantitative genetics* (3rd ed). Longman, London
- Feinberg A, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13
- Gallais A, Duval H, Garnier P, Charcosset A (1992) Un exemple de gestion des ressources génétiques en vue de la sélection. In: *Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques*. Actes du Colloque Jean Pernès, Bureau des ressources génétiques, Paris, 477-490
- Godshalk EB, Lee M, Lamkey KR (1990) Relationship of restriction fragment length polymorphisms to single-cross hybrid performance of Maize. *Theor Appl Genet* 80, 273-280
- Goffinet B, Beckmann J, Boichard D *et al* (1994) Méthodes mathématiques pour l'étude des gènes contrôlant des caractères quantitatifs. Contribution du groupe «MMM». *Genet Sel Evol* 26, 9s-20s
- Kacser H, Porteous JW (1987). Control of metabolism: what do we have to measure? *Trends Biochem Sci* 12, 5-14
- Lander ES, Botstein D (1989) Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121, 185-199
- 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
- Lee M, Godshalk EB, Lamkey KR, Woodman WW (1989) Association of RFLPs among maize inbreds with agronomic performance of their crosses. *Crop Sci* 29, 1067-1071
- Leonardi A, Damerval C, Hébert Y, Gallais A, de Vienne D (1991) Association of protein amount polymorphism (PAP) among maize lines with performances of their hybrids. *Theor Appl Genet* 82, 552-560
- Livini C, Ajmone-Marsan P, Melchinger AE, Messmer MM, Motto M (1992) Genetic diversity of maize inbred lines within and among heterotic groups revealed by RFLPs. *Theor Appl Genet* 84, 17-25
- Melchinger AE, Boppenmeier J, Dhillon BS, Pollmer WG, Herrmann RG (1992) Genetic diversity for RFLPs in European maize inbreds. II. Relation to performance of hybrids within versus between heterotic groups for forage traits. *Theor Appl Genet* 84, 672-681
- Melchinger AE, Messmer MM, Lee M, Woodman WL, Lamkey KR (1991) Diversity and relationships among US maize inbreds revealed by restriction fragment length polymorphisms. *Crop Sci* 31, 669-678
- Messmer MM, Melchinger AE, Boppenmeier J, Herrmann RG, Brunklaus-Jung E (1992) RFLP analyses of early-maturing European maize germplasm. I. Genetic diversity among flint and dent inbreds. *Theor Appl Genet* 83, 1003-1012

- Messmer MM, Melchinger AE, Lee M, Woodman WL, Lee EA, Lamkey KR (1991) Genetic diversity among progenitors and elite lines from the Iowa Stiff Stalk Synthetic (BSSS) maize populations : comparison of allozyme and RFLP data. *Theor Appl Genet* 83, 97-107
- O'Farrell P (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007-4021
- Rogers JS (1972) Measures of similarities and genetic distances. *In Studies in Genetics VII. Univ Tex Publ Vol* 7213, 145-153
- Sanou J (1992) Variabilité génétique dans les croisements tempéré x exotique chez le maïs (*Zea mays* L). DAA Mise en valeur du milieu naturel, option Génie agronomique, ENSA Montpellier
- Smith OS, Smith JSC, Bowen SL, Tenborg RA, Wall SJ (1990) Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F1 grain yield, grain yield, heterosis and RFLPs. *Theor Appl Genet* 80, 833-840
- de Vienne D, Leonardi A, Damerval C (1988) Genetic aspects of protein amount polymorphism in maize and pea. *Electrophoresis* 9, 742-750