

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION	1
A. Objet et cadre du travail présenté	1
B. La canne sucre	3
B.1. Généralités	3
B.1.1. Répartition géographique	3
B.1.2. Taxonomie	4
B.1.3. Morphologie et cycle de la plante	4
B.2. Amélioration variétale	5
B.2.1. Des variétés nobles aux hybrides interspécifiques	5
B.2.2. Croisements et schémas de sélection	7
B.2.3. Cytogénétique	8
B.3. Cartographie génétique de la canne à sucre	8
B.3.1. Quelques éléments de cartographie chez les polyploïdes	8
Ratio de ségrégation chez les polyploïdes	9
Détection de liaisons entre marqueurs simplex	11
B.3.2. La cartographie génétique de la canne à sucre	12
C. La rouille de la canne à sucre	13
C.1. Caractéristiques générales des rouilles	13
C.2. <i>Puccinia melanocephala</i>	14
C.2.1. Historique et distribution	14
C.2.2. Impact sur le rendement	14
C.2.3. Symptômes et transmission de la maladie	15
C.2.4. Facteurs qui influencent le développement de la maladie	16
C.2.5. Races	16
C.2.6. Méthode de lutte contre la rouille	18
D. Les gènes de résistance aux agents pathogènes chez les végétaux	18
D.1. Les interactions hôte-pathogène	19
D.1.1. Résistance verticale et virulence	19
D.1.2. Résistance horizontale et agressivité	20
D.1.3. Durabilité de la résistance	21
D.2. Organisation des gènes de résistance chez les végétaux	21
D.2.1. Répartition des gènes de résistance dans le génome	21
D.2.2. Comparaison entre génomes de différentes espèces	22
D.3. Caractérisation moléculaire des gènes de résistance	23
D.3.1. Clonage de gène de résistance	23
D.3.2. Structure et fonction des protéines codées par les gènes de résistance intervenant dans les interactions gène-à-gène	24
II. ETENDUE D'ACTION DU GENE DE RESISTANCE A ROUILLE IDENTIFIE CHEZ R570	26
ARTICLE 1 Abstract / Résumé	27

Introduction	29
Materials and Methods	30
Results and Discussion	33
Synthèse des principaux résultats obtenus	40
III. RECHERCHE DE MARQUEURS PROCHES ENCADRANT LE GENE MAJEUR DE RESISTANCE A LA ROUILLE CHEZ LA CANNE A SUCRE	41
A. Exploitation de la synténie entre les Poacées	41
A.1. Cartographie comparée entre la canne à sucre, le sorgho, le maïs et le riz	42
A.2. Exploitation de la synténie entre les Poacées pour rechercher des marqueurs proches du gène de résistance à la rouille	43
ARTICLE 2 Abstract / Résumé	45
Introduction	47
Materials and Methods	49
Results	51
Discussion	54
Complément d'information	60
B. Analyse de ségrégation en mélange au moyen de marqueurs	61
B.1. Matériel et Méthode	63
B.1.1. Matériel végétal	63
B.1.2. Evaluation de la résistance à la rouille	63
B.1.3. Protocole AFLP	63
B.1.4. Hybridation Southern	64
B.1.5. Cartographie des marqueurs potentiellement liés au gène ciblé	64
B.2. Résultats et Discussion	64
C. Cartographie comparée entre le sorgho, le riz et la canne à sucre dans la région située au dessus du gène de résistance chez R570	68
C.1. Matériel et Méthode	68
C.1.1. Matériel végétal	68
C.1.2. Clonage d'un marqueur AFLP puis identification et sous-clonage de clones BAC contenant ce marqueur	68
C.1.3. Hybridation Southern sur la canne à sucre et sur le sorgho	69
C.2. Résultats et Discussion	69
D. Conclusion	70
IV RECHERCHE D'UN DESEQUILIBRE DE LIAISON ENTRE LA RESISTANCE A LA ROUILLE ET LES MARQUEURS PROCHES DU GENE MAJEUR DE RESISTANCE IDENTIFIE CHEZ R570	71
A. Introduction	71
A.1. Le déséquilibre de liaison	71
A.2. Le cas des cultivars modernes de canne à sucre	72

B. Matériel et Méthode	73
B.1. Matériel végétal	73
B.2. Evaluation de la résistance à la rouille	74
C. Résultats et Discussion	75
C.1. Caractérisation de l'haplotype porteur de la résistance à la rouille chez SP82-3349	75
C.2. Analyse des cultivars mauriciens	77
V DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	80
Références bibliographiques	86
Annexes	

I. INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

A. OBJET ET CADRE DU TRAVAIL PRESENTE

La canne à sucre, *Saccharum* spp., est cultivée pour sa richesse en sucre dans de nombreux pays des zones tropicales et subtropicales. Les variétés cultivées, hautement polyplœides et aneuploïdes, sont des hybrides interspécifiques principalement issus de croisements entre une espèce domestiquée à forte teneur en sucre, *S. officinarum*, et une espèce sauvage, *S. spontaneum*. La complexité génétique de la canne à sucre rend l'amélioration des caractères d'intérêt agronomique particulièrement difficile. Les progrès récents de la connaissance du génome de la canne, réalisés grâce aux marqueurs moléculaires, ouvrent de nouvelles perspectives quant à leur utilisation dans les programmes d'amélioration et l'étude du déterminisme génétique des caractères sélectionnés.

Les premiers travaux de marquage de facteurs de résistance aux maladies ont porté sur la rouille. Cette maladie, causée par le champignon *Puccinia melanocephala*, est répandue sur tous les continents. Un facteur majeur de résistance a été identifié lors de l'analyse du déterminisme génétique de la résistance chez le cultivar de canne à sucre R570 (Daugrois *et al.*, 1996). Ce cultivar a été développé à la Réunion et est utilisé comme géniteur dans de nombreux programmes de sélection. Chez la canne à sucre, très peu de cas de caractères à hérédité Mendélienne ont été documentés et, à ce jour, ce facteur de résistance apporte le premier exemple de gène majeur de résistance à une maladie identifié chez cette plante. La région génomique qui porte la résistance a été localisée sur la carte génétique de R570 (Grivet *et al.*, 1996) à 7 cM environ d'un marqueur RFLP. Les outils moléculaires et cellulaires sont disponibles pour entreprendre le clonage de ce segment par marche chromosomique. En effet, une banque BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) a été développée à partir du cultivar R570 et la transformation génétique de la canne, déjà appliquée à différents cultivars, est fonctionnelle.

Mon travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'une approche globale de la résistance à la rouille chez la canne à sucre : caractérisation de l'étendue d'action du facteur génétique identifié, marquage fin puis clonage du ou des gènes de résistance, recherche et caractérisation d'autres sources de résistance. Il comprend trois volets :

- tester (i) l'action du facteur de résistance à la rouille identifié chez R570 vis-à-vis de différents isolats de *P. melanocephala* et (ii) l'existence d'autres facteurs génétiques impliqués dans la résistance aux différents isolats chez R570.
- établir une carte génétique précise de la région porteuse de la résistance au travers de deux approches, l'une basée sur la conservation de la synténie entre les Poacées et l'autre sur l'analyse de ségrégation en mélange.
- tester l'identité des locus impliqués dans la résistance à la rouille chez différents cultivars à l'aide de marqueurs liés au facteur de résistance chez R570, identifiés à l'étape précédente.

Le chapitre d'introduction reprend plusieurs éléments de bibliographie nécessaires à la compréhension de l'ensemble du travail qui sera exposé.

Tout d'abord nous aborderons quelques généralités, concernant la canne à sucre et son amélioration variétale, qui nous permettront de mieux connaître le matériel végétal utilisé et d'en préciser la structure génétique. Le travail de marquage fin fait appel à une stratégie de cartographie génétique particulière utilisée chez les polyploïdes. Nous la décrirons en ayant défini, au préalable, les différents types de ploïdie et d'appariement chromosomique à la méiose ainsi que leurs conséquences sur les ratios ségrégations. Nous examinerons les différents travaux de cartographie génétique chez la canne à sucre avec une description plus détaillée de la carte du cultivar R570 qui servira de support au travail de marquage fin.

Nous nous intéresserons ensuite à l'agent pathogène de la rouille de la canne à sucre. La caractérisation de l'étendue d'action du facteur de résistance, identifié chez R570, nécessite une certaine connaissance de la biologie de l'agent pathogène afin de fixer les paramètres expérimentaux. Nous verrons quels sont les symptômes de la maladie, son mode de transmission et les facteurs qui influencent son développement. Nous détaillerons également quelques études concernant les races du pathogène et les moyens de lutte utilisés.

Enfin, nous aborderons les différents types de résistance rencontrés chez les végétaux afin de pouvoir situer le cas étudié par rapport aux résistances décrites. Nous évoquerons également la cartographie des gènes de résistance chez différentes espèces et les principaux résultats obtenus quant au clonage des gènes de résistance chez les végétaux.

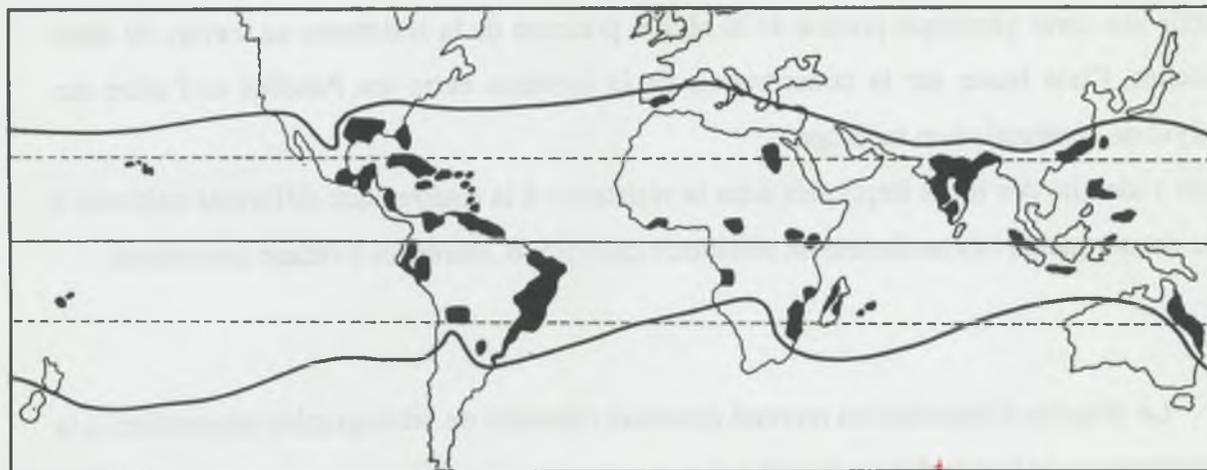


Figure 1 : Répartition de la culture de la canne à sucre dans le monde (d'après Stevenson, 1965).

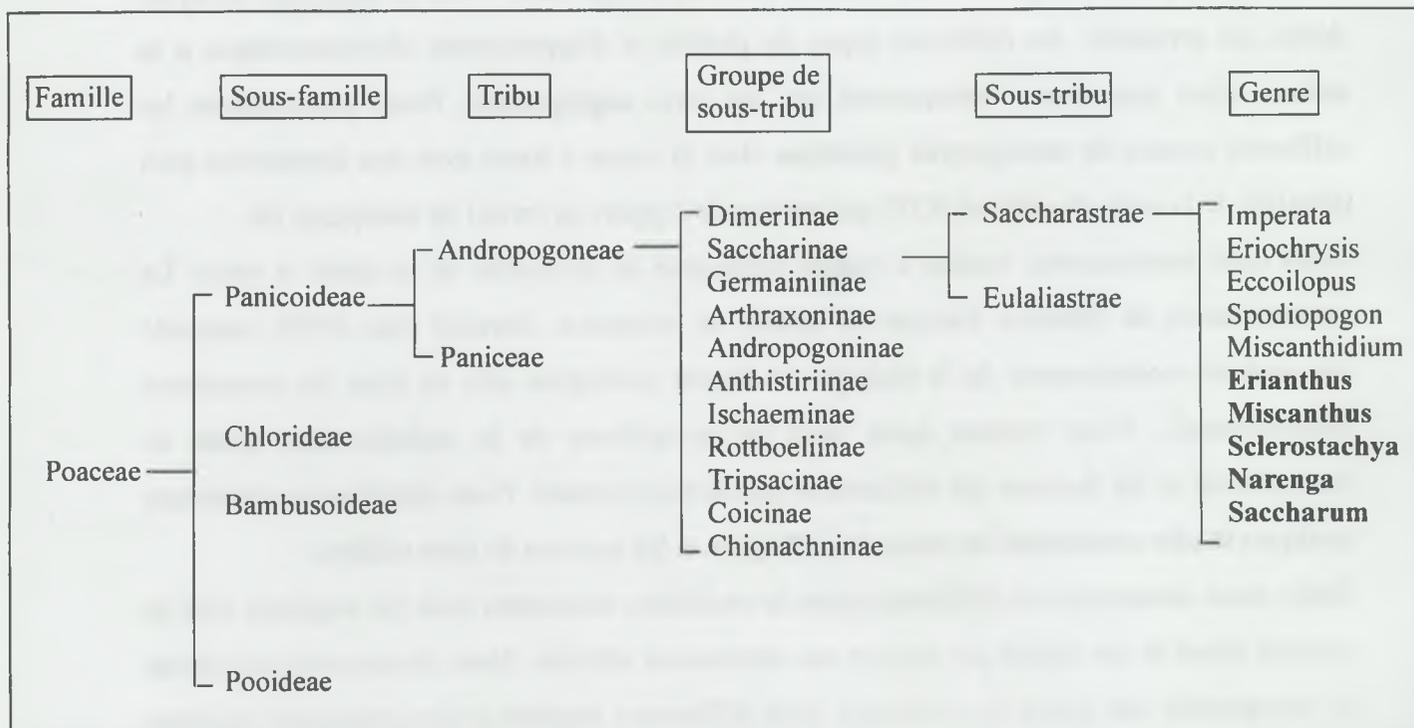


Figure 2 : Place du genre *Saccharum* dans la famille des Poacées (D'après Daniels et Roach, 1987). Les genres qui font partie du complexe *Saccharum* sont indiqués en gras.

B. LA CANNE A SUCRE

B.1. Généralités

La canne à sucre et la betterave à sucre, sont à la base de l'industrie sucrière mondiale. C'est autour de la culture de la canne à sucre qu'est née l'industrie d'extraction du sucre. Actuellement, la production mondiale de saccharose dépasse 120 millions de tonnes par an, dont 60% environ proviennent de la canne et 40% de la betterave (Hunsigi, 1993). Le sucre est un des aliments de base de l'alimentation humaine et sa consommation mondiale progresse de 1 à 2% chaque année. La canne à sucre occupe près de 20 millions d'hectares dans le monde répartis dans 80 pays. La production mondiale a été de 1 253 millions de tonnes pour 1998/99 (source : FAO), les plus gros producteurs étant le Brésil, l'Inde et la Chine (avec une production de 338, 265 et 80 millions de tonnes, respectivement). Il faut environ 8 à 12 tonnes de canne pour extraire 1 tonne de sucre selon les conditions environnementales et les cultivars. Les types d'exploitation sont très variés, allant des grands complexes sucriers de plus de 10 000 hectares (Cuba), aux petites exploitations de 1 hectare (Inde, Mexique).

Hormis le saccharose, d'autres produits sont dérivés de la canne à sucre : la bagasse (résidu fibreux résultant du pressage des tiges) est utilisée comme combustible, les écumes (résidu de filtration) et la vinasse peuvent servir d'amendement dans les champs de canne, la mélasse (résidu liquide sucré) a un large registre d'utilisation : distillation pour produire de l'alcool, fabrication d'aliments pour bétail, etc.

B.1.1. Répartition géographique

La canne à sucre est utilisée et cultivée par l'homme depuis plusieurs millénaires. Selon Hunsigi (1993), la référence la plus ancienne à cette plante date de 3000 avant J.C. La Nouvelle Guinée/Papouasie serait le centre d'origine de la canne à sucre, à partir duquel elle aurait été progressivement diffusée à l'ouest et au nord vers la Chine et l'Inde et à l'est vers les îles du Pacifique sud. Vers 500 avant J.C., les Perses et les Arabes ont amené la canne jusqu'à la Méditerranée puis sa culture s'est développée dans la plupart des régions tropicales de l'Amérique (Antilles, Brésil, Mexique, Pérou, etc.). C'est vers 1650 qu'elle atteint les îles Mascareignes (Maurice et Réunion). La répartition actuelle de la culture de la canne à sucre est représentée sur la figure 1.

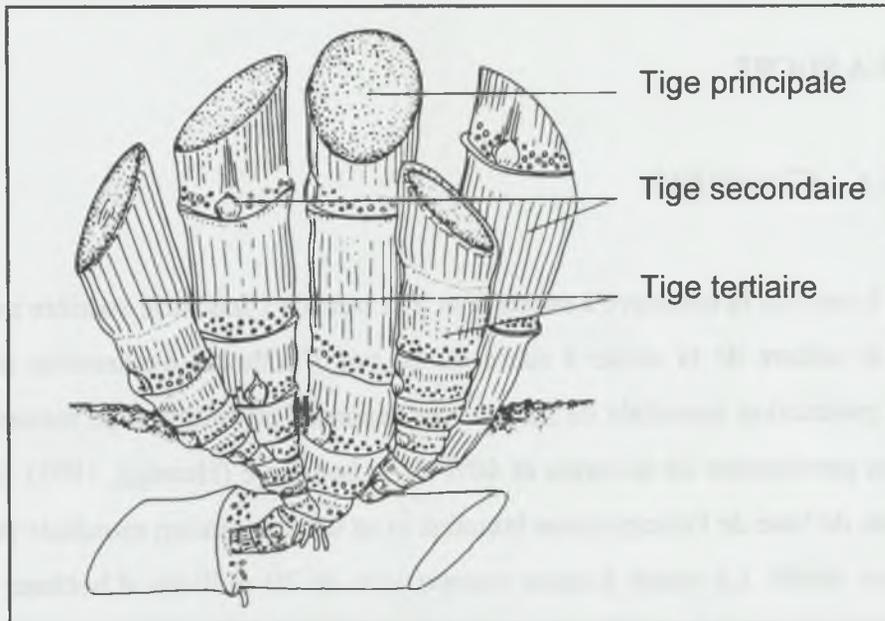


Figure 3 : Processus de tallage conduisant à la multiplication des tiges (d'après Blackburn, 1984).

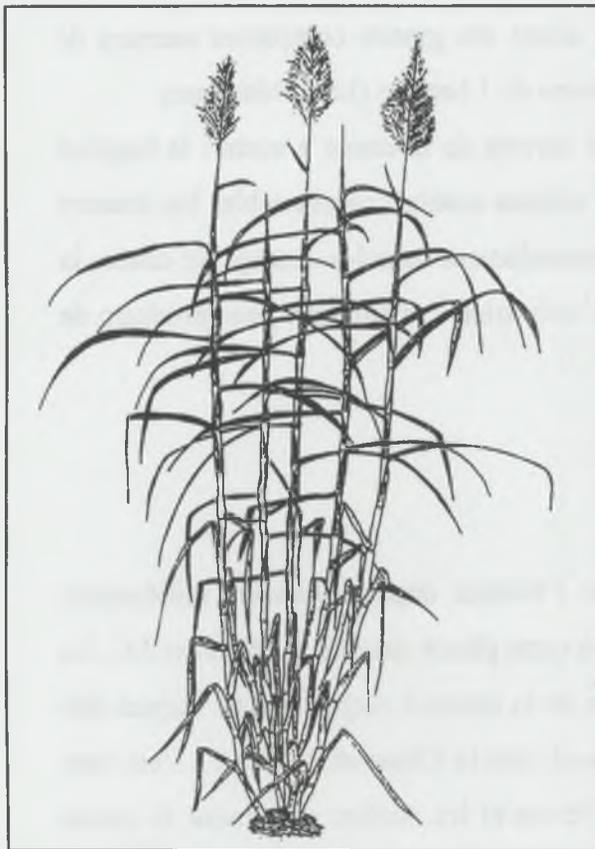


Figure 4 : Aspect général d'un plan de canne à sucre.

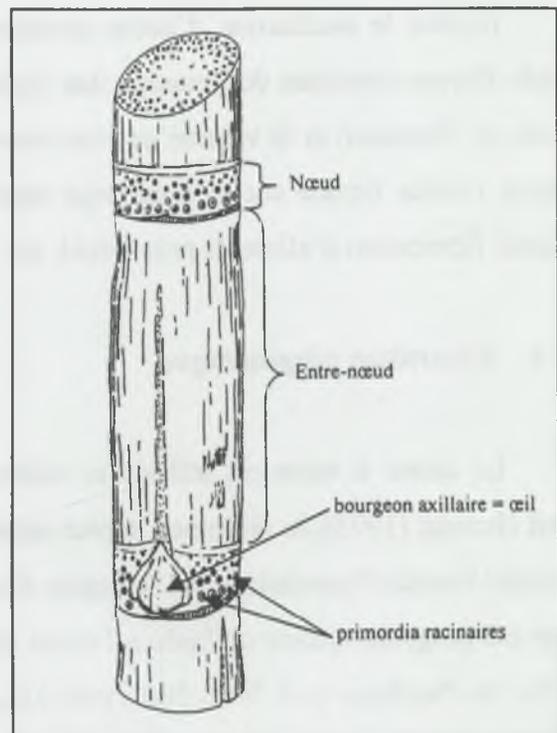


Figure 5 : Détails de l'organisation de la tige de canne à sucre (d'après Moore, 1987).

B.1.2. Taxonomie

La Canne à sucre (*Saccharum* spp.) est une monocotylédone de la famille des *Poaceae* ou *Gramineae*, qui appartient à la tribu des *Andropogoneae* au même titre que deux céréales majeures : le maïs et le sorgho. Au sein de la sous-tribu des *Saccharastrae* (figure 2), cinq genres interfertiles : *Saccharum*, *Erianthus*, *Sclerostachya*, *Miscanthus* et *Narenga*, sont regroupés sous le nom de "complexe *Saccharum*". Le genre *Saccharum* compte six espèces. On distingue les espèces cultivées riches en sucre, *S. officinarum* L., *S. barberi* Jesw. et *S. sinense* Roxb., des espèces sauvages à faible teneur en sucre *S. spontaneum* L. et *S. robustum* Jesw.

- *S. officinarum* L. ($2n = 80$ chromosomes), originaire d'Indonésie/Nouvelle Guinée, est l'espèce qualifiée de "canne noble" de par sa richesse en sucre.

- *S. barberi* Jesw. ($2n = 81$ à 124 chromosomes) et *S. sinense* Roxb. ($2n = 111$ à 120 chromosomes) sont des formes originaires d'Inde et de Chine, respectivement. Ces deux groupes taxonomiques seraient le résultat d'hybridations interspécifiques entre *S. officinarum* et des formes locales de *S. spontaneum*.

- *S. edule* Hassk. ($2n = 60$ à 80 chromosomes), très proche de *S. robustum*, est originaire de Nouvelle Guinée. Cette espèce est une forme marginale de canne cultivée pour son inflorescence stérile comestible.

- *S. robustum* Jesw. ($2n = 60, 80$ et jusqu'à 200 chromosomes) est l'espèce sauvage à partir de laquelle aurait été domestiquée *S. officinarum*. Elle est naturellement implantée en Papouasie/Nouvelle Guinée.

- *S. spontaneum* L. ($2n = 40$ à 128 chromosomes) a une très large répartition géographique (Asie et Afrique) et de nombreux écotypes, présentant une grande diversité morphologique, ont été répertoriés.

B.1.3. Morphologie et cycle de la plante

La canne à sucre est une plante pérenne dont l'aspect morphologique général est caractéristique de la famille des Poacées. Le processus de multiplication des tiges par tallage (figure 3) donne un aspect touffu à la plante (figure 4). Les tiges (figure 5), organes de stockage du sucre, comptent 20 à 30 entre-nœuds à maturité et mesurent entre 2 et 3 mètres. Chaque nœud correspond au point d'insertion d'une feuille (figure 6) et comporte un bourgeon axillaire.

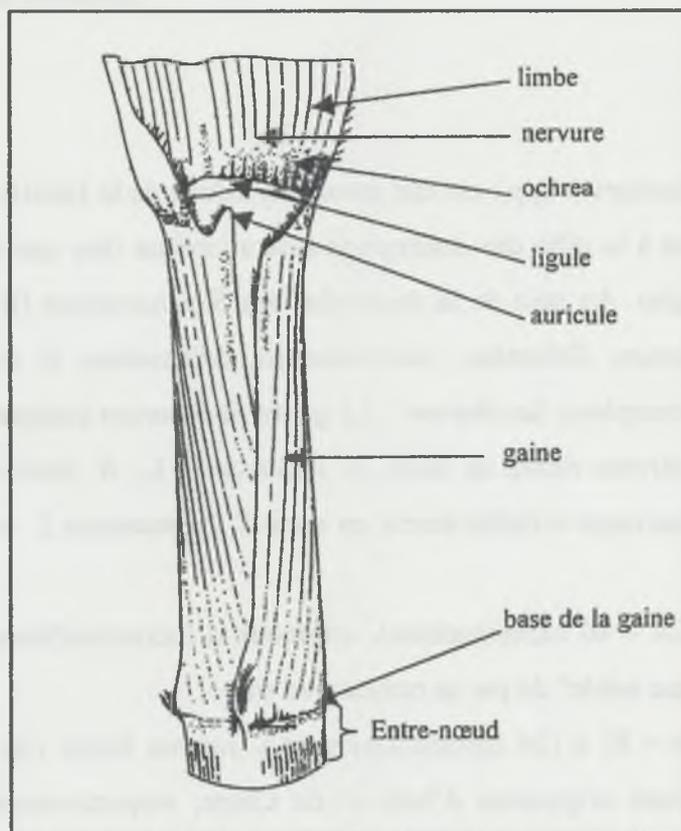


Figure 6 : Détails de la structure de la feuille de canne à sucre (d'après Moore, 1987).



Figure 7 : Panicules de canne à sucre (COPERSUCAR, Piracicaba, Brésil, août 1998).

Les conditions environnementales idéales pour le bon développement de la plante reposent essentiellement sur une bonne irrigation et une température moyenne de 30 à 34°C (croissance maximale) tout au long de la période de croissance avec une période plus sèche et plus froide avant la récolte. La production d'inflorescences ou panicules (figure 7) a lieu en octobre/décembre dans l'hémisphère nord et en avril/juin dans l'hémisphère sud. Elle dépend de facteurs environnementaux (température, photopériode, etc.) et génétiques (certaines variétés ne fleurissent pas). Les fleurs sont hermaphrodites et présentent des degrés variables de stérilité mâle. L'ensemble des graines d'une panicule est appelé le "fuzz". Les graines sont réservées à la création variétale et la plante est multipliée par bouturage des tiges.

La récolte de la canne peut être faite en moyenne 10 à 24 mois après la mise en terre des boutures. La canne repousse après chaque coupe, mais après quelques années d'exploitation, les variétés ne maintiennent pas leurs caractéristiques originales et accusent des pertes de vigueur et de rendement graduelles probablement liées à des phénomènes de dégradation du sol et à l'apparition de maladies.

B.2. Amélioration variétale

B.2.1. Des variétés nobles aux hybrides interspécifiques

La diffusion de la culture de la canne à sucre depuis l'Inde vers l'ouest, son introduction en Amérique puis le développement des plantations jusqu'au milieu du XVIIIe siècle, se seraient effectués à partir d'un petit nombre de clones de l'espèce *S. barberi*. Le premier clone exploité à grande échelle a été baptisé Créole (il pourrait s'agir d'un clone de *S. barberi* ou d'un hybride entre *S. barberi* et *S. officinarum*).

L'ère moderne de la canne à sucre commence vers la fin du XVIIIe siècle avec l'utilisation de variétés dites "nobles" qui sont des clones de *S. officinarum*. On pratiquait la substitution clonale qui consistait à remplacer des variétés nobles par des formes naturelles de la même espèce plus productives et collectées au cours de prospections dans les îles du Pacifique. Certaines variétés nobles ont eu une grande importance économique. Par exemple, la variété Bourbon (ou Otaheite) a été exploitée dans le monde entier (Brésil, Guyane anglaise, Hawaii, Maurice, Mexique, etc.) jusqu'au milieu du XIXe siècle. Puis les cannes nobles Lousier, Chéribon et Tanna se sont succédées (Stevenson, 1965).

Les clones les plus utilisés jusqu'en 1880 étaient mâles stériles et laissaient supposer que la canne à sucre se reproduisait uniquement par multiplication végétative. Ce n'est qu'au milieu du XIXe siècle, dans l'île de Barbade, que des plantules issues de graines ont été observées pour la première fois (Stevenson, 1965).

Les premières variétés commerciales (POJ100 et EK28) issues de la multiplication sexuée de la canne ont été produites vers 1890 à partir de croisements entre cannes nobles. Cependant, la variabilité génétique intraspécifique de *S. officinarum* ne permettait pas d'obtenir des variétés améliorées pour certains caractères tels que l'adaptation à des conditions environnementales particulières ou la résistance aux maladies qui ravageaient les plantations, en particulier la mosaïque, probablement propagée par importation de matériel végétal sans aucune précaution phytosanitaire. D'autres espèces, appartenant au "complexe *Saccharum*" (en particulier *S. spontaneum* et *S. barberi*), sont alors introduites dans les programmes de sélection. Ces procédures d'introgession portent le nom de "nobilisation". Elles consistent à croiser un clone noble (*S. officinarum*), riche en sucre, avec un clone d'une espèce apparentée, puis à recroiser l'hybride sur un clone de l'espèce parentale noble de façon à obtenir un phénotype cultivable tout en conservant les caractères intéressants apportés par le clone apparenté. Le clone noble n'est pas nécessairement le même à chaque génération de croisement, ceci afin de maintenir une vigueur élevée. Cette approche a été utilisée pour la première fois à Java. L'un des hybrides interspécifique, POJ2878, impliquant *S. officinarum* et *S. spontaneum*, a occupé 90% de la sole cannière de cette île et a connu un succès mondial. Ces premiers hybrides dits "nobilisés" ont permis un progrès génétique considérable, notamment en matière de résistance aux maladies mais surtout d'amélioration du rendement et d'adaptabilité à différentes conditions environnementales. A partir de 1925, les variétés nobles sont remplacées par les hybrides interspécifiques, issus de la nobilisation, sur l'ensemble des plantations de canne à sucre.

Les variétés modernes sont toutes issues de croisement entre clones "nobilisés". Selon Arcenaux (1967), la généalogie des cultivars modernes repose sur une base génétique étroite. En effet, seuls 19 clones de *S. officinarum*, quelques clones de *S. spontaneum*, un clone de *S. barberi* (Chunnee) et un clone de *S. robustum* auraient participé à l'élaboration des cultivars modernes. Différents centres de sélection (Australie, Barbade, Louisiane) ont mis en place des programmes d'élargissement de la variabilité génétique des clones cultivés en intégrant de nouveaux clones de *S. spontaneum* et de *S. officinarum*. Des programmes utilisant certains clones du genre *Erianthus* ou *Miscanthus* ont également été tentés mais n'ont pas abouti à ce

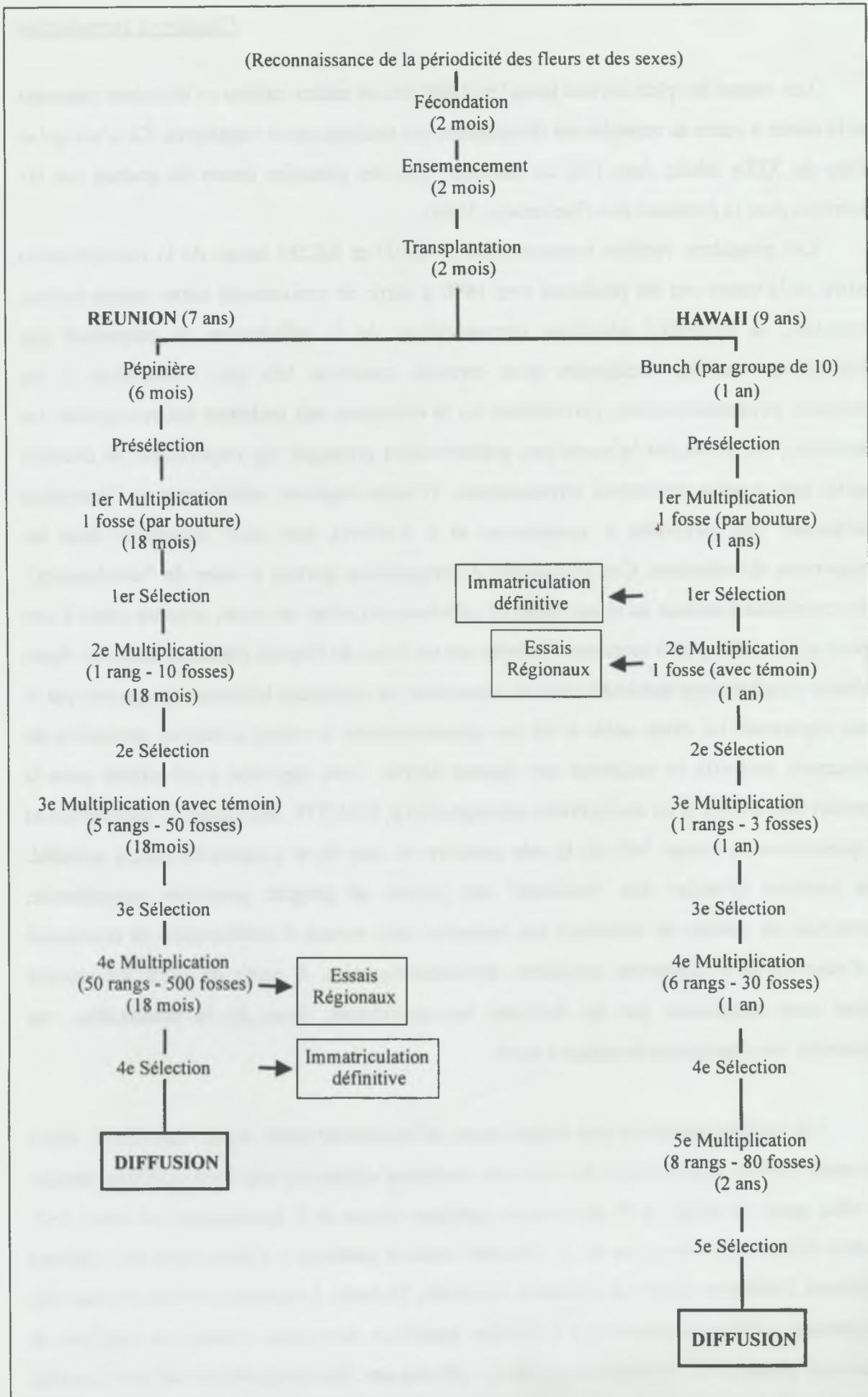


Figure 8 : Exemples de schémas de sélection (d'après Fauconnier et Bassereau, 1970).

jour. Ce rétrécissement de la variabilité en amont de la sélection des cultivars modernes a été considéré comme responsable du ralentissement du progrès génétique observé dans les années soixante. Cependant, une étude de diversité récente, portant sur 162 clones dont 109 variétés modernes (hybrides interspécifiques) et 53 clones de *S. officinarum*, montre que les cultivars modernes sont extrêmement polymorphes et ont conservé une grande part de la variation de *S. officinarum* (Jannoo *et al.*, 1999a).

B.2.2. Croisements et schémas de sélection

La canne à sucre est une plante à pollinisation anémophile qui est préférentiellement allogame mais tolère l'autofécondation. Les croisements biparentaux dirigés doivent être effectués en conditions contrôlées et en utilisant des porte-graines mâles stériles comme parent femelle. Au moment de la floraison, les tiges portant les inflorescences mâles et femelles sont prélevées et placées dans une solution acide (pour prévenir le développement de bactéries) sous une même lanterne de croisement étanche pendant 4 à 10 jours afin d'éviter les contaminations polliniques extérieures. Le choix des géniteurs comporte certaines contraintes liées à l'absence de floraison chez certains clones, à la stérilité mâle et au décalage des périodes de floraison.

Un seul croisement produit des centaines de graines parmi lesquelles chacune représente une variété commerciale potentielle. En général, les stations d'amélioration débutent un nouveau programme de sélection chaque année avec 250 000 à 1 million de plantules. Après 2 mois, les plantules sont repiquées individuellement ou par groupes de 5 à 10 ("bunch"). Les clones les plus vigoureux sont ensuite évalués au champ (le taux de sélection est d'environ 10% pour cette première étape). A chaque étape de sélection (3 à 6) la taille de la parcelle élémentaire attribuée à chaque clone sélectionné augmente, puis des essais multilocaux sont mis en place (figure 8). Il faut, en moyenne, 7 à 12 ans pour sélectionner une variété de canne à sucre.

Les principaux critères de sélection sont :

- dès les premiers stades de sélection, la teneur en sucre des tiges (ou le brix, qui est un indice mesuré par un réfractomètre permettant d'évaluer le taux de matière sèche dissout représentatif de la teneur en saccharose) et l'aspect général de la plante qui regroupe la vigueur végétative et la résistance aux maladies telles que la rouille (*Puccinia melanocephala*) le charbon (*Ustilago scitaminea*) ou l'échaudure des feuilles (*Xanthomonas albilineans*).

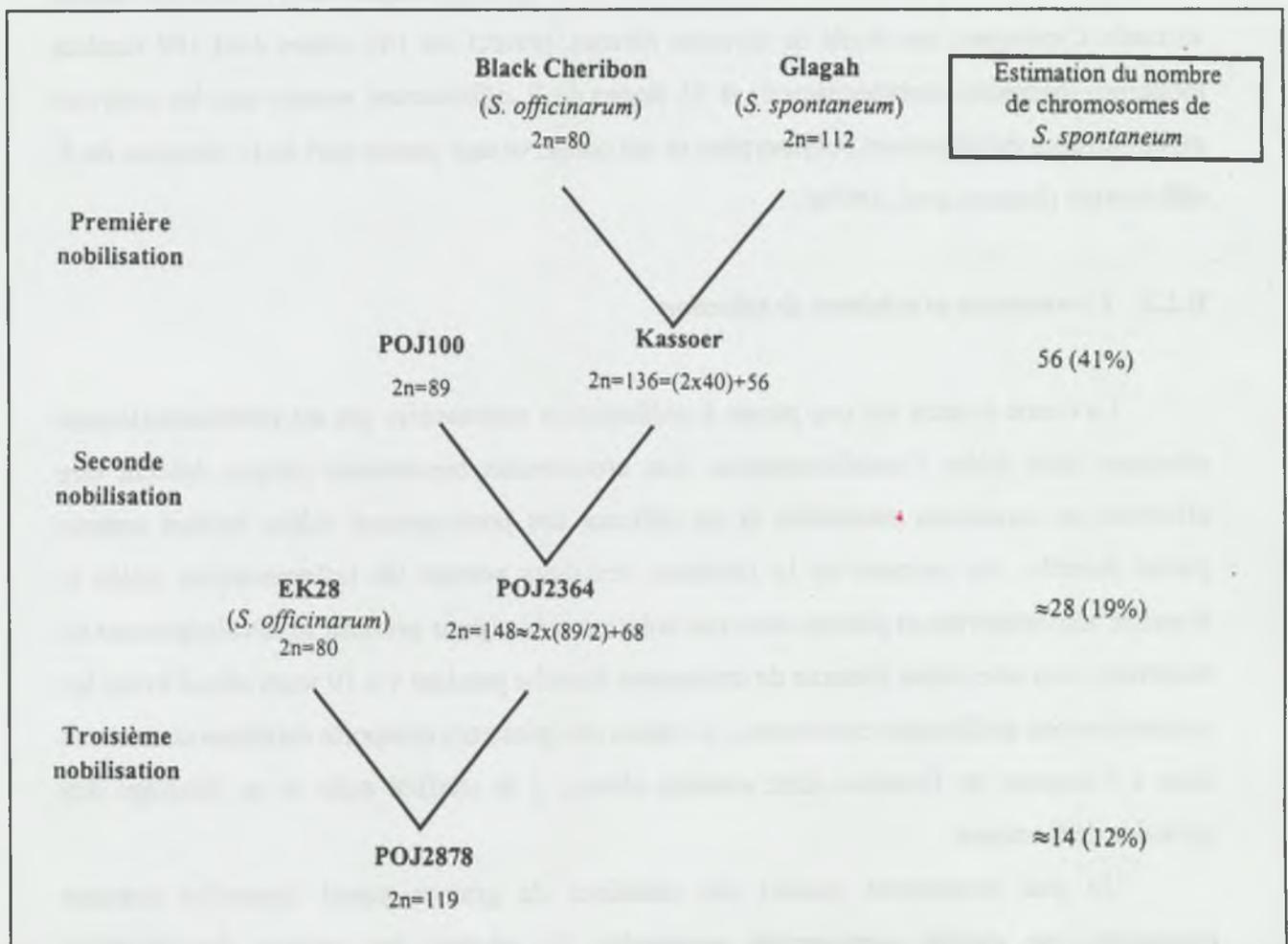


Figure 9 : Transmission gamétique au cours de la nobilisation ayant conduit à la variété POJ2878 (d'après Grivet, 1995).

- dans les dernières étapes, la productivité et la tenue en repousse.

B.2.3. Cytogénétique

Les espèces du genre *Saccharum* sont toutes polyploïdes et aneuploïdes. Le nombre total de chromosomes varie entre espèces et peut également varier au sein d'une même espèce. Par exemple, chez *S. spontaneum*, le nombre de chromosomes varie de 40 à 128 selon les clones. Deux nombres de chromosomes de base (x) différents coexistent avec $x = 8$ chez *S. spontaneum* et $x = 10$ chez *S. officinarum* et *S. robustum* (D'Hont *et al.*, 1998).

Les variétés modernes de canne à sucre, d'origine interspécifique, sont hautement polyploïdes et aneuploïdes. Le processus de nobilisation a entraîné une augmentation du nombre de chromosomes due à une transmission gamétique de $2n$ chromosomes à partir du parent *S. officinarum* lors du premier croisement et du premier rétrocroisement (figure 9). Les cultivars modernes contiennent $2n = 100$ à 130 chromosomes dont 15 à 25% proviennent de l'espèce sauvage *S. spontaneum* (D'Hont *et al.*, 1996).

B.3. Cartographie génétique de la canne à sucre

Nous présenterons, dans un premier temps, quelques particularités de la cartographie génétique chez les polyploïdes (ratio de ségrégation en fonction des différents types d'appariements chromosomiques et détection de liaisons entre marqueurs) de façon à mieux appréhender la cartographie génétique de la canne à sucre.

B.3.1. Quelques éléments de cartographie chez les polyploïdes

Une plante est définie comme étant polyploïde lorsqu'une cellule somatique contient plus de deux chromosomes dans au moins une classe d'homologie (Allard, 1960). On différencie deux types de polyploïdes : les autopolyploïdes et les allopolyploïdes.

Un autopolyploïde présente plus de deux copies d'un même génome de base. Par exemple, la luzerne est un autotétraploïde qui possède quatre copies d'un même génome. L'autopolyploïdie est principalement causée par la fusion de gamètes non réduits provoquant une multiplication du génome de base (de Wet, 1980). Les chromosomes d'une même classe d'homologie appartiennent tous à la même espèce et sont dits homologues. Les

autopolyploïdes sont caractérisés par la présence de multivalents à la méiose et par des ratios de ségrégation polysomiques (qui résultent d'associations aléatoires de deux ou plusieurs chromosomes au sein de la même classe d'homologie).

Un allopolyploïde présente plusieurs copies de différents génomes de base. Par exemple, l'avoine est un allohexaploïde constitué de trois génomes de base : A, B et C (Rajhathy et Thomas, 1974). L'allopolyploïdie résulte d'hybridations interspécifiques. Les chromosomes d'une même classe d'homologie appartenant à différentes espèces sont dits homéologues. Les allopolyploïdes sont caractérisés par un comportement cytologique très proche de celui des diploïdes, avec une quasi absence de multivalents et des ratios de ségrégation disomiques (qui résultent de l'appariement préférentiel entre deux chromosomes homologues donnés).

Les relations décrites entre le type de polyploïdie et les différents comportements chromosomiques à la méiose représentent les situations les plus couramment observées. Cependant, cette association de caractéristiques ne s'applique pas à tous les polyploïdes. Par exemple, chez la canne à sucre, il semble que les espèces de base du genre *Saccharum* soient des autopolyploïdes (Da Silva *et al.*, 1993 et 1995 ; Al-Janabi *et al.*, 1993) même si les chromosomes s'apparient majoritairement en bivalents à la méiose (Price, 1963). La ségrégation est de type polysomique chez *S. spontaneum* (Da Silva *et al.*, 1993 ; Al-Janabi *et al.* 1993 et 1994) et serait partiellement disomique chez *S. officinarum* et *S. robustum* (Al-Janabi *et al.*, 1994 ; Ming *et al.*, 1998). Chez les hybrides interspécifiques, la ségrégation est de type polysomique, toutefois, les chromosomes de même origine semblent s'associer préférentiellement (Grivet *et al.*, 1996 ; D'Hont *et al.*, 1996 ; Jannoo *et al.*, en préparation).

Ratio de ségrégation chez les polyploïdes

Chez les diploïdes, chaque allèle d'un locus donné peut être présent en une seule copie si l'individu est hétérozygote au locus en question ou en deux copies si l'individu est homozygote. Chez les polyploïdes d'un niveau de ploïdie h , le nombre de copies d'un allèle à un locus peut varier de 1 à h . On dira qu'un allèle est simplex ou duplex lorsqu'il est présent en une ou deux copies, respectivement, à un locus donné. Dans le cas de locus RFLP il s'agira de SDRF (*Single Dose Restriction Fragment*) et DDRF (*Double Dose Restriction Fragment*) (Wu *et al.*, 1992). D'une façon générale, lorsqu'un allèle est présent en plusieurs copies, on parlera d'allèles multiplex (ou MDRF dans le cas d'un locus RFLP). Les ratios de ségrégation des différents allèles d'un locus dans la descendance varient en fonction du nombre de copies

Tableau I.1. Ratio de ségrégation d'un marqueur simple, duplex et triplex dans une descendance issue d'une autofécondation, pour différents types et niveaux (h) de ploïdies (d'après Grivet, 1995).

Type de ploïdie	allèle simple	allèles duplex	allèle triplex
allopolyploïdie	3/1	15/1*	63/1*
autopolyploïdie (h = 12)	3/1	18,4/1	130/1
autopolyploïdie (h = 10)	3/1	19,2/1	163/1
autopolyploïdie (h = 8)	3/1	21/1	255/1
autopolyploïdie (h = 6)	3/1	24/1	1023/1
autopolyploïdie (h = 4)	3/1	35/1	-

* Cas où les différentes copies de l'allèle sont sur des chromosomes appartenant à des couples homéologues différents

de chacun des allèles dans le génome des parents et du mode d'appariement des chromosomes à la méiose. Etudions le cas d'un marqueur dominant dans une descendance issue d'autofécondation avec formation de bivalents à la méiose (cas de la canne à sucre). Notons que les cultivars de canne à sucre sont très hétérozygotes (Jannoo *et al.*, 1999a) du fait de leur origine interspécifique, et que l'étude d'une descendance issue de l'autofécondation d'un cultivar se rapporte au cas d'une descendance F2.

Comportement disomique (bivalent/autofécondation)

Allèles simplex

A la méiose deux types de gamètes, [+] et [-] ([+] : marqueur présent et [-] : marqueur absent), seront formés en proportions égales 1:1, et on observera deux phénotypes [+] et [-] dans la descendance en proportion 3:1.

Allèles multiplex

- *Allèles duplex*. Si les deux copies de l'allèle sont sur des chromosomes homologues, tous les gamètes sont [+] et il n'y aura pas de ségrégation dans la descendance. Si les deux allèles sont portés par des chromosomes homéologues le phénotype [+] ségrégera selon les proportions 3:1 dans les gamètes et 15:1 dans la descendance (annexe 1).

- *Allèles dont le nombre de copies est supérieur à 2*. La fréquence des gamètes [+] augmente considérablement par rapport à la situation précédente (tableau I.1.). La détection d'individus de phénotype [-] dans la descendance nécessite, par conséquent, le criblage d'un grand d'individus.

Comportement polysomique (bivalent/autofécondation)

Allèles simplex

Comme pour une ségrégation de type disomique, on observera deux phénotypes [+] et [-] dans la descendance en proportion 3 : 1 (annexe 1).

Allèles multiplex

A partir de deux copies d'un même allèle, la fréquence des individus de phénotype [+] dans la descendance augmente en même temps que le niveau de ploïdie (tableau I.1.). La détection de ces allèles nécessite le criblage d'un grand nombre de descendants.

Si un allèle est présent en plusieurs copies à un locus donné, le ratio de ségrégation du phénotype [+] dans les gamètes ou dans la descendance dépend du type de ségrégation et/ou du niveau de ploïdie h (tableau I.1.). Par ailleurs, la détection d'allèles multiplex requière

l'étude d'un grand nombre d'individus (surtout à partir de trois copies du même allèle dans le génome du parent). En revanche, la ségrégation (3:1) d'un marqueur simplex dominant reste inchangée quel que soit le type de ségrégation chromosomique ou le niveau de ploïdie des individus et peut être testée dans des descendance de 100 à 200 individus habituellement manipulées. Les allèles simplex sont donc très informatifs et seront majoritairement utilisés dans les études de cartographie d'espèces polyploïdes. Mather (1957) montre que la comparaison des ratio $[+]/[-]$ des différents marqueurs permet de distinguer les marqueurs simplex des marqueurs multiplex ; les marqueurs simplex étant ceux dont le ratio présent/absent est inférieur à 6,7 (annexe 2).

Détection des liaisons entre marqueurs simplex

Considérons deux marqueurs simplex et dominants A et B. A la méiose, les deux marqueurs A et B s'associeront de façon aléatoire dans les gamètes s'ils ne sont pas liés. Ainsi, les gamètes de type recombinant [A] et [B] et de type non-recombinant [AB] et [-] (gamètes dont le phénotype ne présente aucun des deux marqueurs) auront la même fréquence. En revanche, si les marqueurs A et B sont liés sur le même chromosome (couplage) ou sur deux chromosomes distincts (répulsion) les fréquences observées seront différentes des fréquences attendues sous l'hypothèse d'indépendance des locus. Les effectifs observés pourront alors être utilisés pour calculer le taux de recombinaison r entre les locus étudiés. Etudions les fréquences attendues des différents gamètes produits sous l'hypothèse de liaison entre deux locus simplex chez un polyploïde avec formation de bivalents à la méiose. Nous distinguerons deux cas : les liaisons en couplage et en répulsion.

Liaison en couplage. Quatre types de gamètes [AB], [-], [A] et [B] sont attendus. Les fréquences associées à chaque type de gamète (tableau I.2.) sont fonction du taux de recombinaison r entre les locus mais indépendants du niveau ploïdie.

Liaison en répulsion. Quatre types de gamètes [AB], [-], [A] et [B] sont attendus. Soit h le niveau de ploïdie (nombre de chromosomes dans une même classe d'homologie), à la méiose deux cas se présentent :

(i) les chromosomes portant le locus A et le locus B ne s'apparient pas et les quatre types de gamètes ont la même fréquence ($1/4$). Cet événement se produit avec la probabilité P_1 .

$$P_1 = \frac{1}{h-1}$$

Tableau I.2. Fréquences attendues des différents types de gamètes produits pour deux SDRF A et B liés en couplage ou en répulsion chez des allopolyploïdes ou des autopolyploïdes. SDRF = *single dose restriction fragment*, $r_{1/2}$ = taux de recombinaison entre les loci marqueurs A et B liés en couplage/répulsion, $w = 1/(h-1)$ et h = niveau de ploïdie ou nombre de chromosomes dans la même classe d'homologie (d'après Wu *et al.*, 1992).

Phénotypes des gamètes	Phase	
	couplage	répulsion
AB	$0,5 (1-r_1)$	$0,25 (1-w) + 0,5 w r_2$
A	$0,5 r_1$	$0,25 (1-w) + 0,5 w (1-r_2)$
B	$0,5 (1-r_1)$	$0,25 (1-w) + 0,5 w (1-r_2)$
-	$0,5 r_1$	$0,25 (1-w) + 0,5 w r_2$

(ii) les chromosomes portant le locus A et le locus B s'apparient et les fréquences de chaque type de gamète dépendent du taux de recombinaison r . Cet événement se produit avec une probabilité P_2 .

$$P_2 = 1 - \frac{1}{h-1}$$

Les fréquences associées à chaque type de gamètes dans ce cas sont détaillées dans le tableau I.2. Elles dépendent du niveau de ploïdie h et tendent vers $1/4$ lorsque h augmente. Pour des polyploïdes de niveau élevé, comme la canne à sucre, ces liaisons sont difficilement détectables pour les effectifs de descendants habituellement manipulés.

En conclusion, les cartes génétiques des polyploïdes seront majoritairement développées à partir de marqueurs simplex et seules les liaisons en couplage pourront être détectées dans les analyses classiques. Cette stratégie de cartographie, utilisée chez la canne à sucre, présente l'avantage de s'adapter aux outils statistiques et aux logiciels de cartographie développés pour les espèces diploïdes, dans la mesure où les ratios de ségrégation des marqueurs étudiés sont les mêmes que ceux des diploïdes.

B.3.3. Cartographie génétique de la canne à sucre

Malgré la complexité du génome qui caractérise les espèces du genre *Saccharum*, plusieurs cartes génétiques ont été développées sur trois espèces du genre *Saccharum* qui sont (tableau I.3.) :

- *S. officinarum*, Guimaraes *et al.*, 1997 ; Ming *et al.*, 1998.
- *S. spontaneum*, Al-Janabi *et al.*, 1993 ; Da Silva *et al.*, 1993 et 1995 ; Ming *et al.*, 1998.
- *S. robustum*, Guimaraes *et al.* 1997 ; Ming *et al.*, 1998 (la carte produite par Ming *et al.* ne contient que 19 groupes de coségrégation et n'a pas été inscrite dans le tableau I.3.).

Les cartes génétiques des cultivars (hybrides interspécifiques) R570 (Grivet *et al.*, 1996 ; Hoarau *et al.*, en préparation) et SP701006 (D'Hont *et al.* 1994) ont également été construites (tableau I.3.).

La majorité de ces cartes génétiques a été construite à partir de marqueurs RFLP qui sont spécifiques des locus qu'ils révèlent. Cette caractéristique des marqueurs RFLP permet de réunir les groupes de coségrégation en groupes de liaison sur la base de sondes en commun. Chaque groupe de coségrégation correspond à un chromosome ou à un segment de

Tableau I.3. Cartographie génétique chez la canne à sucre (GC : groupe de coségrégation et GL : groupe de liaison).

Clone ou cultivar	Nombre et type de marqueurs	Nombre de GC / GL	Taille en cM	Référence
<i>S. spontaneum</i> (SES208)	216 (RFLP)	44 / 8	1361	Da Silva <i>et al.</i> , 1993
<i>S. spontaneum</i> (SES208)	208 (APPCR)	42 / -	1500	Al-Janabi <i>et al.</i> , 1993
<i>S. spontaneum</i> (SES208)	527 (RFLP, APPCR)	64 / 8	-	Da Silva <i>et al.</i> , 1995
<i>S. spontaneum</i> (IND81-146)	248 (RFLP)	69 / 10	2063	Ming <i>et al.</i> , 1998
<i>S. spontaneum</i> (PIN84-1)	182 (RFLP)	69 / 7	1303	Ming <i>et al.</i> , 1998
<i>S. officinarum</i> (LA Purple)	345 (RFLP, APPCR, AFLP)	74 / -	-	Guimaraes <i>et al.</i> , 1997
<i>S. officinarum</i> (Green German)	270 (RFLP)	72 / 10	2304	Ming <i>et al.</i> , 1998
<i>S. officinarum</i> (Muntok Java)	206 (RFLP)	72 / 9	1443	Ming <i>et al.</i> , 1998
<i>S. robustum</i> (Mol5829)	301 (RFLP, APPCR, AFLP)	65 / -	-	Guimaraes <i>et al.</i> , 1997
Cultivar SP701006	94 (RFLP)	25 / 8	-	D'Hont <i>et al.</i> , 1994
Cultivar R570	408 (RFLP) + 322 (RFLP) + 138 (AFLP)	96 / 10 125 / 9	2008	Grivet <i>et al.</i> , 1996 données non publiées
Cultivar R570	892 (AFLP)	119 / -	5875	Hoarau <i>et al.</i> , en préparation

chromosome lorsque la carte n'est pas saturée, et les groupes de liaison correspondent aux classes d'homologie.

La cartographie génétique du cultivar R570 servira de base à une grande partie de nos travaux. Cette carte génétique a été construite à partir de 408 marqueurs RFLP (dont la plupart sont révélés par des sondes d'ADN de canne à sucre ou de maïs) qui ont été assemblés en 96 groupes de coségrégation et 10 groupes de liaison ; la longueur de la carte est de 2008 cM. Par la suite, 357 marqueurs RFLP et 138 marqueurs AFLP ont été ajoutés, portant le nombre de groupes de coségrégation à 125 et le nombre de groupes de liaison à 9. L'identification de l'espèce d'origine pour 146 marqueurs a permis de montrer une meilleure répartition des marqueurs issus de *S. spontaneum* sur la carte et l'existence de recombinaisons occasionnelles entre les génomes de ces deux espèces. Aucune différence majeure n'a été mise en évidence entre les structures des génomes des deux espèces. Une seconde carte génétique de ce même cultivar a également été construite avec des marqueurs AFLP (Hoarau *et al.*, en préparation). Elle comporte 892 marqueurs simplex répartis dans 119 groupes de coségrégation dont la longueur varie de 1 à 232 cM. La longueur totale de la carte est de 5875 cM avec, en moyenne, un marqueur tous les 6,6 cM.

L'ensemble des travaux de cartographie a permis de mieux comprendre la structure des génomes des différentes espèces étudiées, notamment au niveau du type de polyploïdie (autopolyploïde) et du mode d'appariement des chromosomes à la méiose.

C. LA ROUILLE DE LA CANNE A SUCRE

C.1. Caractéristiques générales des rouilles

Environ 5 000 espèces de champignons, réparties en 130 genres, sont regroupées sous le nom de rouille en référence à l'aspect et la couleur des symptômes qu'ils provoquent sur les plantes. Les rouilles peuvent attaquer un très grand nombre d'espèces végétales et ont une répartition géographique très vaste. Ces champignons appartiennent à la classe des Basidiomycètes et à l'ordre des Urédinales, lequel est uniquement composé d'espèces parasites endophytes et obligatoires. Dans la famille des Pucciniacées, le genre *Puccinia* rassemble 3 000 à 4 000 espèces parmi lesquelles certaines sont responsables de maladies redoutables chez les Poacées telles que la rouille noire des céréales (*P. graminis*), la rouille

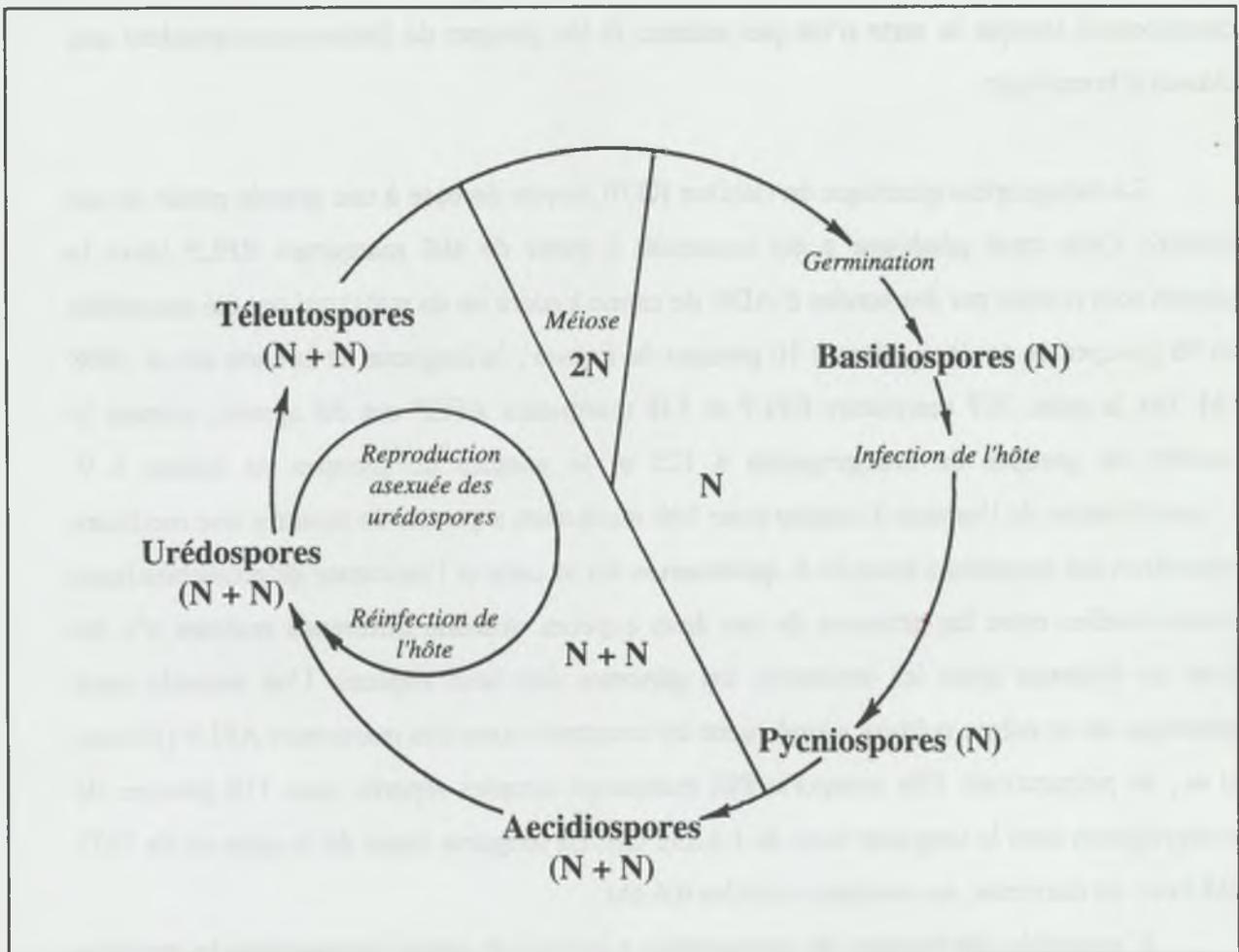


Figure 10 : Schéma générale du cycle de vie des rouilles (d'après Littlefield, 1981).

couronnée de l'avoine (*P. coronata*), la rouille jaune du blé (*P. striiformis*), la rouille commune du maïs (*P. sorghi*) ou la rouille de la canne à sucre (*P. melanocephala*). Le cycle de vie des rouilles est complexe, il peut comporter jusqu'à cinq types de spores différents (figure 10) (basidiospore, pycniospore, aecidiospore, urédospore et téliospore). Le cycle de développement complet des Urédiniales peut s'effectuer soit sur des plantes de la même espèce (parasites autoïques) soit sur des plantes de différentes espèces (parasites hétéroïques). Actuellement, le cycle de vie complet est encore mal connu pour de nombreuses espèces, mais on estime que beaucoup d'Urédinées doivent être hétéroïques.

C.2. *Puccinia melanocephala*

C.2.1. *Historique et Distribution*

Il existe deux types de rouille chez la canne à sucre : la rouille commune et la rouille orange dont les agents pathogènes sont *P. melanocephala* H. & P. Syd. et *P. kuehnii* Buttl., respectivement. *P. melanocephala* est responsable de plusieurs épidémies de rouille. La première épidémie s'est produite en Inde, dans les années 50, et a causé des pertes économiques très importantes. Puis en 1978, une épidémie sans précédent s'est propagée à partir de la république Dominicaine vers le continent américain. Cette maladie a d'abord gagné tous les Caraïbes puis l'Amérique du nord, l'Amérique centrale et le Mexique. On observe, au même moment le départ d'une autre épidémie en Australie. Dans les deux cas la maladie s'est propagée très rapidement causant des pertes économiques importantes. La répartition géographique de *P. melanocephala* s'étend aujourd'hui dans pratiquement tous les pays producteurs de canne à sucre. *P. kuehnii* reste inoffensif et sa distribution géographique est limitée à l'Asie et à l'Australie. Bien que les spores de ces deux pathogènes aient une morphologie qui permette de les différencier, ils ont souvent été confondus car les symptômes qu'ils provoquent sur les feuilles sont très semblables.

La suite de cette synthèse bibliographique portera uniquement sur *P. melanocephala*.

C.2.2. *Impact sur le rendement*

Les plus grandes pertes de rendement provoquées par la rouille chez la canne à sucre ont été observées lors des premières épidémies alors que le cultivar sensible B4362 était



Figure 11 : Feuille de canne à sucre infectée par la rouille (*Puccinia melanocephala*).



Figure 12 : Urédospore de *Puccinia melanocephala* (x 650).



Figure 13 : Urédospore germée de *Puccinia melanocephala* (x 200).

utilisé dans de nombreux pays (Comstock *et al.*, 1992b). Par exemple, au Mexique, Purdy *et al.* (1983) ont enregistré des pertes de 1,5 à 21,7 tonnes par hectare entre 1978 et 1979 pour le cultivar B4362. L'industrie sucrière cubaine a également subi de très lourdes pertes estimées à un million de tonnes de sucre en 1979/1980 alors que le cultivar B4362 occupait 28% de la sole cannière. Des études réalisées en conditions contrôlées, basées sur une comparaison entre des plantes infectées et des témoins sains, ont montré que la maladie provoque une diminution du taux de croissance des plantes (Comstock *et al.*, 1992a et 1992b). Par exemple, dans cette étude, le cultivar B4362 a accusé une perte de 40% du poids de matière sèche par rapport au témoin sain. En revanche, la croissance du cultivar résistant CP70-1133 n'a pas été affectée. Il est difficile de mener le même type d'expérience au champ dans la mesure où les parcelles témoins nécessitent un traitement antifongique qui ne garantit pas une éradication totale du pathogène.

L'impact économique de *P. melanocephala* dans les années 78-80 est essentiellement dû à sa propagation rapide et simultanée dans plusieurs pays où des cultivars très sensibles étaient utilisés. Depuis, les cultivars résistants occupent la majorité de la sole cannière mondiale et, selon Purdy *et al.* (1983) il est fort probable que les pertes occasionnées par cette maladie restent négligeables tant que de nouvelles races plus virulentes n'apparaissent pas.

C.2.3. Symptômes et transmission de la maladie

Le développement de la maladie commence par l'apparition de tâches jaunâtres visibles sur les deux faces de la feuille. Ces tâches s'allongent, deviennent marron à marron-rouge (figure 11) et un halo chlorotique se forme autour de la lésion. Puis, des pustules (urédosores) se développent sous l'épiderme. Elles sont essentiellement localisées sur la face inférieure de la feuille et mesurent 2 à 20 mm de long pour 1 à 3 mm de large. Sur les feuilles les plus sévèrement atteintes, les pustules coalescent et forment de grandes surfaces nécrotiques qui peuvent entraîner la mort des jeunes feuilles. A maturité, les pustules produisent de grandes quantités d'urédospores de couleur marron-orangé (figure 12). Les urédospores se déposent sur d'autres feuilles où elles germent (figure 13) puis pénètrent et colonisent les tissus de la feuille et des urédosores se formeront 12 à 14 jours plus tard. Le spectre d'infection de *P. melanocephala* est principalement constitué des différentes espèces du genre *Saccharum*, cependant, des lésions sporulantes ont également été observées chez *Erianthus fulvus* ou *Narenga porphyrocoma*.

Les urédospores sont essentiellement transmises par le vent, et dans une moindre mesure par l'eau. Elles peuvent être transportées sur de très longues distances couvrant plusieurs centaines de kilomètres. Le mode de transmission de cette maladie expliquerait son aptitude à se propager rapidement.

C.2.4. Facteurs qui influencent le développement de la maladie

Les variations de l'expression de la rouille résultent de l'interaction de facteurs environnementaux, physiologiques et génétiques.

L'humidité des feuilles et la température sont vraisemblablement les deux facteurs environnementaux qui influencent le plus le développement de la maladie. Une certaine humidité à la surface des feuilles est nécessaire à la germination des urédospores et à la pénétration du tube germinatif dans les tissus foliaires. Les urédospores de *P. melanocephala* peuvent germer à des températures comprises entre 5 et 34°C avec un optimum à 20°C (Sandoval *et al.*, 1983 ; Sotomayor, 1983). Elles perdent rapidement leur viabilité au-delà de 35°C et peuvent être conservées plus de deux ans à -20°C (Ryan et Egan, 1989). Le pH du sol ainsi que la nutrition de la plante ont également un effet significatif sur l'évolution de la maladie. Ainsi, un pH du sol faible favorise le développement de la rouille. Anderson *et al.* (1990) et Peros (1990a et 1990b) ont montré l'existence de relations complexes entre la nutrition de la plante et la sévérité de la maladie. Par exemple, des teneurs élevées en azote favorisent le développement de la maladie.

L'âge de la plante est également un facteur important car les jeunes plantes, de 3 à 6 mois, apparaissent plus sensibles. On observe généralement une diminution de la sévérité de la maladie après 6 mois (Sandoval *et al.*, 1983 ; Comstock et Ferreira, 1986 ; Peros et Lombard, 1986).

Le génotype de l'hôte détermine les différents niveaux de résistance à la rouille, *i.e.* le degré de développement maximal de la maladie lorsque les conditions les plus favorables sont réunies.

C.2.5. Races

Des variations de niveau de résistance observées dans les plantations pour un même cultivar ont amené les scientifiques à suggérer l'existence de différentes races de *P. melanocephala*. Par exemple en Floride, Dean et Purdy (1984) décrivent trois cultivars,

CL54-378, CP79-1580 et CP79-1243, dont la réaction vis-à-vis de la rouille est subitement passée de résistante à sensible dans certaines parcelles. Après avoir écarté les possibilités de variation des conditions environnementales entre les parcelles, ce phénomène a été interprété comme étant révélateur de la diversité du pouvoir pathogène du champignon. Raid (1989) observe également un changement de réaction du cultivar CP78-1247 à l'égard de la rouille. De la même façon, en Inde, il a été noté que différents cultivars avaient des niveaux de résistance différents selon la région où ils étaient cultivés (Anon, 1960 cité par Srinivasan et Muthaiyan, 1965). Plus récemment, Tai *et al.* (1998) décrivent des modifications du niveau de résistance de plusieurs clones en cours de sélection. Liu (1980) a répertorié les réactions de 1942 cultivars vis-à-vis de la rouille et constate que certains cultivars n'ont pas toujours la même réaction dans différents pays. L'identification de races par comparaison de résultats issus de plusieurs publications ou de différentes expériences doit être utilisée avec prudence (Walker, 1987). Car, d'une part, les méthodes d'évaluation de la maladie et les conditions environnementales peuvent être différentes (dans tous les exemples cités, les changements de réaction des cultivars évoluent toujours de la résistance vers la sensibilité), et d'autre part, les erreurs d'identification des cultivars sont fréquentes. Purdy et Dean (1983) citent un exemple révélateur de l'importance des conditions environnementales. Le même cultivar (CP63-588) placé dans deux champs distants d'environ 1 km montre des niveaux d'infection tout à fait différents qui seraient dus à la présence d'un point d'eau à proximité de l'un des champs, provoquant un taux d'humidité à la surface des feuilles très favorable au développement du champignon.

La détection de races de *P. melanocephala* nécessite l'évaluation du degré de résistance des cultivars en conditions contrôlées. Plusieurs expériences, décrivent les variations de réaction de certains cultivars résistants inoculés avec différents isolats :

- cinq isolats collectés en Inde ont provoqué des réactions différentes sur 18 cultivars (Srinivasan et Muthaiyan, 1965).
- deux isolats collectés à Hawaii ont provoqué des réactions différentes sur le cultivar H65-7052. Les tests en conditions contrôlées ont été utilisés pour confirmer les observations faites dans les plantations (Comstock, 1985).
- cinq isolats collectés en Floride ont provoqué une réaction différente sur six cultivars (Comstock *et al.*, 1994).

Ces différences de niveaux de résistance ont été considérées comme étant le résultat de la présence de différentes races parmi les isolats testés. En revanche, Taylor (1992) montre que

parmi 15 isolats, collectés dans le Queensland (Australie), aucun n'a provoqué de réaction différentielle chez les 12 cultivars testés.

La diversité du pouvoir pathogène de *P. melanocephala* n'est pas bien définie. Les expériences d'évaluation en conditions contrôlées sont peu nombreuses et les isolats testés simultanément sont tous originaires du même pays ou de la même région. Il serait nécessaire de tester des isolats originaires de différents pays (ou continents) sur des cultivars standards afin de mieux évaluer la diversité du pouvoir pathogène de ce champignon.

C.2.6. Méthode de lutte contre la rouille

Le seul moyen de lutte efficace contre la rouille commune de la canne à sucre est l'utilisation de cultivars résistants ; l'utilisation de fongicides est une méthode efficace mais trop onéreuse à grande échelle. Le développement rapide de cultivars résistants, qui a permis d'enrayer la première épidémie de rouille, est essentiellement dû à la forte héritabilité de ce caractère (Taylor *et al.*, 1982 ; Comstock *et al.*, 1992a ; Daugrois *et al.*, 1996) et à une évaluation relativement facile de la résistance (Comstock et Raid, 1994). Les mesures du niveau de résistance des clones sont généralement effectuées en condition naturelle d'infection. Des cultivars standards, dont on connaît la réaction vis-à-vis de la rouille, sont utilisés pour calibrer les taux d'infection en fonction des conditions environnementales. Il est important de tenir compte de l'âge des clones qui peut influencer le niveau de résistance à la rouille. De nombreux systèmes d'évaluation du niveau de résistance sont utilisés ; Walker (1987) en dénombre six. Ils sont tous basés sur une évaluation visuelle des symptômes. Les premiers niveaux caractérisent généralement les individus résistants sur la base de l'absence de sporulation du champignon puis les autres niveaux permettent de décrire les individus sensibles selon l'intensité de la sporulation.

D. LES GENES DE RESISTANCE AUX AGENTS PATHOGENES CHEZ LES VEGETAUX

Les plantes ont à leur disposition une combinaison de moyens de défense induits ou constitutifs, impliquant des composantes chimiques et structurales, qui leur permet de lutter contre les agents pathogènes. Différents types de résistance ont été décrits selon les critères utilisés dans l'étude des interactions hôte-pathogène (critère génétique, phénotypique, physiologique ...). Le développement de la cartographie génétique a permis de cartographier

de nombreux gènes de résistance chez diverses espèces et d'étudier leur organisation dans le génome des végétaux. Le premier gène de résistance cloné est le gène *Hm1* qui contrôle la résistance à *Cochliobolus carbonum* chez le maïs (Johal et Briggs, 1992), depuis, une quinzaine de gènes ont été isolés permettant ainsi leur caractérisation moléculaire.

D.1. Les interactions hôte-pathogène

On distingue deux niveaux de spécificité des interactions hôte-pathogène :

- le niveau du spectre d'hôte du pathogène. On définit le spectre d'hôte d'un pathogène par l'ensemble des espèces hôtes qu'il est capable d'infecter et on dira qu'une espèce végétale qui n'est pas attaquée par ce parasite présente une résistance "non-hôte".
- au sein d'une espèce hôte. Van Der Plank (1968) définit deux types de résistances génétiques, les résistances verticale et horizontale, correspondant à deux aspects de la pathogénie des parasites, la virulence et l'agressivité.

D.1.1. Résistance verticale et virulence

Lorsqu'un génotype est résistant à certaines races du pathogène et sensible à d'autres, la résistance est dite verticale ou race-spécifique et l'interaction sera différentielle. Le pathogène est alors caractérisé par sa virulence, qui est la capacité du parasite à se développer sur certaines variétés mais pas sur d'autres (notion qualitative). Dans ce type d'interaction spécifique la résistance et le pouvoir pathogène sont souvent contrôlés par des facteurs génétiques monogéniques.

On distingue deux types de résistance spécifiques (Pryor et Ellis, 1993) :

1/ la résistance vis-à-vis des facteurs de virulence du pathogène. Différents mécanismes de résistance peuvent intervenir tels que la détoxification de toxines produites par l'agent pathogène, la mutation d'un site membranaire nécessaire à la pénétration du pathogène ou l'inhibition d'enzymes impliquées dans le cycle infectieux.

2/ la résistance de type gène-à-gène, dont le modèle a été développé par Flor (1955) lors de l'étude de l'interaction entre le lin (*Linum usitatissimum*) et la rouille du lin (*Melampsora lini*). Les hypothèses inhérentes à ce modèle sont les suivantes : si la plante porte un gène de résistance R et l'agent pathogène un gène d'avirulence Avr correspondant, alors il y a résistance ou incompatibilité. Lorsque que l'un des deux gènes ou les deux sont absents, l'interaction est compatible et la maladie se développe. Dans la majorité des interactions de

type gène-à-gène, la résistance et l'avirulence sont de type monogénique dominant. Le tableau ci dessous résume les différentes situations possibles lorsque l'espèce hôte et l'agent pathogène sont diploïdes (I : interaction incompatible et C : interaction compatible).

Génotype au locus du gène d'avirulence de l'agent pathogène	Génotype au locus du gène de résistance de la plante hôte		
	RR	Rr	rr
Avr Avr	I	I	C
Avr avr	I	I	C
avr avr	C	C	C

Les mécanismes de résistance le plus souvent impliqués dans les interactions correspondant à ce modèle sont des réactions d'hypersensibilité, qui se matérialisent par une mort cellulaire localisée au point d'infection. Une étude conjointe du déterminisme génétique de la résistance et de l'avirulence est nécessaire pour démontrer qu'une interaction hôte-pathogène est conforme au modèle de Flor. Souvent, l'existence d'interactions gène-à-gène est seulement suspectée sur la base des résultats d'infection d'une gamme différentielle d'hôtes par des souches clonales de l'agent pathogène.

D.1.2. Résistance horizontale et agressivité

La résistance est dite horizontale lorsqu'elle s'applique aux différentes races d'un agent pathogène. Ce type de résistance n'est donc pas race-spécifique et le classement des variétés reste constant quelle que soit la souche pathogénique utilisée. L'agent pathogène est alors caractérisé par son *à*gressivité, qui représente le degré de maladie (notion quantitative) que chaque souche du pathogène pourra engendrer chez l'hôte dont la résistance est très souvent partielle ou incomplète (*i.e.* le développement de la maladie n'est pas maximal). Ce type de résistance est généralement oligogénique ou polygénique du fait des nombreuses étapes où elle peut s'exercer (par exemple : le taux d'infection, la période de latence, le taux de sporulation). Elle s'exprime alors par une variation continue du phénotype et résulte de l'action de plusieurs locus ayant chacun un effet faible sur le phénotype ; ces locus sont des QTL (*Quantitative Trait Locus*).

Tableau I.4. Exemples de locus multialléliques ou de groupes de gènes fortement liés pour des résistances de type gène-à-gène (d'après Adam-Blondon, 1994).

Interaction plante/pathogène	Groupe*	Nombre de spécificités	Référence
Laitue/ <i>Bremia lactucae</i>	I	7	Farrara <i>et al.</i> , 1987
	II	2	Crute, 1992
	III	3	
	IV	1	
Lin/ <i>Melampsora lini</i>	K	2	Pryor et Ellis, 1993
	L	14	Islam et Mayo, 1990
	M	7	
	N	3	
	P	6	
Orge/ <i>Erysiphe graminis</i>	<i>Ml-at</i> (5)	1	Giese, 1981
	<i>Ml-a</i> (5)	23	Giese <i>et al.</i> , 1981
	<i>Ml-k</i> (5)	2	Giese <i>et al.</i> , 1993
	<i>Ml-nn</i> (5)	1	Jorgensen, 1992
	<i>Ml-p</i> (5)	1	
	<i>Ml-g</i> (4)	1	
	<i>Ml-La</i> (2)	1	
Maïs/ <i>Puccinia sorghi</i>	<i>Rp1</i> (10)	14	Saxena et Hooker, 1968
	<i>Rp3</i> (3)	6	Hooker, 1985
	<i>Rp4</i> (4)	2	
	<i>Rp5</i> (10)	?	
	<i>Rp6</i> (10)	?	

* Entre parenthèse est indiqué, lorsqu'il est connu, le chromosome sur lequel est situé le groupe de gène/allèles

C.1.3. Durabilité de la résistance

Une interaction hôte-pathogène est un système dynamique d'un point de vue évolutif. Les deux protagonistes d'une interaction évoluent conjointement. La résistance d'une plante peut être contournée plus ou moins rapidement par l'apparition de nouvelles races de pathogène. *A priori*, la résistance horizontale serait durable par définition puisqu'elle permet de lutter contre les différentes races d'un pathogène. En revanche, les résistances monogéniques spécifiques répondant au modèle de Flor seraient contournées beaucoup plus rapidement. Le modèle de Flor s'est révélé généralisable à un grand nombre d'interactions hôte-pathogène impliquant des champignons, des bactéries, des virus ou des nématodes (Crute, 1985). Toutefois, les deux grandes catégories de résistance et les caractéristiques qui leurs sont associées ne s'appliquent pas à tous les pathosystèmes et il existe de nombreux systèmes intermédiaires. Par exemple, chez l'orge, le gène *mlo* confère une résistance durable à toutes les races connues d'*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* (mildiou) (Jorgensen, 1992).

La stabilité d'une résistance ne peut s'exprimer que dans le temps et elle est plus souvent la conséquence d'une gestion raisonnée plutôt que d'une propriété intrinsèque des gènes de résistance. Différents moyens, tels que l'accumulation de plusieurs résistances dans une même variété ou l'utilisation de variétés multilignées, sont fréquemment mis en œuvre dans le but d'augmenter les chances de durabilité de la résistance.

D.2. Organisation des gènes de résistance dans le génome des végétaux

D.2.1. Répartition des gènes de résistance dans le génome

La répartition des facteurs génétiques impliqués dans la résistance à un même pathogène ou à des pathogènes différents montre que les locus ne semblent pas répartis aléatoirement dans le génome. Ils sont très souvent regroupés dans un nombre limité de régions du génome. Différents types de regroupements entre gènes de résistance ont été observés.

Les gènes de résistance intervenant dans des interactions répondant au modèle de Flor sont souvent groupés en séries alléliques ou séries de gènes proches (*clusters*) (tableau I.4.).

Tableau I.5. Exemples de regroupement de gènes ou QTL de résistance à différents pathogènes dans une même région du génome chez différentes espèces.

Plante	Gène de résistance (pathogène)	Référence
Laitue	<i>Dm5/8, Dm10 (Bremia lactucae)</i>	Kesseli <i>et al.</i> , 1993
	<i>plr (Plasmopara lactucae)</i>	Kesseli <i>et al.</i> , 1994
	<i>Tu (Turnip mosaic virus)</i>	Robbins <i>et al.</i> , 1994
		Witsenboer <i>et al.</i> , 1995
Laitue	<i>Dm1, Dm2, Dm3, Dm6, Dm14, Dm15, Dm16, Dm18 (Bremia lactucae)</i>	Kesseli <i>et al.</i> , 1993
	<i>Ra (root aphid)</i>	Maisonneuve <i>et al.</i> , 1994
Tomate	<i>Cf-2, Cf-5 (Cladosporium fulvum)</i>	Jones <i>et al.</i> , 1993
	<i>Mi (Meloidogyne incognita)</i>	Dickinson <i>et al.</i> , 1993
	<i>Ol-1 (Oidium lycopersicum)</i>	Van Der Beek <i>et al.</i> , 1994
	<i>Meu1 (Macrosiphum euphorbiae)</i>	Kaloshian <i>et al.</i> , 1992
	<i>Ty-1 (TYLCV)</i>	Zamir <i>et al.</i> , 1994
	QTL (<i>Pseudomonas solanacearum</i>)	Danesh <i>et al.</i> , 1994 Thoquet <i>et al.</i> , 1996
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>RPP2, RPP4, RPP5-1, RPP5-2, RPP12 (Peronospora parasitica)</i>	Kunkel, 1996
	<i>TOM1 (TMV)</i>	
	<i>RPS2 (Pseudomonas syringae pv. syringae)</i>	
Maïs	<i>Rp4 (Puccinia sorghi)</i>	Mc Mullen et Simcox, 1995
	QTL (Pyrale)	
	QTL (<i>Helminthosporium turcicum</i>) <i>bx1 (Helminthosporium turcicum)</i>	
Piment	<i>L (TMV)</i>	Caranta, 1995
	QTL (potyvirus E)	Lefebvre et Palloix, 1996
	QTL (<i>Phytophthora capsici</i>)	Moury, 1997
	QTL (TSWV)	

Par exemple, chez le maïs on dénombre cinq locus impliqués dans la résistance à la rouille (*P. sorghi*) cartographiés sur trois chromosomes. L'un de ces locus, *Rp1*, compte 14 spécificités qui ont été considérées comme des allèles désignés *Rpa* à *Rpn*. Cependant, l'analyse de 19 000 descendants a permis de démontrer, dans certains cas, l'existence de gènes très proches organisés en *clusters* (Hooker et Saxena, 1971 cités par Hooker, 1985). Afin d'expliquer cette organisation, l'hypothèse la plus fréquemment émise est que des duplications et *crossing over* inégaux aient généré des familles multigéniques dont les gènes auraient divergé au cours de l'évolution pour acquérir de nouvelles spécificités vis-à-vis du pathogène (Pryor, 1987 ; Michelmore *et al.*, 1994).

On observe également le regroupement de gènes de résistance à différentes maladies (tableau I.5.). Dans ce cas, l'hypothèse de duplication de gènes et *crossing over* inégaux à l'origine des *clusters* doit être confirmée par l'établissement de points communs entre ces gènes pour justifier d'une origine commune.

Si l'on s'intéresse à la localisation des QTL, on trouve des regroupements de QTL de résistance à différentes maladies, et des co-localisations de gènes majeurs et de QTL contrôlant une résistance à des pathogènes différents ou à un même pathogène (tableau I.5.). Selon Robertson (1989), ces QTL pourraient correspondre à une forme allélique atténuée des gènes de résistance spécifiques auxquels ils sont associés. Et selon, Nelson (1978) ces QTL pourraient être des effets résiduels de gènes de résistance spécifiques en situation compatible.

Nous retiendrons qu'il existe des résistances à large spectre et des résistances spécifiques et que plusieurs gènes de résistance peuvent être regroupés en *clusters* dans une région génomique. Dans notre étude du facteur majeur de résistance à la rouille de la canne à sucre, nous parlerons d'un "gène majeur" par simplification, puisque l'échelle génétique (cM) à laquelle nous travaillons ne permet pas la résolution requise pour différencier un gène par rapport à plusieurs gènes associés en *cluster*.

D.2.2. Comparaison entre génomes de différentes espèces

La comparaison de cartes génétiques de différentes espèces a permis de mettre en évidence de larges régions génomiques conservées entre espèces apparentées, et quelques gènes majeurs et QTL orthologues putatifs d'intérêt agronomique ont d'ores et déjà été identifiés chez différentes Poacées (Paterson *et al.*, 1995 ; Lin *et al.*, 1995 ; Pereira et Lee, 1995). (figure 14)

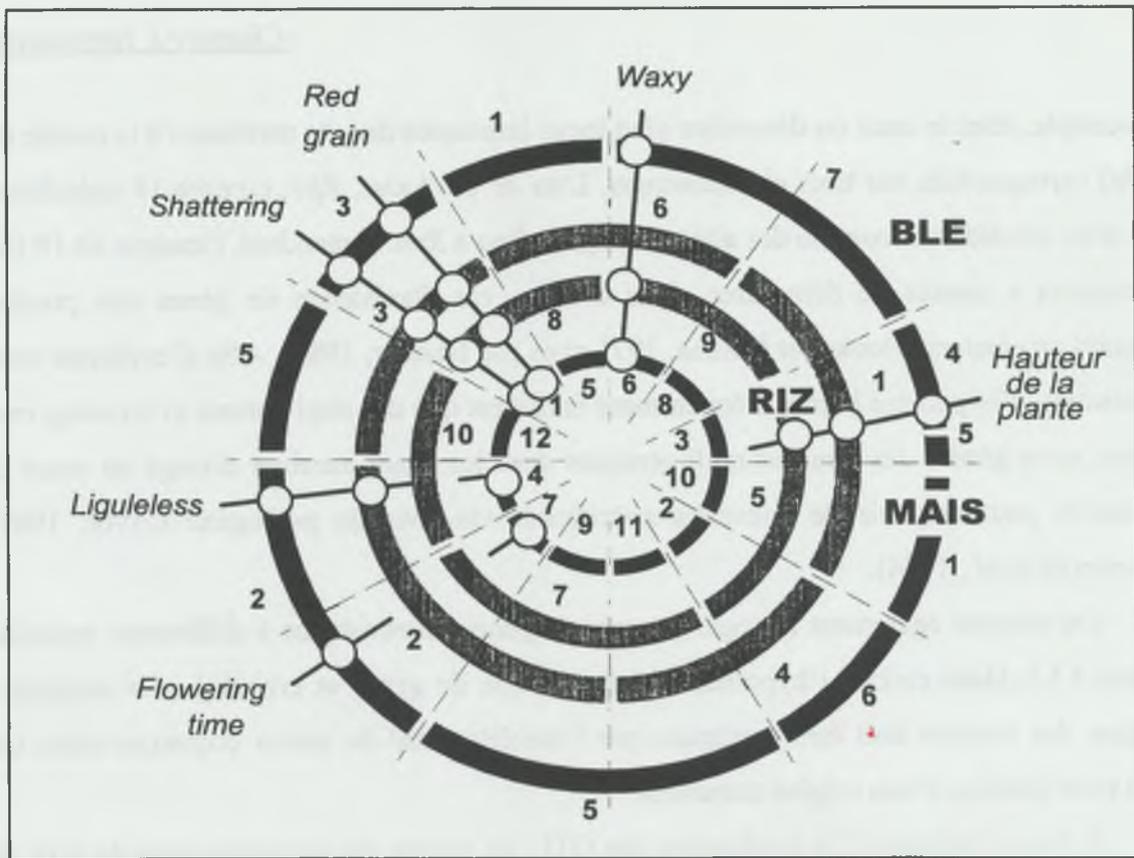


Figure 14 : Exemples de gènes orthologues putatifs chez le riz, le maïs et le blé (d'après Devos et Gale, 1997).

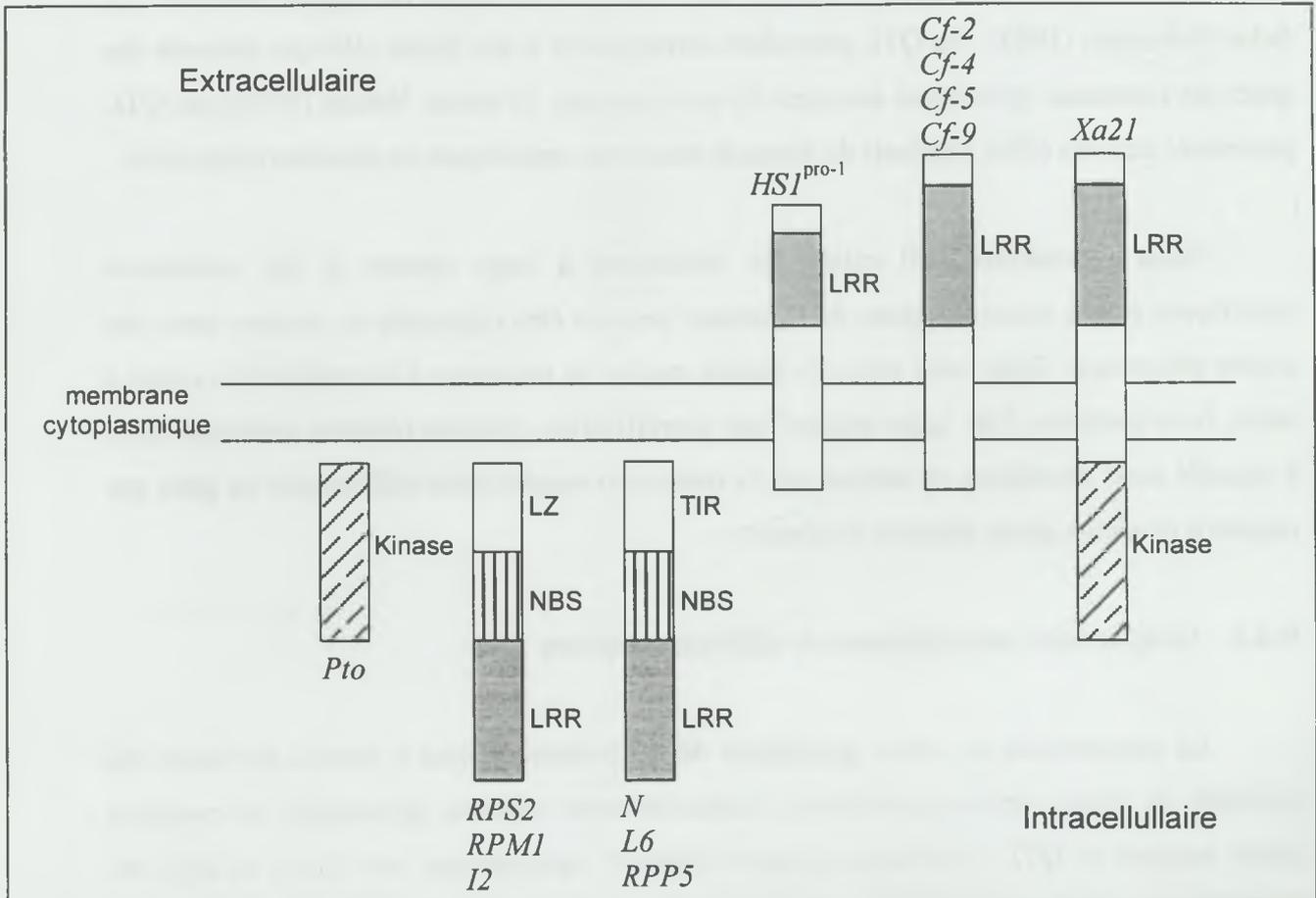


Figure 15 : Représentation schématique des domaines communs des protéines codées par des gènes de résistance intervenant dans des interactions de type gène-à-gène (d'après de Witt, 1997). LRR : Leucine-rich repeat, NBS : nucleotide binding site, LZ : leucine zipper, TIR : Toll Interleukin receptor.

Différents exemples et contre exemples de synténie entre espèces apparentées au niveau des gènes de résistance ont été décrits. La tomate et le piment présentent le même déterminisme génétique (monogénique et dominant) ainsi que le même mécanisme de résistance (hypersensibilité localisée) pour la résistance au TMV (*Tobacco Mosaic Tobamovirus*), mais les facteurs génétiques de résistance ne sont pas situés sur des segments chromosomiques homéologues (Caranta, 1995). Leister *et al.* (1998) ont mené une étude consacrée à la cartographie comparée d'homologues de gènes de résistance chez le riz, l'orge et le foxtail millet et montrent que les locus correspondant à ces gènes ne sont pas synténiques entre les trois espèces. Par ailleurs, Van Deynze *et al.* (1995a et 1995b) ont rapporté plusieurs exemples possibles de gènes orthologues de résistance à la rouille entre le blé (*Lr22* et *Lr24*) et le maïs (*Rp1* et *Rp3*) ou entre le blé (*Sr33* et *Lr21*) et l'avoine (*Pg9* and *PcX*). Selon Caranta (1995), il ressort également que certaines régions génomiques impliquées dans la résistance aux maladies sont communes à plusieurs espèces. Chez les Solanacées, la même sonde révèle des marqueurs liés au gène de résistance *Gro1* de la pomme de terre et au gène *I2* de la tomate. Les locus *L* de résistance au TMV chez le piment et *II* de résistance à *Fusarium oxysporium* chez la tomate sont cartographiés dans des régions génomiques homéologues.

D.3. Caractérisation moléculaire des gènes de résistance

D.3.1. Clonage des gènes de résistance

Plusieurs stratégies de clonage sont utilisées et peuvent être classées en deux catégories selon que l'on connaît ou non le produit du gène. Lorsque le produit du gène est connu, c'est notamment le cas des résistances vis-à-vis des facteurs de virulence, il est alors possible de remonter jusqu'à la séquence d'ADN à partir du produit. Lorsque le produit du gène est inconnu, comme c'est souvent le cas dans les interactions de type gène-à-gène, les deux techniques de clonage les plus employées sont la création de mutants d'insertion avec étiquetage de gène (avec un élément transposable ou avec le T-DNA d'*Agrobacterium tumefaciens*) et le clonage positionnel par marche chromosomique. La première méthode nécessite une bonne maîtrise des techniques de transformation et de régénération de l'espèce végétale étudiée. La seconde, nécessite l'identification de marqueurs proches et encadrant le gène ciblé ainsi que le développement de certains outils moléculaires tels qu'une banque de

Tableau I.6. Classification des gènes de résistance en cinq catégories selon les caractéristiques de la structure des protéines codées (De Wit, 1997).

Gène de résistance	Espèce	Agent pathogène	Structure protéique	Référence
Classe I <i>Pto</i>	tomate	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Kinase	Tang <i>et al.</i> , 1996 Martin <i>et al.</i> , 1993
Classe II <i>RPS2</i> <i>RPM1</i> <i>I2</i>	<i>A. thaliana</i> <i>A. thaliana</i> tomate	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersicy</i>	LRR-NBS-LZ	Bent <i>et al.</i> , 1994 Grant <i>et al.</i> , 1995 Ori <i>et al.</i> , 1997
Classe III <i>N</i> <i>L6</i> <i>RPP5</i>	tabac lin <i>A. thaliana</i>	<i>tobacco mosaic virus</i> <i>Melampsora lini</i> <i>Peronospora parasitica</i>	LRR-NBS-TIR	Whithman <i>et al.</i> , 1994 et 1996 Lawrence <i>et al.</i> , 1995 Parker <i>et al.</i> , 1997
Classe IV <i>Cf-2</i> <i>Cf-4</i> <i>Cf-5</i> <i>Cf-9</i> <i>HSP^{pro-1}</i>	tomate tomate tomate tomate betterave	<i>Cladosporium fulvum</i> <i>Cladosporium fulvum</i> <i>Cladosporium fulvum</i> <i>Cladosporium fulvum</i> <i>Heterodera schachtii</i>	LRR	Dixon <i>et al.</i> , 1996 Hammond-Kosack et Jones, 1997 Hammond-Kosack et Jones, 1997 Jones <i>et al.</i> , 1994 Cai <i>et al.</i> , 1997
Classe V <i>Xa21</i>	riz	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	LRR-Kinase	Song <i>et al.</i> , 1995

LRR : Leucine-Rich Repeat, NBS : Nucleotide Binding Site, TIR : Toll-Interleukin-1 receptor, LZ : Leucine Zipper

grands fragments d'ADN. Quelle que soit la technique de clonage utilisée, il est nécessaire de valider l'identité du fragment d'ADN cloné par restauration de la résistance dans un génotype sensible.

Le premier gène de résistance cloné chez les végétaux a été isolé chez le maïs par étiquetage avec un élément transposable (*transposon tagging*) (Johal et Briggs, 1992). Ce gène, *Hm1*, contrôle la résistance au pathogène *Cochliobolus carbonum* et n'est pas conforme au modèle de Flor. Le premier gène de résistance cloné conforme au modèle gène-à-gène est *Pto*. Ce gène intervient dans l'interaction hôte-pathogène avec *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, et il a été isolé par clonage positionnel chez la tomate (Martin *et al.*, 1993). Par la suite, plusieurs gènes de résistance à des pathogènes aussi divers que les bactéries, les champignons, les virus ou les nématodes ont été clonés chez différentes espèces (tableau I.6.).

D.3.2. Structure et fonction des protéines codées par les gènes de résistance intervenant dans des interactions gène-à-gène

La comparaison des produits des gènes de résistance clonés montre de grandes similitudes au niveau de la structure des protéines. Ces points communs ont été utilisés pour classer les gènes de résistance en cinq catégories (tableau I.6. et figure 15) (De Wit, 1997 ; Hammond-Kosack et Jones, 1997 ; Baker *et al.*, 1997). Le numéro attribué à chaque classe est arbitraire et peut varier en fonction des auteurs.

Classe I (Kinase) : Cette classe ne contient que le gène *Pto* qui code pour une protéine de type sérine-thréonine kinase cytoplasmique.

Classe II (LRR-NBS-LZ) : Cette classe regroupe tous les gènes de résistance codant pour des protéines qui comportent un site constitué de répétitions d'un motif de base contenant des leucines (LRR, *Leucine-Rich Repeat*), un site de fixation nucléotidique (NBS, *Nucleotide Biding Site*) et un motif leucine zipper (LZ, *Leucine Zipper*).

Classe III (LRR-NBS-TIR) : Les gènes de cette classe codent pour des protéines dont la structure ressemble à celle des protéines décrites dans la classe II. Elles comportent un site LRR, un site NBS et un site TIR (*Toll Interleukin Receptor*) homologue au domaine cytoplasmique de la protéine du gène de développement *Toll* de la Drosophile, et au récepteur interleukine-1 codé par un gène que l'on trouve chez les mammifères.

Classe IV (LRR) : Les gènes appartenant à cette classe codent pour des protéines constituées d'un site LRR extracellulaire.

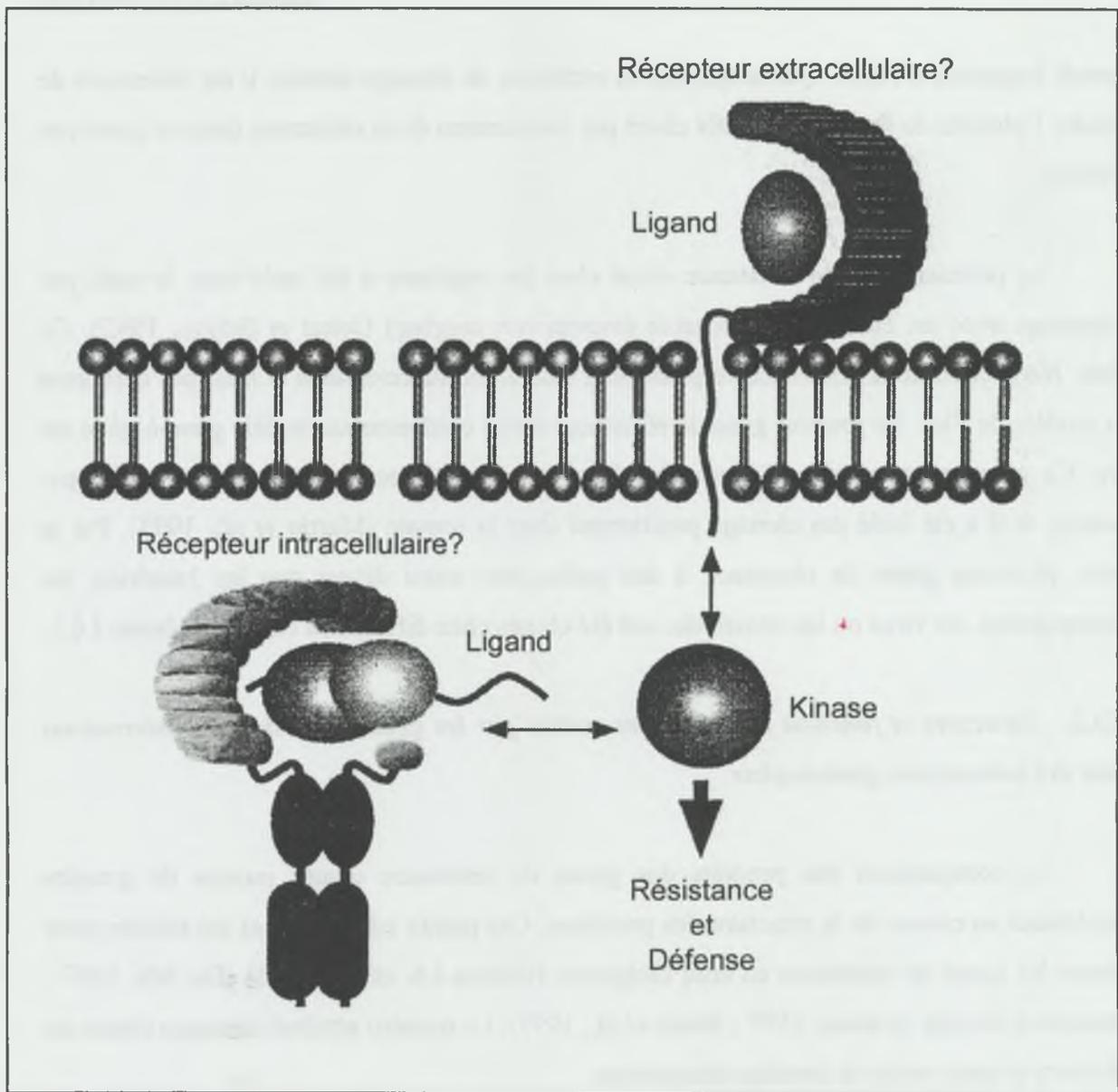


Figure 16 : Modèle récepteur-ligand pour la reconnaissance et l'expression de la résistance aux maladies chez les plantes (d'après Staskawicz, 1995).

Classe V (LRR-Kinase) : Les protéines codées par les gènes de résistance appartenant à cette classe comportent un domaine LRR extracellulaire et un site Kinase intracellulaire.

Ce phénomène de conservation de certains domaines protéiques a été utilisé pour développer une technique permettant d'identifier des homologues de gènes de résistance (dont la séquence présente des points communs avec la séquence de gènes de résistance) (Staskawicz *et al.*, 1995). Ces homologues de gènes de résistance sont considérés comme des gènes de résistance candidats lorsqu'une liaison avec un locus connu contrôlant une résistance peut être établie par cartographie génétique. Cette technique, qui nécessite la définition d'amorces dégénérées correspondant aux sites conservés, a été très largement utilisée chez de nombreuses espèces telles que la pomme de terre, le soja, *Arabidopsis thaliana*, le riz, l'orge ou le maïs (Kanazin *et al.*, 1996 ; Leister *et al.*, 1996 et 1998 ; Yu *et al.*, 1996 ; Aarts *et al.*, 1998 ; Collins *et al.*, 1998).

Au niveau biochimique, un modèle éliciteur-récepteur a été proposé pour expliquer les mécanismes de résistance de type gène-à-gène dans le cas d'une réaction d'hypersensibilité. Dans ce modèle, le gène de résistance R produit un récepteur extracellulaire (tel que la protéine produite par le gène *Cf-9* chez la tomate) ou intracellulaire (tel que la protéine produite par le gène *N* chez le tabac) qui reconnaît spécifiquement le produit du gène d'avirulence (figure 16). Les domaines protéiques LRR pourraient être impliqués dans la reconnaissance spécifique entre éliciteurs et récepteurs. Cette interaction activerait une cascade de signalisation impliquant des kinases, les domaines NBS, LZ et TIR et conduirait à l'expression de la résistance (Hammond-Kosack, 1997).

La suite de ce document est découpée en quatre chapitres. Trois chapitres sont consacrés aux résultats et traitent successivement de l'étendue d'action du gène majeur de résistance à la rouille identifié chez R570, de l'identification de marqueurs très proches puis de la recherche d'associations entre ces marqueurs et la résistance dans d'autres fonds génétiques. Ces chapitres sont présentés sous forme d'articles soumis ou sous la forme type d'un article, c'est-à-dire, avec une partie introductive, matériels et méthodes, résultats et discussion. Le dernier chapitre, propose une discussion générale de l'ensemble des résultats obtenus ainsi que quelques perspectives.

II. ETENDUE D'ACTION DU GENE DE RESISTANCE A LA ROUILLE IDENTIFIE CHEZ R570

II. ETENDUE D'ACTION DU GENE DE RESISTANCE A LA ROUILLE IDENTIFIE CHEZ R570

La rouille de la canne à sucre, causée par le champignon *Puccinia melanocephala*, est une maladie qui a provoqué des pertes économiques très importantes lors des premières épidémies. Actuellement, le seul moyen de lutte employé contre cette maladie consiste à utiliser des cultivars résistants. Un gène majeur de résistance à la rouille a été identifié et cartographié chez le cultivar R570. Nous avons entrepris le marquage fin de ce gène en vue de son clonage ainsi que l'étude de différents éléments de caractérisation nécessaires au raisonnement d'une stratégie de lutte contre la maladie. Un de ces éléments est l'éventuelle spécificité d'action. La répartition géographique de *P. melanocephala* est vaste et, bien que quelques études rapportent l'existence de plusieurs races en Inde, à Hawaii et en Floride, la diversité globale de ce champignon a été peu étudiée. Nous avons confronté R570 à différents isolats d'origines variées afin de déterminer s'il l'un de ces isolats est capable de surmonter la résistance et s'il existe différents facteurs génétiques impliqués dans la résistance aux différents isolats.

Cette étude est présentée sous la forme d'un article intitulé "*Resistance of sugarcane cultivar R570 to rust isolates from different locations*" soumis à publication au journal *Plant Disease*.

RESISTANCE OF SUGARCANE CULTIVAR R570 TO RUST ISOLATES FROM DIFFERENT LOCATIONS

Asnaghi C., D'Hont A., Glaszmann J.C. and Rott P.

Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement,
Cirad, BP 5035, 34032 Montpellier cedex 1, France.

ABSTRACT

A putative major gene for resistance to rust caused by *Puccinia melanocephala* has been identified in the sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivar R570. Resistance of cultivar R570 was not expressed when tissue cultured plants were inoculated with *P. melanocephala* from Réunion. In contrast, a good correlation with field resistance was observed when detached leaves were inoculated with the pathogen. This latter technique was used to inoculate R570 with eight rust isolates from Brazil, Colombia, Florida, Guadeloupe, Réunion and Zimbabwe. R570 was resistant to all the tested isolates of the pathogen. Moreover, the resistance level of the 18 clones from an R570 selfing progeny did not change when these plants were inoculated with seven rust isolates, suggesting that the gene identified in R570 confers by itself resistance to all tested isolates. No specific race of *P. melanocaphala* able to overcome the resistance of R570 was found in this study.

RESUME

Un facteur majeur de résistance à la rouille (*Puccinia melanocephala*) a été identifié chez le cultivar de canne à sucre R570. La résistance de ce cultivar ne s'exprime pas *in vitro* dans les conditions que nous avons utilisées. En revanche, la technique des "feuilles détachées" permet une expression de la résistance comparable à celle qui est observée sur le terrain. Cette technique a été utilisée pour tester différents isolats de rouille originaires du Brésil, de Colombie, de Floride, de Guadeloupe, de la Réunion et du Zimbabwe sur R570. Ce cultivar est résistant à l'ensemble des isolats testés. Par ailleurs, l'inoculation de 18 clones issus de l'autofécondation de R570 avec sept isolats révèle la même ségrégation de résistance,

suggérant que le gène identifié chez R570 confère à lui seul la résistance aux isolats testés. Aucune race spécifique de *P. melanocephala* capable de surmonter la résistance identifiée chez R570 n'a été détectée dans cette étude.

INTRODUCTION

Sugarcane rusts, common rust and orange rust, are caused by *Puccinia melanocephala* H. Syd. and P. Syd. (synonym *P. erianthi* Padw. and Khan) and by *P. kuehnii* Butler, respectively. The latter occurs in the Asian-Australian-Pacific region (18) and is considered as a weak pathogen. In contrast, *P. melanocephala* has a wider distribution (almost all sugarcane-growing areas) and first epidemics caused important economic losses (6). The first reported epidemic of common rust occurred in India during the 1950's. The pathogen reached Australia and the Caribbean region in 1978, then it spread rapidly throughout cane-growing countries. Rust is essentially disseminated by wind, and pathogen spores can be transported over hundreds of kilometers.

Common rust causes yellowish spots on both leaf surfaces. The flecks become reddish-brown and sporulating pustules develop on lower leaf surface of susceptible cultivars within 10 to 14 days. Expression of the disease is influenced by genetic, environmental (essentially air temperature and leaf wetness) and physiological (age of infected plants) interacting factors.

The most efficient and economic control measure against sugarcane common rust is to grow resistant cultivars. Sugarcane breeding is complicated by the complex genome structure of cultivars (high level of ploidy, aneuploidy and interspecific hybrid origin). Rust resistance is generally considered to be quantitatively inherited trait (3,22,25). Progress from breeding for rust resistance has been rapid because this trait has a high narrow and broad-sense heritability (7), and evaluation of clone resistance degree is relatively easy. Two methods are commonly used to evaluate rust reaction. The first method is a field assessment through natural infection. The second method is a controlled condition test with artificial rust spores inoculation of whole plants (20) or detached leaves (13,23) inoculation of tissue cultured plants was also attempted (14). Rating of rust infection is based on symptom severity and two kinds of scales are used, one graduated from 0 to 4 or 5 and the other one from 0 or 1 to 9. The first one is usually used in sugarcane breeding programs, and the second one is mostly used for genetic or inheritance studies (13).

The development of resistant cultivars allowed to control sugarcane common rust, and economic losses caused by this disease are currently negligible. Nevertheless, existing resistant cultivars are threatened by appearance of new races of *P. melanocephala*. The existence of different races is supported by the changes of rust reaction of different sugarcane cultivars grown in different stages of selection or in different countries (9,12,13,16,21). However, various pathogenic race descriptions on evidence from scattered experiments and

publications must be considered with care since disease measuring, environments, testing techniques and accuracy could differ (24). Occurrence of different common rust races was validated through controlled conditions in India (20), Hawaii (4) and Florida (5). Taylor (23) tested different rust isolates from Australia (Queensland), and concluded that only one race was present in this location, and clonal changes observed in rust reaction were probably caused by changes in environmental conditions.

Common rust resistance inheritance studies of a selfed progeny derived from a modern cultivar, R570, resulted in the identification of a putative major rust resistance gene (8). This sugarcane cultivar is one of the most cultivated varieties in Réunion and Mauritius, and it is included in many breeding programs worldwide. The objective of this work was to evaluate the efficiency of the resistance identified in cultivar R570 against rust isolates from different locations. Several inoculation methods and plant materials were compared prior to inoculating R570 and two susceptible cultivars through controlled conditions with different rust isolates. Moreover, locus diversity involved in R570 rust resistance was tested using a sample of 18 clones from a R570 selfing.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Tissue cultured plants of the cultivars R570 (resistant), H49-5 (susceptible) and B4362 (susceptible) were derived from axial buds and grown in glass test tubes (2.5 x 20 cm) in 20 ml of Murashige and Skoog medium (MS) modified by Feldmann *et al.* (10). Plantlets were stored at 28°C in a controlled environment chamber with a 12 hour photoperiod. Plant material used for the detached leaf method was grown in pots in a greenhouse quarantine (17). It was formed by the above-mentioned cultivars and 18 clones derived from the selfing of cultivar R570 (8,11).

Inoculum

Rust isolates originated from various sugarcane growing areas (Argentina, Australia, Brazil, Colombia, Florida, Guadeloupe, Hawaii, Louisiana, Mauritius, Réunion, South Africa and Zimbabwe) were gathered within the framework of the International Society of Sugarcane Technologists (ISSCT). Spores were sampled from the lower surface of infected leaves and sent to Montpellier, France. The percentage of spore germination of each sample was evaluated by spore germination tests on agar slides (4.5% agar). Spores were deposited on

these slides and placed in a Petri plate whose bottom was covered with a water soaked paper to maintain a high humidity level necessary for rust spore germination. After 24 hours at 25°C, the slides were observed under a microscope and the percentage of spore germination was assessed by counting germinating spores. Eight samples with a germination percentage higher than 2% were used for the inoculation tests. These isolates originated from Brazil, Colombia, Florida, Guadeloupe, Réunion and Zimbabwe. For Florida, three isolates Florida43, Florida78 and Florida97 were sampled on cultivars B4362, CP78-1247 and CP97-1283. Cultivar CP78-1247 was considered resistant to moderately resistant until 1988 when it showed extremely high rust susceptibility throughout south Florida. This is one of the recorded cases of possible occurrence of sugarcane rust races (16). Spores of each sample were then distributed in several 0.5 ml Eppendorf tubes and stored at -20°C until inoculation of sugarcane.

The rust isolates were therefore constituted of a mixture of spores collected from several pustules of the same cultivar, and the inoculum was neither monosporic nor purified. The percentage of spore germination was verified for each inoculum used to infect sugarcane.

Inoculation tests

Tissue cultured plant inoculation: Twenty to 30 day-old plantlets were removed from the glass tubes before inoculation. Spores collected from the storage tube with a lancet needle were dropped in 10 µl of sterile distilled water and streaked all over the lower leaf surface of plantlets. The plantlets were then replaced into the tubes with either MS medium or MS with geneticin (0.25%) and benomyl (0.05%) or thirame (0.4%). Inoculated plantlets were stored in a controlled environment chamber at 25°C with a 12 hour photoperiod. The experiments with MS growth medium and MS with geneticin and benomyl were repeated once, whereas the experiment with MS supplemented with geneticin and thirame was not repeated.

Detached leaf inoculation: Leaves were collected from plants grown in a greenhouse. The age of the plants issued from cuttings varied from one to six months, and only the youngest leaves (*i.e.* +0 to +2 with +1 being the top visible dewlap leaf, 1) were used. Each leaf was cut into three to five pieces of 6 to 8 cm.

Two inoculation methods were used. The first method consisted in spreading rust spores on a 4.5% agar plate from which small agar squares (0.2 x 0.2 cm) were applicated on the lower surface of the sugarcane leaves. The second method consisted in spraying the leaf pieces with a glass test tube atomizer (used for chromatography) containing 4×10^3 to 1.4×10^5 (average

= 7.5×10^4) viable spores per ml of sterile water. This latter method was used to inoculate the three control cultivars (R570, H49-5 and B4362) and the 18 clones derived from the selfing of R570.

Inoculated leaf pieces were placed in test tubes (2.5 x 20 cm) containing 5 ml of a 12.5 mg/l benzimidazole solution. According to Person *et al.* (1957, cited by 2), benzimidazole prevents chlorophyll degradation in detached leaves. The closed tubes were randomly disposed on racks, maintained 24 hours in the dark at 25°C, and then stored at 25°C with a 12 hour photoperiod.

The number of independent inoculations varied from two to six for the three cultivars R570, H49-5 and B4362, and from one to four for the 18 R570 progeny clones. For each repetition, the three cultivars or the 18 clones were treated simultaneously. Control cultivars (R570, resistant, and B4362, susceptible) were systematically and simultaneously inoculated with the R570 selfing clones. Two and three massive spray inoculation of 26 to 30 R570 leaf pieces were performed with the Brazil and the Réunion rust isolates, respectively.

Rust resistance evaluation

The field reaction to rust of R570 and the 18 R570 progeny clones was determined in Réunion. The reaction of these plants to rust isolates from various origins under control conditions was determined in Montpellier. Resistance level of both cultivars H49-5 and B4362 was largely described in literature (12,20).

Clones of the R570 progeny were evaluated in the field for rust resistance using natural infections for three years. The field design was described by Daugrois *et al.* (8) and rust resistance was evaluated using a scale from 1 (the most resistant) to 9 (the most susceptible) (22). This scale is based on visual assessment of the disease symptoms. Scores from 1 to 2 correspond to resistant plants; sporulation of the fungus never occurs but some brown spots may appear on the leaves. Scores from 3 to 9 correspond to susceptible plants in that fungus sporulation occurs with various degrees of intensity. Eight clones with a score of 1 and one clone with a score varying between 1 and 2, were considered resistant. The other nine clones formed the susceptible group: two clones (I10 and I19) were moderately susceptible with scores varying between 2-5, five clones (I32, II25, II28, III21 and III33) were susceptible (scores of 4-5) and two clones (I4 and I25) were highly susceptible (scores of 6-7).

Resistance under controlled conditions was measured by considering the number of plantlets or leaf pieces exhibiting rust pustules. A reaction was considered positive as soon as one pustule was observed.

Table 1. Inoculation of tissue cultured plants of three sugarcane cultivar with rust from Réunion. Medium 1 is a modified Murashige and Skoog medium (10) and medium 2 is medium 1 supplemented with benomyl (0.05%) and geneticin (0.25%).

Cultivar	Growth medium		Total
	Medium 1	Medium 2	
R570 (resistant)	4/18 ^a	14/21	18/39
H49-5 (susceptible)	4/12	12/20	16/32
B4362 (susceptible)	6/19	15/20	21/39
Total	14/49	41/61	

^a Number of plantlets showing pustulant lesions/total number of inoculated plantlets (data correspond to the total data of 4 to 5 independent trials of 3 to 5 plantlets each).

Tableau II.1. du document

Table 2. Comparison of two detached sugarcane leaf inoculation techniques with rust: pulverization of leaves with a rust spore suspension (P) and application on leaves of agar pieces with rust spores (A).

Rust isolate	Origin	Cultivar and inoculation technique					
		R570 (resistant)		H49-5 (susceptible)		B4362 (susceptible)	
		P	A	P	A	P	A
BRA	Brazil	0/5 ^a	0/3	4/5	2/3	5/5	2/2
FL78	Florida	0/5	0/3	1/4	1/3	2/5	2/3
FL97	Florida	0/5	0/3	4/5	1/3	4/5	1/3
REU	Réunion	0/15	0/11	11/14	3/10	11/15	5/9
ZIM	Zimbabwe	0/5	0/3	2/5	2/3	0/3	2/3
	Total	0/35	0/23	22/33	9/22	22/33	12/20

^a number of leaf pieces showing pustulant lesions/total number of inoculated leaf pieces (data correspond to the total data of 1 to 3 independent trials 2 to 5 leaf pieces each).

Tableau II.2. du document

Statistical analysis

Chi-square analysis were performed using the SAS software (SAS Institute Inc.) with FREQ and CATMOD procedures.

RESULTS AND DISCUSSION

Comparison of inoculation methods

In a first experiment, tissue cultured plants of the three cultivars, R570 (resistant), H49-5 (susceptible) and B4362 (susceptible) were inoculated according to Peros (14) with a rust isolate from Réunion. Pustulant rust lesions were observed on the leaves of the three cultivars after 10 to 14 days (table 1). The number of plantlets showing pustulant lesions was higher when the plantlets were grown on MS medium with benomyl and geneticin (table 5). Similar results were obtained when benomyl was replaced by thirame (data not shown). There was no difference in sporulation intensity, size of sporulant lesions and number of diseased plants between the resistant cultivar and the two susceptible ones (table 5).

The high infection level observed for resistant and susceptible cultivars indicated that resistance observed under field conditions was not expressed *in vitro*: cultivar R570 showed numerous leaf pustules and a high rust incidence whereas pathogen sporulation in this cultivar is quite rare in the field. Reports about *in vitro* expression of varietal rust resistance are contrasted (14,15). Our negative results were even emphasized when a fungicide and an antibiotic were added to the growth medium. These molecules prevented growth of microorganisms, and consequently favored growth of the sugarcane plantlets and development of the disease (table 1). Inoculation of *in vitro* cultured sugarcane was therefore, in our hands, not adapted to determining if the resistance identified in cultivar R570 was efficient against rust from different locations.

In a second experiment, detached leaves of cultivars R570, H49-5 and B4362 were inoculated by pulverization (13,23) and by agar pieces with five rust isolates (one from Brazil, Réunion, Zimbabwe and two from Florida). These two inoculation techniques were tested because they are less spore-consuming than the inoculation method with compressed air in a tower that was used by Taylor (23). No rust sporulation was observed with R570 leaves, whatever the inoculation method (table 2). Both susceptible cultivars showed sporulant lesions with all five

Table 3. Inoculation of a rust resistant sugarcane cultivar (R570) and two susceptible cultivars (H49-5 and B4362) with eight isolates of *P. melanocephala*.

Rust isolate	Origin	Sugarcane cultivar		
		R570 (resistant)	H49-5 (susceptible)	B4362 (susceptible)
BRA	Brazil	1/20 ^a	18/18	15/19
COL	Colombia	0/20	20/20	20/20
FL43	Florida	1/10	7/10	6/10
FL78	Florida	0/15	6/14	5/15
FL97	Florida	0/20	8/20	8/15
GUA	Guadeloupe	0/15	7/15	10/15
REU	Réunion	1/29	21/29	15/28
ZIM	Zimbabwe	0/20	11/19	5/17
	Total	3/149 (2.2%)	98/145 (68%)	84/139 (60%)

^a number of leaf pieces showing pustulant lesions/total number of inoculated leaf pieces (data correspond to the total data of 2 to 6 independent trials of 3 to 5 leaf pieces each).

Tableau II.3. du document

rust isolates, with the exception of cultivar B4362 inoculated with the isolate from Zimbabwe. The number of sporulating leaf pieces did not differ between the two inoculation methods, nor did the reaction of each cultivar (table 5). Additionally, the resistance level of the three cultivars was in agreement with the one observed in the field with natural rust infection. The detached leaf technique appeared, therefore, to be useful for distinguishing resistant from susceptible cultivars. The influence on symptom appearance of the leaf level on the plant or the position of the leaf piece used for inoculation was tested on the 18 progeny clones. The numbers of sporulating leaf pieces were not significantly different when the leaf +0 or +1 were used or when pieces were taken from the lower, the middle or upper part of the leaf (table 5).

From a practical point of view, utilization of agar pieces to inoculate the leaf pieces was more time-consuming. Moreover, agar is propitious to the development of many other pathogens that could interfere with the rust fungus. The pulverization of sugarcane leaves thus appears more effective.

Comparisons of rust isolates have to be performed under controlled conditions, or in the field with a range of standard cultivars of known reactions, because rust disease incidence is largely influenced by environmental conditions. All our experiments were performed in a non-growing sugarcane area, and the amount of available plant material and rust spores were limited. It was therefore imperative to use an inoculation method restraining the quantities of required material. The method of detached leaves matches all these conditions and was thus chosen for further experiments.

Reaction of R570, H49-5, and B4362 against eight rust isolates

Comparison of rust isolates from different countries has never been achieved and little is known about the existence of *P. melanocephala* races in the world. In this study, R570 and two susceptible cultivars, H49-5 and B4362 were tested against eight rust isolates collected from various geographic locations (from Africa, South and North America, the Antilles and the Mascareignes) (table 3). Cultivar H49-5 is already known for a shift in its reaction against rust (12, 20), and is thus potentially usable for the identification of rust races. All inoculations were performed with non cloned isolates in order to preserve the highest diversity in spore samples. Considering all eight rust isolates together, the difference between the reaction of the resistant and susceptible cultivars was clearly highlighted: 2.2% of R570 inoculated leaves showed pustulant lesions, as opposed to 60% and 68% for B4362 and H49-5, respectively (table 3). The rust incidence on the two susceptible cultivars varied according to the isolate of

Table 4. Inoculation of 18 clones from a R570 selfing with seven isolates of *P. melanocephala*. Field resistance to rust was evaluated through several replications in Réunion Island (8), S: susceptible R: resistant; reaction to rust was defined on a 1 (the most resistant); to 9 (the most susceptible) scale.

Sugarcane clone	Field resistance (score)	Isolate of <i>Puccinia melanocephala</i> (origin)							Total (%) ^c
		BRA (Brazil)	COL (Colombia)	FL78 (Florida)	FL97 (Florida)	GUA (Guadeloupe)	REU (Réunion)	ZIM (Zimbabwe)	
I 04	S (7)	15/20 ^a	16/20	4/10	11/20	6/7	15/20	3/20	70/117 (58%)
I 25	S (6)	16/20	20/20	7/10	10/20	4/7	11/20	4/19	72/116 (62%)
I 32	S (5)	16/20	20/20	4/10	13/20	7/7	6/20	7/20	73/117 (62%)
II 25	S (5)	14/20	18/20	6/10	15/20	3/7	10/14	9/20	75/111 (67%)
III 33	S (5)	11/20	18/20	3/10	12/20	7/7	9/20	3/20	63/117 (54%)
II 28	S (5)	15/20	15/20	4/10	15/20	3/7	10/20	5/20	67/117 (57%)
III 21	S (4 to 5)	17/20	20/20	8/10	14/20	2/7	9/20	3/20	73/117 (62%)
I 10	S (2 to 4)	16/20	18/20	5/10	13/20	7/7	9/20	6/20	74/117 (63%)
II 09	S (2 to 5)	16/20	20/20	3/9	15/20	7/7	5/19	5/19	71/114 (62%)
Total (%)^b		136/180 (75%)	165/180 (92%)	44/89 (49%)	118/180 (65%)	46/63 (73%)	84/173 (48%)	45/178 (25%)	
I 06	R (1 to 2)	0/20	0/20	0/10	0/20	0/7	0/20	0/20	0/117
I 11	R (1)	0/20	0/20	0/10	0/20	0/7	0/20	0/20	0/117
I 12	R (1)	1/20	0/20	0/10	0/20	0/7	3/20	0/20	4/117 (3%)
II 08	R (1)	0/20	0/20	0/10	0/20	0/7	0/20	0/20	0/117
II 32	R (1)	0/20	0/20	0/10	0/20	0/7	0/20	0/20	0/117
III 01	R (1)	0/20	0/20	0/10	0/20	0/7	0/20	0/20	0/117
III 03	R (1)	0/20	0/20	0/10	0/20	0/7	0/20	0/20	0/117
III 30	R (1)	0/20	0/20	0/10	0/20	0/7	0/20	0/20	0/117
III 32	R (1)	0/20	0/20	0/10	0/20	0/7	0/20	0/20	0/117
Total (%)^b		1/180 (0.55%)	0/180	0/90	0/180	0/63	3/180 (1.67%)	0/180	

^a number of pieces showing pustulant lesions/total number of inoculated leaf pieces (data correspond to the total data of 1 to 4 independent trials of 4 to 7 leaf pieces each).

^b percentage of leaf pieces from individuals showing pustulant lesions for each rust isolate.

^c percentage of leaf pieces from individuals showing pustulant lesions for each progeny clone.

Tableau II.4. du document

the pathogen (table 5). For example, the pathogen sporulated on each leaf piece inoculated with rust from Colombia. In contrast, only 8 out of 20 leaf pieces of cultivar H49-5 inoculated with the Florida isolate FL97, and 5 out of 17 leaf pieces of cultivar B4362 inoculated with the isolate from Zimbabwe showed rust lesions (table 3). However, the reaction pattern of the two susceptible cultivars appeared similar against the different rust isolates (table 5).

Cultivar R570 was resistant against all eight rust isolates. Differences in virulence between isolates may exist which are hidden by the presence of R570 resistance genes different from the one identified so far. This issue was addressed with the test of clones from the R570 progeny.

Reaction of a R570 self-progeny sample against seven rust isolates

Leaf pieces of 18 clones derived from the R570 self-progeny were inoculated with seven rust isolates from different geographic locations (table 4). The resistance of these clones varied in the field from 1 (resistant) to 7 (highly susceptible with pustules of medium size). Nine clones were considered as resistant (score 1 or 2) and the other nine clones were rated as susceptible (score 2-7). A clear cut pattern of reaction was observed for the field resistant clones and for the field susceptible clones (table 4). Resistant clones never developed sporulant lesions whatever the rust isolate, with the exception of clone I12 that showed a single pustule in one and three cases with isolates from Brazil and Réunion, respectively. In contrast, disease incidence in susceptible clones varied from 25% (isolate from Zimbabwe) to 92% (isolate from Colombia). The same resistance pattern was observed for all isolates of the pathogen: the sugarcane clones that are resistant to the pathogen from Réunion were also resistant to the others rust isolates, and similarly the clones susceptible to *P. melanocephala* from Réunion were susceptible to the pathogen from Brazil, Colombia, Florida, Guadeloupe and Zimbabwe. The conservation of the progeny pattern for the different isolates of the pathogen indicated that the gene identified in R570 as providing resistance against *P. melanocephala* isolate from Réunion also confers resistance against other rust isolates and it is the only genetic factor involved in R570 resistance to tested isolates.

The reaction of susceptible clones was not significantly different either for all isolates taken together (table 5), the percentage of leaf pieces showing pustules varied from 58% (susceptible clone I04) to 67% (susceptible clone II25), or for any single rust isolate (except for Réunion isolate, which associate chi-square probability level was $P = 0.047$). Comparing the different rust isolates, the percentage of leaf pieces showing pustules were significantly different (table 5) and varied, in the susceptible clones, from 25% (isolate ZIM from

Tableau 5. Probability values from chi-square (²) analysis of the number of sporulating leaf pieces or plantlets.

Experiment, effect	df	²	Probability
Tissue cultured plants inoculation (table 1)			
Medium	1	15.53	<0.001
Cultivar	2	0.85	0.655
Medium x Cultivar	2	0.77	0.681
Inoculation technique comparison (table 3)			
Technique	1	2.89	0.089
Cultivar ¹	1	0.63	0.425
Technique x Cultivar	1	0.90	0.089
R570, H49-5 and B4362 inoculation (table 4)			
Rust isolate ²	6	21.80	<0.001
Cultivar ¹	1	2.47	0.1160
Rust isolate x Cultivar	6	10.84	0.0936
Inoculation of 18 R570 progeny clones (table 5)			
Position of the leaf piece	3	3.86	0.277
Level of the leaf ⁵	1	3.73	0.053
Rust isolate ³	4	96.16	<0.001
Clone ⁴	8	10.57	0.227
Rust isolate x Clone	32	36.19	0.279

¹ Data concerning resistant cultivars were not taken in consideration because no, or very few, sporulation occurred on leaf pieces of these cultivars and including these data in the analysis would hide a possible significant effect between susceptible cultivars.

² Data concerning rust isolate from Colombia were not taken in consideration because data reach maximum values which cause null effective that could not be used to perform Pearson chi-square test (19) or logit model used by the SAS CATMOD procedure.

³ Data concerning rust isolates from Guadeloupe and Colombia were not taken in consideration because of reduce effective and maximum values, respectively.

⁴ Data concerning +2 leaf level were not taken in consideration because of reduce effective.

⁵ Only data concerning susceptible clones were taken in consideration.

Tableau II.5. du document

Zimbabwe) to 92% (isolate COL from Colombia). This difference between isolates was the same as already observed in the previous experiment. Variation in rust aggressivity could explain this result but it could also be due to large differences in the quality or purity of each spore sample. Rust samples could contain other microorganisms affecting rust spore germination and progress of disease symptoms in sugarcane. To evaluate the importance of these factors the rust samples should be first cloned and aseptically propagated. This could, however, also lead to select particular isolates of the pathogen.

Attempts to select spores with increased virulence on R570

Considering all experiments by leaf spray inoculation together, rust sporulation was observed in cultivar R570 on three leaf pieces out of 184 (1.6%) and in the resistant R570 progeny clones on four leaf pieces out of 1053 (0.4%). In the study of R570, H49-5 and B4362 with eight isolates of *P. melanocephala*, single and separate cases of rust sporulation on R570 leaves were observed with the isolates from Brazil, Florida and Réunion (table 3). In the study of the R570 progeny clones, the resistant clone I12 showed pustules on four different leaf pieces; however, only one sporulant lesion was observed in each case, and the size of this pustule was markedly lower than the size of the pustules on susceptible cultivars, that are usually 2-10 mm long by 1-3 mm wide (18). The pustule from the R570 leaf infected with the isolate from Réunion was collected and propagated on detached leaves of susceptible cultivar H49-5. The resulting abundant spores were used to reinoculate R570 and H49-5 leaf pieces. Cultivar H49-5 again developed numerous sporulant pustules, but R570 showed only some brown spots that never formed sporulant lesions. In order to evaluate the importance of sporulation on resistant clones, two additional sets of 89 and 56 R570 leaf pieces were inoculated with rust spores from Réunion (REU) and Brazil (BRA) isolates, respectively. One pustule with very few spores was obtained for the Réunion isolate, but no sporulation for the Brazilian rust isolate. The spores obtained on R570 were collected and used to inoculate leaves of H49-5 and R570. Three pustules appeared on H49-5 whereas about ten chlorotic spots were observed on R570. The spores from H49-5 were collected and used to inoculate again H49-5 and R570 leaves. The susceptible cultivar H49-5 showed about 100 sporulant pustules whereas R570 showed only non sporulating spots. These results confirmed that the spores that developed on R570 were not a new race of the pathogen but, because of optimal or particular conditions, some spores can infect the resistant R570 cultivar. This might also explain why tissue culture plantlets of R570 did not show rust resistance in our study (table

1). Peros and Bonnel (15) suggested that high level of nitrogen content in tissue cultured plant leaves could favor expression of rust disease in field resistant cultivars.

No isolate of *P. melanocephala* able to overcome the resistance gene identified in the R570 cultivar was found in our study. This work confirms the field resistance to rust of cultivar R570 which is grown in numerous locations where rust occurs (Brazil, Chad, Congo, Guadeloupe, Ivory Coast, Martinique, Mauritius, Réunion, Trinidad, Vietnam and Zimbabwe). It could be concluded that this wide range resistance is due to a single genetic factor of resistance.

ACKNOWLEDGMENTS: We thank M.J. Darroussat, M. Muller, J.F. Bousquet and J. Milazzo for technical support; J.C. Girard, J. Notaise, M.V. Casagrande, P. Zvoutete, J.C. Comstock, J. Victoria, J.H. Daugrois, B.J. Croft, R. Bailey, K. McFarlane, J. Hoy, R. Ullivarri, S. Schenck and S. Sauntally who provided rust spore samples; P. Letourmy for helpful advice with the statistical analysis, and M. Chatenet, J.C. Girard, M.V. Casagrande and J.P. Peros who shared their valuable experience with rust. Our thanks also go to J.L. Comstock and J.P. Peros for critical reviewing of the manuscript.

LITERATURE CITED

1. Artschawager, E. 1925. Anatomy of the vegetative organs of sugar cane. *J. Agric. Res.* 30:197-221.
2. Browder, L. E. 1964. A modified detached-leaf culture technique for study of cereal rusts. *Plant Dis. Rep.* 48:906-908.
3. Chu, T. L., Serapion J. L., and Rodriguez, J. L. 1982. Varietal reaction and inheritance trends of susceptibility of sugarcane to rust (*Puccinia melanocephala* H. & P. Syd). *The Journal of agriculture of the University of Puerto Rico* LXVI:99-108.
4. Comstock, J. L. 1985. A new race of rust suspected. Hawaiian Sugar Planters' Association Experiment Station.
5. Comstock, J. C., Shine, J. M., Dean, J. L., and Irey M. S. 1994. Races of the common rust pathogen, *Puccinia melanocephala*, in Florida. *Phytopathology* 84:867.
6. Comstock, J. C., Shine, J. M., and Raid N. 1992. Effect of early rust infection on subsequent sugar cane growth. *Sugar Cane* 4:7-9.
7. Comstock, J. C., Wu, K. K., and Schnell, R. J. 1992. Heritability of resistance to sugar cane rust. *Sugar Cane* 6:7-10.

8. Daugrois, J. H., Grivet, L., Roques, D., Hoarau, J. Y., Lombard, H., Glaszmann, J. C., and D'Hont A. 1996. A putative major gene for rust resistance linked with an RFLP marker in sugarcane cultivar R570. *Theor. Appl. Genet.* 92:1059-1064.
9. Dean, J. L., and Purdy, L. H. 1984. Races of the sugarcane rust fungus, *Puccinia melanocephala*, found in Florida. *Sugar Cane* 1:15-16.
10. Feldmann, P., Rott, P., Oriol, P., Paulet, F., Daugrois, J., and Sapotille, J. 1997. Use of tissue culture of sugarcane for rapid propagation and disease control in Guadeloupe. Pages 1-5 in: *Medio siglo de investigaciones caneras en Cuba/INICA, Jovellanos-Mayari.*
11. Grivet, L., D'Hont, A., Roques, D., Feldmann, P., Lanaud, C., and Glaszmann, J. C. 1996. RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp.): genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. *Genetics* 142:987-1000.
12. Liu, J. L. 1980. Observation and consideration on sugarcane rust incidence, varietal reaction and possible occurrence of physiologic races. *Sugarcane Pathol. Newsl.* 25:5.
13. Liu, J. L. 1980. Sugarcane rust: taxonomy, epidemiology, chemical control and relative resistance of sugarcane varieties in Puerto Rico. Pages 54-58 in: *Inter-American Sugar Cane Seminar: Cane Disease, Miami.*
14. Peros, J. P. 1984. Infection de la canne à sucre cultivée *in vitro* par *Puccinia melanocephala* Syd. *L'agron. trop.* 39:355-357.
15. Peros, J. P., and Bonnel, E. 1989. Utilisations de la culture *in vitro* de la canne à sucre en pathologie: cas de la striure, de la gommose et de la rouille. *L'agron. trop.* 44:321-326.
16. Raid, N. R. 1989. Physiological specialization in sugarcane rust (*Puccinia melanocephala*) in Florida. *Plant Dis.* 73:183.
17. Rott, P., Bousquet, J. F., Muller, M., and Chatenet, M., 1997. La quarantaine de canne à sucre du Cirad à Montpellier. *Agriculture et développement* 13:22-28.
18. Ryan, C. C., and Egan, B. T. 1989. Rust. Pages 189-210 in: *Diseases of sugarcane.* Ricaud, C., Egan, B. T., Gillaspie, A. G., and Hughes, C. G. eds. Academic press, Amsterdam.
19. Snedecor, G. W., and Cochran, W. G. 1967. *Statistical methods.* 6th ed. Iowa State Univ. Press, Ames.
20. Srinivasan, K. V., and Muthaiyan, M. C. 1965. A note on physiologic races in *Puccinia erianthi* Padw. and Khan affecting sugar-cane varieties. Pages 1126-1128 in: *Proceedings International Society of sugar cane Technologists Congress, Puerto Rico.*
21. Tai, P. Y. P., Miller, J. D., Comstock, J. C., and Glaz, B. 1998. Frequency distribution of rust resistance in breeding populations of the Canal Point sugarcane cultivar development program. *Sugar J.* 61:36-41.

22. Tai, P. Y. P., Miller, J. D., and Dean, J. L. 1981. Inheritance of resistance to rust in sugarcane. *Field Crops Res.* 4:261-268.
23. Taylor, P. W. J. 1992. Evidence for the existence of a single race of common rust caused by *Puccinia melanocephala*, in Australian sugarcane cultivars. *Aus. J. Agric. Res.* 48:443-450.
24. Walker, D. I. T. 1987. Breeding for disease resistance. Pages 455-502 in: *Sugarcane improvement through breeding*. Heinz, D. J. ed. Elsevier Press, Amsterdam.
25. Whittle, A. M. 1980. Do races exist in pathogens of sugarcane? Pages 16-19 in: *Inter-American Sugar Cane Seminar: Cane Disease*, Miami.

SYNTHESE DES PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS

Dans un premier temps, nous avons testé deux méthodes permettant de réaliser des inoculations de spores de *P. melanocephala* sur feuilles de canne à sucre, et nous avons obtenu les résultats suivants :

- la résistance du cultivar R570 ne s'exprime pas *in vitro* dans les conditions que nous avons utilisées.
- les inoculations sur feuilles détachées maintenues en survie permettent d'obtenir des résultats comparables aux données de terrain. Cette méthode a été utilisée pour toute la suite de notre étude.

Les résultats des inoculations de la rouille sur R570 ainsi que sur un échantillon de 18 individus issus de l'autofécondation de R570 nous ont permis de montrer que le gène majeur de résistance identifié chez R570 confère à lui seul une résistance à tous les isolats testés.

Le chapitre qui suit concerne la recherche de marqueurs proches du gène de résistance à la rouille.

**III. RECHERCHE DE MARQUEURS
PROCHES ENCADRANT LE GENE
MAJEUR DE RESISTANCE IDENTIFIE
CHEZ R570**

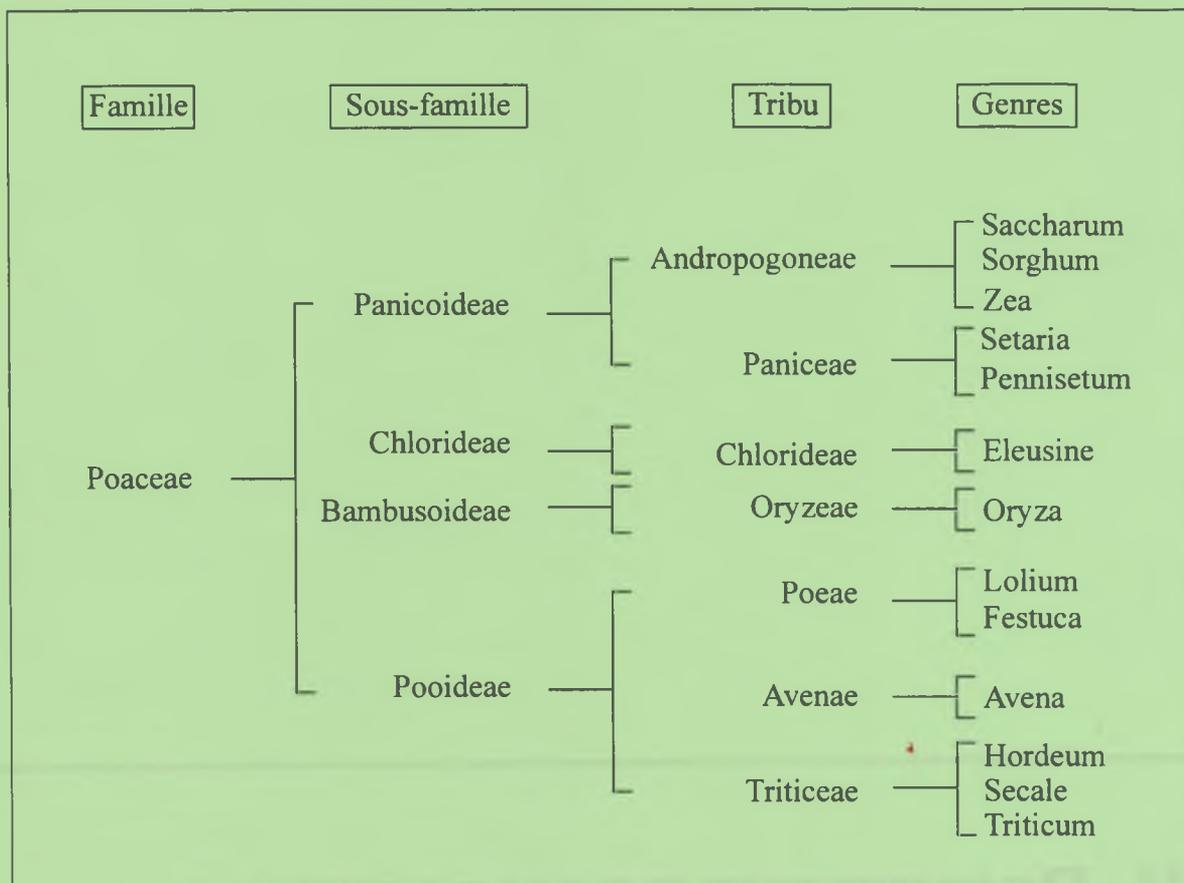


Figure 17 : Taxonomie de la famille des Poacées (d'après Devos et Gale, 1997).

III. RECHERCHE DE MARQUEURS PROCHES ENCADRANT LE GENE MAJEUR DE RESISTANCE IDENTIFIE CHEZ R570

Au début de cette étude, le gène majeur de résistance à la rouille (*P. melanocephala*) identifié chez le cultivar R570 était lié à un marqueur RFLP (7 cM environ), révélé par la sonde d'ADN de canne à sucre CDSR29, qui n'était intégré à aucun des 10 groupes de liaison de la carte génétique de R570 (Grivet *et al.*, 1996). Nous avons entrepris la recherche de marqueurs proches encadrant ce gène au moyen de deux approches. La première approche, basée sur la conservation de la synténie entre les Poacées, consiste à utiliser des sondes RFLP cartographiées dans les régions des génomes du sorgho, du maïs et du riz homéologues à la région ciblée et identifiées par cartographie comparée. La seconde approche est basée sur l'utilisation de l'analyse de ségrégation en mélange ou "*Bulked Segregant Analysis*" (BSA) associée à la technique de marquage AFLP.

Ce chapitre est découpé en trois parties. (i) La première partie comprend une synthèse bibliographique sur la cartographie comparée au sein des Poacées, puis les résultats obtenus avec l'approche basée sur la synténie sont présentés sous forme d'un article (ii) La seconde partie traite de l'approche basée sur la BSA (iii) La troisième partie décrit l'utilisation de l'un des marqueurs AFLP, lié au gène et identifié avec la BSA, pour affiner l'étude de la cartographie comparée entre la canne à sucre et le sorgho dans la région étudiée.

A. EXPLOITATION DE LA SYNTENIE ENTRE LES POACEES

La famille des Poacées est constituée de quatre sous-familles (*Pooideae*, *Bambusoideae*, *Chlorideae* et *Panicoideae*) (figure 17) regroupant 650 genres et environ 10000 espèces (Kellogg et Birchler, 1993) dont le blé, le maïs et le riz, trois céréales qui représentent la moitié de la production alimentaire mondiale. Les Poacées ont une origine monophylétique remontant, approximativement, à 70 millions d'années, et sont représentées sur tous les continents couvrant ainsi plus de 3/4 des terres cultivées dans le monde. Les différentes espèces ont une architecture générale caractéristique qui les distingue des espèces appartenant à d'autres familles. Il existe, cependant, une grande diversité morphologique, physiologique et une variabilité de la structure du génome (nombre chromosomique de base, taille génome, pourcentage de séquences répétées).

GENOMES DES POACEES

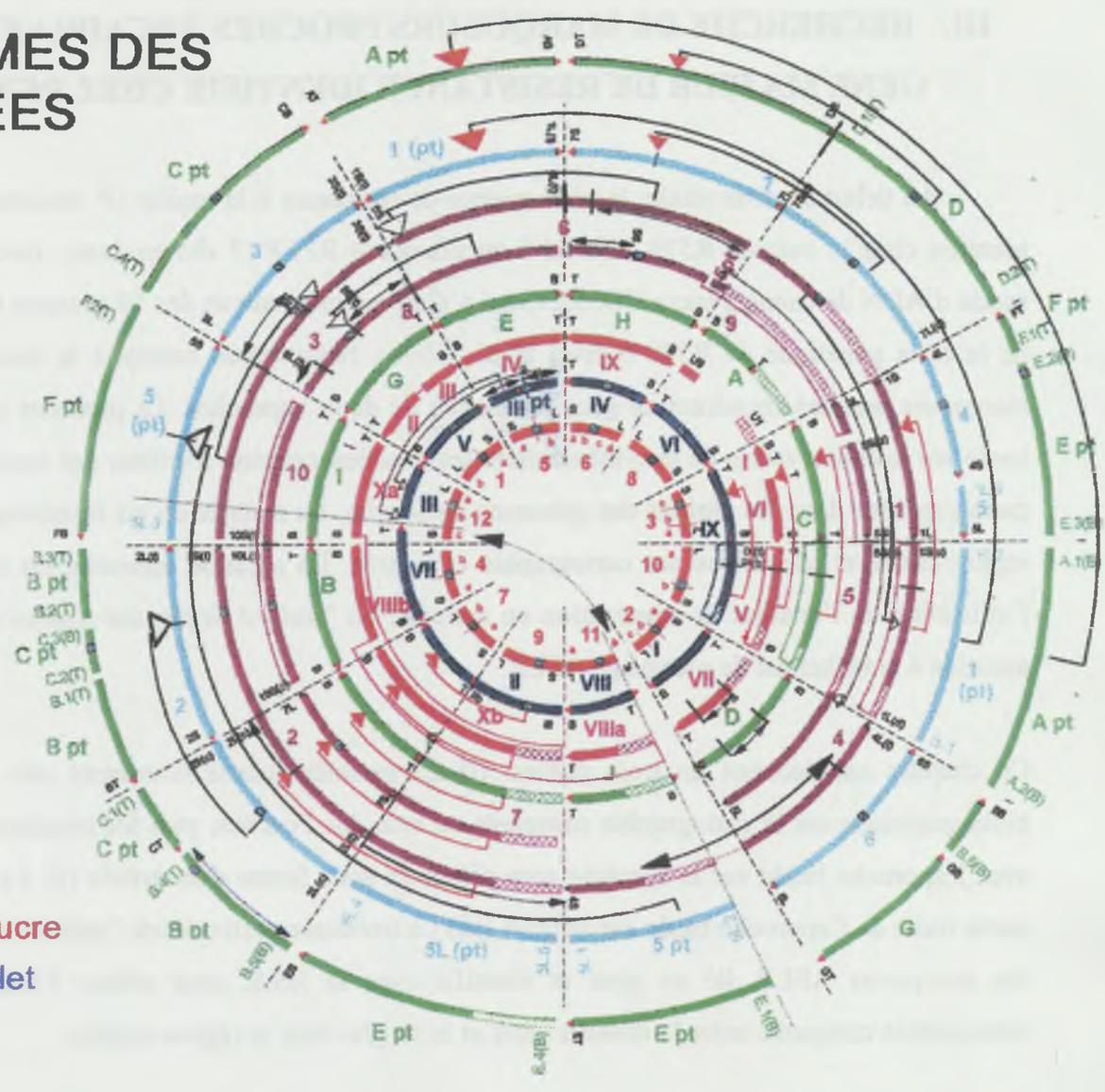


Figure 18 : Alignement des cartes génétiques de différentes Poacées (d'après Devos et Gale, 1997).

Au début des années 80, l'essor des marqueurs moléculaires a permis le développement de cartes génétiques de nombreuses espèces. L'utilisation de sondes RFLP communes a permis de mettre en évidence l'existence de synténie et de colinéarité entre les génomes d'espèces apparentées. Deux locus sont dits synténiques s'ils sont localisés sur des segments chromosomiques homéologues et la colinéarité représente la conservation de l'ordre des ces locus. Les premiers travaux de cartographie comparée sont consacrés à l'étude des trois génomes du blé hexaploïde (Chao *et al.*, 1988) et, au sein de la famille des Solanacées, à la comparaison entre la tomate et la pomme de terre (Bonierbale *et al.*, 1988). Les trois génomes A, B et D du blé tendre montrent une très forte colinéarité avec toutefois quelques réarrangements, il en est de même pour les génomes de la tomate et de la pomme de terre pour lesquels seulement cinq inversions différencient les génomes de ces deux espèces. Les études comparatives se sont étendues à de nombreuses espèces, mais c'est au sein de la famille des Poacées que les études les plus poussées ont été menées (figure 18). La cartographie comparée a permis une meilleure compréhension de l'évolution du génome des plantes en ce sens qu'il a été possible d'élucider les processus impliqués dans la divergence d'espèces apparentées (duplication, inversion, translocation) (Pereira *et al.*, 1994) et le temps d'évolution des chromosomes (Whitkus *et al.*, 1992). Moore *et al.* (1995a, 1995b et 1995c) décrivent le génome ancestral hypothétique des Poacées, constitué d'un chromosome unique basé sur le découpage et l'arrangement des blocs de liaison du riz utilisés pour décrire le génome de plusieurs Poacées. Dans le même esprit, Wilson *et al.* (1999) décrivent le génome ancêtre hypothétique du maïs.

Parmi les Poacées, un intérêt plus particulier a été porté à la tribu des Andropogonées qui compte trois plante cultivées d'intérêt majeur : le maïs, le sorgho et la canne à sucre.

A.1. Cartographie comparée entre la canne à sucre, le sorgho, le maïs et le riz

L'utilisation de sondes RFLP de maïs pour la cartographie génétique du sorgho a permis d'établir de nombreux points communs dans l'organisation des génomes de ces deux espèces (Hulbert *et al.*, 1990 ; Whitkus *et al.*, 1992 ; Binelli *et al.*, 1992 ; Melake-Berhan *et al.*, 1993 ; Pereira *et al.*, 1994). Il apparaît que ces génomes partagent de larges segments chromosomiques synténiques et colinéaires bien que de nombreux réarrangements, impliquant des duplications et des inversions ou des translocations intrachromosomiques, aient été

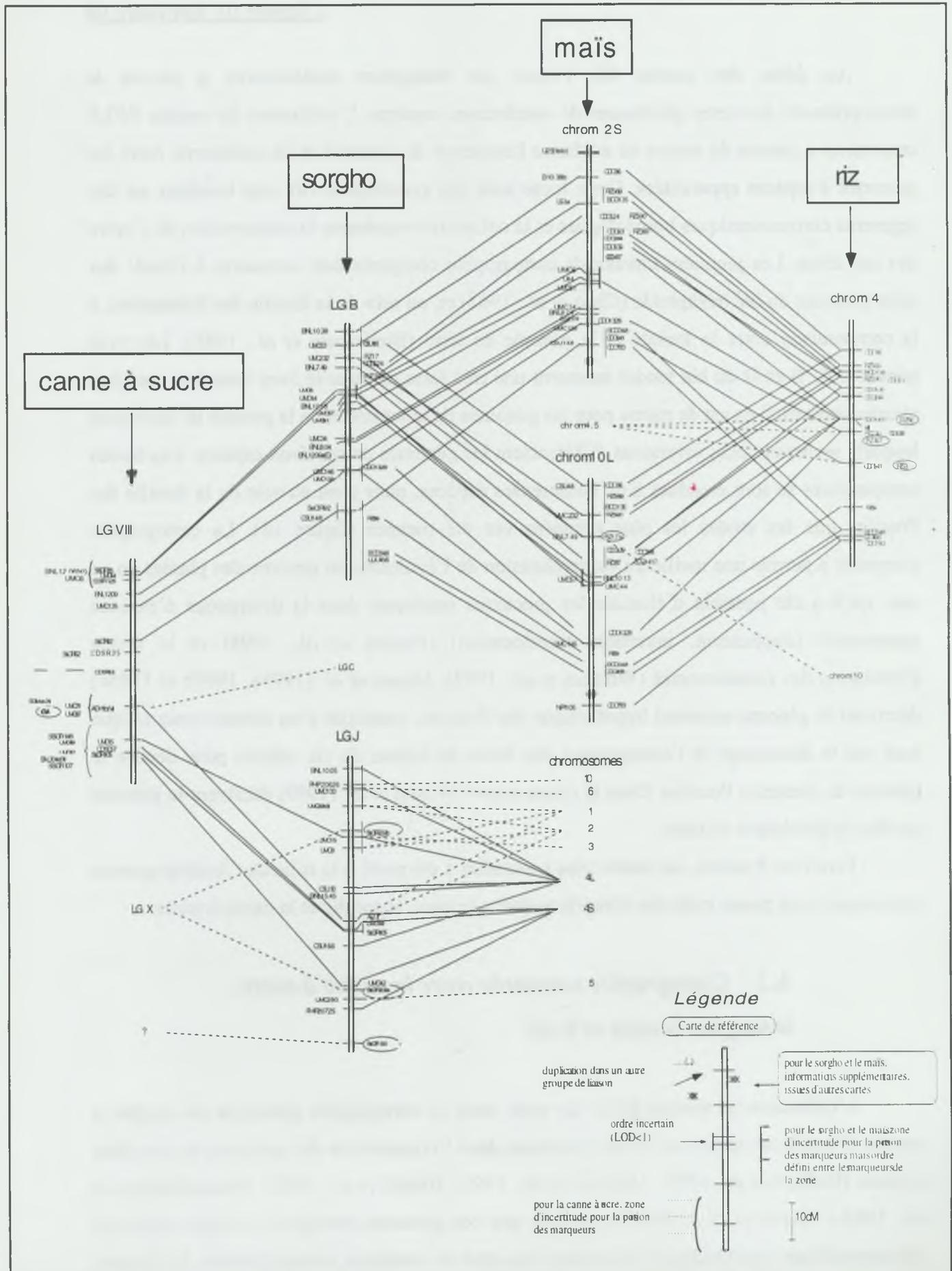


Figure 19 : Synténie et colinéarité entre les groupes de liaison homéologues de la canne à sucre, du sorgho, du maïs et du riz, en prenant comme référence le groupe composite VIII de la canne à sucre (d'après Dufour *et al.*, 1996).

observés. La plupart des régions génomiques du sorgho sont synténiques avec des régions dupliquées du maïs confirmant ainsi l'origine tétraploïde de cette plante (Helentjaris *et al.*, 1988). La première comparaison entre les génomes du maïs et de la canne à sucre (D'Hont *et al.*, 1994), effectuée par cartographie de sondes d'ADN de maïs chez la canne à sucre, a révélée un degré de synténie élevé. Puis le développement d'une carte génétique de canne à sucre plus complète a permis la comparaison conjointe du maïs, du sorgho et de la canne à sucre. La canne et le sorgho apparaissent très semblables, alors que la correspondance avec le maïs est plus complexe (Grivet *et al.*, 1994). Par la suite, les progrès réalisés au niveau des cartes génétiques de la canne à sucre et du sorgho ont permis de confirmer le degré de synténie et de colinéarité très élevé entre ces deux génomes (Dufour *et al.*, 1996 et 1997 ; Glaszmann *et al.*, 1997 ; Guimaraes *et al.*, 1997 ; Ming *et al.*, 1998). Les études de cartographie comparée se sont étendues à des espèces appartenant à différentes tribus avec, par exemple, la comparaison entre le maïs (Andropogonée) et le riz (Oryzée) (Ahn et Tanksley, 1993). Les génomes de ces deux espèces présentent des similitudes d'organisation, certains chromosomes ou bras chromosomiques entiers sont conservés, mais les réarrangements sont plus nombreux qu'entre les génomes du maïs et du sorgho. L'étude comparative du riz, du sorgho et de la canne à sucre, peut être envisagée si on utilise le maïs comme intermédiaire (figure 19).

A.2. Exploitation de la synténie entre les Poacées pour la recherche de marqueurs proches du gène de résistance à la rouille

L'existence de segments chromosomiques homéologues entre les Poacées permet d'uniformiser les ressources de cartographie et de transférer informations de carte et marqueurs d'une espèce bien caractérisée génétiquement et à petit génome vers une espèce à génome plus complexe et/ou peu étudiée. Par exemple, la synténie entre le sorgho et la canne à sucre est utilisée au Cirad pour saturer la carte génétique du cultivar de canne à sucre R570. De la même façon, nous avons tiré profit des similitudes qui existent entre le génome de la canne à sucre et celui de trois autres Poacées : le sorgho, le maïs et le riz, dans le but de saturer la région gène de résistance à la rouille chez R570. Ces trois espèces, proches de la canne à sucre, présentent un intérêt particulier car elles possèdent des génomes plus simples (en terme de ploïdie pour le maïs et le sorgho et de taille du génome de base pour le riz) dont les cartes génétiques saturées comportent un grand nombre de marqueurs RFLP.

Cette étude fait l'objet d'un article intitulé "*Application of Synteny across Poaceae to determine the map location of a rust resistance gene of sugarcane*" soumis à publication dans le journal *Theoretical and Applied Genetics*.

Application of Synteny across Poaceae to determine the map location of a rust resistance gene of sugarcane

C. Asnaghi, F. Paulet, C. Kaye, L. Grivet, J.C. Glaszmann, A. D'Hont

Cirad, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, avenue Agropolis, BP5035, 34032 Montpellier cedex 1, France

Corresponding author: A. D'Hont

Submitted with 1 Table and 2 Figures

ABSTRACT

A putative major rust resistance gene has been identified in a self progeny of the sugarcane cultivar R570. Until now, this gene was linked to a marker revealed by the sugarcane probe CDSR29 but unassigned to any linkage group of the current genetic map. We used synteny relationships between sugarcane and three other grasses in order to try and saturate the region around this rust resistance gene. Comparison of sugarcane, sorghum, maize and rice genetic maps led to the identification of homoeologous chromosome segments at the extremity of sorghum linkage group D, rice linkage group 2, maize linkage group 4 and in the centromeric region of maize linkage group 5. One hundred eighty four heterologous probes were selected and tested for cross-hybridization with sugarcane DNA. A total of 106 probes produced a good hybridization signal and were hybridized on 88 individuals of the R570 selfed progeny. Two hundred and seventeen single dose markers were added to the R570 genetic map, of which 66% were mapped into linkage group VII, together with the rust resistance gene. This gene is now mapped at the edge of a cosegregation group composed of 19 RFLP markers. None of the mapped loci were located closer to the gene than CDSR29. The gene thus appears to reside at the edge of a "synteny cluster" used to describe the different grass genomes.

Key words : Sugarcane, rust resistance gene, comparative mapping, RFLP

RESUME

Nous avons utilisé les relations synténiques entre la canne à sucre et trois autres Poacées dans le but de saturer la région du gène de résistance à la rouille chez la canne à sucre. La cartographie comparée de la canne à sucre, du sorgho, du maïs et du riz nous a permis d'identifier les segments chromosomiques homéologues aux extrémités des groupes de liaison D du sorgho, 2 du riz et 4 du maïs et dans la région centromérique du groupe de liaison 5 du maïs. Cent quatre vingt quatre sondes hétérologues ont été sélectionnées puis testées pour leur aptitude à s'hybrider sur l'ADN de la canne à sucre et à révéler des RFLP. Parmi ces 184 sondes, 106 ont produit un signal d'hybridation exploitable et ont été hybridées sur 88 individus issus de l'autofécondation de R570. Parmi les 217 marqueurs ajoutés à la carte génétique de R570, 66 % ont été cartographiés dans le groupe de liaison VII dans lequel est également cartographié le gène de résistance à la rouille. Ce gène se situe à l'extrémité d'un groupe de coségrégation composé de 19 marqueurs RFLP. Aucun de ces 19 marqueurs n'est cartographié plus près du gène que le marqueur révélé par CDSR29.

Introduction

Sugarcane, *Saccharum* spp., is a highly polyploid and aneuploid grass of the *Andropogoneae* tribe. Modern cultivars are interspecific hybrids involving essentially a domesticated species, *S. officinarum* ($2n=80$) (high sugar content), and a wild species, *S. spontaneum* ($2n=40$ to 128) (resistant to biotic and abiotic stresses), with different basic chromosome numbers (10 and 8, respectively, D'Hont et al. 1998). The chromosome number of these interspecific hybrids ranges from $2n=100$ to 130; the proportion of chromosomes derived from *S. spontaneum* is minor (around 15%) compared to that from *S. officinarum* (D'Hont et al. 1996). Despite the complexity of the sugarcane genome structure, genetic maps of three *Saccharum* species, *S. officinarum* (Guimaraes et al. 1997; Ming et al. 1998), *S. spontaneum* (Da Silva et al. 1993, 1995; Al-Janabi et al. 1993; Ming et al. 1998) and *S. robustum* (Guimaraes et al. 1997; Ming et al. 1998) and one modern cultivar, R570 (Grivet et al. 1996), have been built with RFLPs, RAPDs and/or AFLPs markers. R570 is the sugarcane cultivar the most utilized in Réunion Island and Mauritius and is included as a progenitor in many breeding programs.

The molecular genetic map of R570 was constructed with a set of 128 maize and sugarcane RFLP probes. Four hundred and eight simplex markers were mapped on 96 cosegregation groups assembled into 10 linkage groups on the basis of common probes (Grivet et al. 1996). A recent addition of 460 markers (322 RFLPs and 138 AFLPs markers) reduced the number of apparent linkage groups to 9 (unpublished data).

A putative major rust resistance gene was identified on the self-progeny used to construct the genetic map of the cultivar R570 (Daugrois et al. 1996); it is the major resistance gene described in sugarcane. Leaf rust in sugarcane is caused by the pathogenic agent *Puccinia melanocephala* and is characterized by sporulant rust-colored pustules on the leaf surface of susceptible individuals. The segregation ratio of resistance in the progeny was three resistant to one susceptible, indicating that the allele conferring resistance to this disease is dominant and that there is one sole copy in the genome of R570. This resistance gene was located on R570 genetic map; it was linked to a marker revealed by the sugarcane probe CDSR29, itself left unassigned to any defined linkage group.

Colinearity and synteny between related species have been largely studied through comparative mapping, specifically within *Poaceae* family that contains many of the cereal crops of the greatest importance. For the *Andropogoneae* tribe, early reports focused on sorghum and maize (Hulbert et al. 1990; Binelli et al. 1992; Whitkus et al. 1992; Melake-

Berhan et al. 1993; Pereira et al. 1994) and demonstrated that the two species share many orthologous loci arranged in colinear regions forming, however, a rather complex patchwork. D'Hont et al. (1994) compared sugarcane and maize genomes, and first demonstrated how sugarcane genome analysis could draw benefits from simpler species. Comparative genome mapping between sugarcane and sorghum (Dufour et al. 1997; Guimaraes et al. 1997; Ming et al. 1998) demonstrated a high degree of synteny and colinearity. Several comparative studies were performed between sugarcane, sorghum and maize (Grivet et al. 1994; Dufour et al. 1996; Glaszmann et al. 1997) and showed that sugarcane and sorghum are more closely related than either one is to maize. Comparative genome mapping has also been investigated between maize and rice, which belong to different tribes; Ahn and Tanksley (1993) showed that linkage conservation applies to more than two-third of both genomes.

The degree of genome conservation observed between these species offers the possibility of transferring genetic information and mapping resources (RFLP probes) from well characterized genomes, such as that of maize, and/or simple genome structure species, such as that of rice or sorghum, to less studied and more complex genomes such as that of sugarcane, in order to saturate the genetic map or regions surrounding genes of particular interest.

The goal of this study was to identify closely linked markers flanking the putative rust resistance gene in sugarcane to eventually initiate a chromosome walk toward the gene using the sugarcane BAC library developed on R570 (Tomkins et al. 1999). For this purpose, we exploited the synteny between sugarcane and three other grasses: sorghum, maize and rice.

Materials and methods

Plant material

The mapping population of sugarcane used in this study has been previously described by Grivet et al. (1994). It consists of 88 clones derived from a self fertilization of the rust resistant cultivar R570. This cultivar was developed by crossing H32-8560 and R445, both of which are resistant to rust.

The sorghum mapping population, used to map the sugarcane probe CDSR29, is described in Dufour et al. (1997). This population, RIL379, is composed of 110 recombinant inbred line (RIL) derived from the cross IS2807 x 379.

Probes

Among the 87 maize probes used, 11 AGR were from Mycogen Plant Science, 5 ASG from Asgrow seeds, 11 BNL from Brookhaven National Laboratory, 15 CSU from California State University-Hayward, 8 ISU from Iowa State University, 13 NPI from Native Plants Inc. & Pioneer Hi-Bred International, 5 PHP from Pioneer Hi-Bred International, 9 UAZ from University of Arizona, 6 UMC from University Missouri-Columbia and 4 genes: *BT1* from University of Wisconsin-Madison, *Xet1* from University of Illinois, and *dbal* and *eif5* from University Missouri-Columbia. Forty two and forty five probes were gDNA and cDNA clones, respectively. Among the 75 rice probes, 26 RGC, 26 RGR and 5 RGG were provided by the Japanese Rice Genome Mapping Project and 12 RZ and 6 RG by Cornell University. Eleven and sixty four probes were gDNA and cDNA clones, respectively. Among the 9 sorghum probes, 6 TXS were provided by Texas A & M University and 3 SbrPG by Rustica Prograin Genetique and Cirad. Six and three probes were gDNA and cDNA clones, respectively. The 11 oat and 2 barley probes, CDO and BCD probes, respectively, were provided by Cornell university. These probes were cDNA clones. DNA inserts were cloned in DH5- α and amplified by polymerase chain reaction (PCR).

Southern analysis

Genomic DNA extraction and Southern blot hybridization have been described in Hoisington et al. (1992) and Grivet et al. (1994), wash conditions (0.5 X SSC, 65°C) were identical for all probes (Da Silva et al. 1993). Survey filters were composed of three lanes, one of maize DNA (cultivar Goldcrest) digested with *HindIII* (6 μ g/lane), one of rice DNA (cultivar KU86) digested with *HindIII* (3 μ g/lane) and three of R570 (sugarcane cultivar) DNA each digested with *HindIII*, *DraI* or *SstI* (10 μ g/lane). They were used to screen the heterologous probes for cross-hybridization quality with sugarcane DNA and number of markers revealed. R570 progeny DNA was digested with either *HindIII*, *DraI* or *SstI* (10 μ g/lane). Southern hybridization of sorghum DNA was performed as described in Dufour et al. (1996).

Data analysis and mapping of markers

The segregation of each scorable band was treated independently based on its presence or absence in the progeny. The genetic map was constructed with single dose restriction fragments (SDRFs) only. A SDRF is a fragment present in a single copy and that segregates in a single dose ratio, that is 3:1 (present:absent) in the selfed progeny. SDRFs were selected as in Grivet et al. (1996) and added to the segregation data of markers used to construct the current linkage map of R570. Markers produced by the same probes and displaying the same segregation pattern were considered redundant and only one was conserved for analysis. Biased markers, showing segregation distortion toward lower values on the basis of a χ^2 test at $P = 0.05$ (Grivet et al. 1996), were integrated in the analysis and indicated on figures.

Linkage analysis of markers was performed with Mapmaker 3.0 program (Lander et al. 1987). Markers were assembled into cosegregation groups by two point analysis at a LOD score of 5. New cosegregation groups were assigned to preexisting linkage groups on the basis of at least two common linked probes. Cosegregation groups assigned to linkage group were ordered with multipoint analysis; when the most likely hypothesis was less than 10 times more likely than the second one, the order was considered as ambiguous.

Seventy seven individuals were part of the population evaluated either for resistance to rust (Daugrois et al. 1996). The other 11 individuals were taken from a larger population consisting of 700 individuals that were tested for two consecutive years in the field. Field trials were located at the Cirad station of La Mare and Le Gol (Réunion Island) using natural infection. Rust resistance level was evaluated using a scale graduated from 1 (the most resistant) to 9 (the most susceptible) (Tai et al. 1981).

Mapping of markers on the sorghum population was described in Dufour et al. (1996).

Comparative mapping

Comparison of sugarcane, sorghum, maize and rice was focussed on the chromosome blocks homoeologous to the region of the rust resistance gene in sugarcane. A synthetic map of sorghum, maize and rice chromosome segments involved in the comparison was constructed based on different published genetic maps of each species (sorghum: Binelli et al. 1992; Whitkus et al. 1992; Melake-Berhan et al. 1993; Xu et al. 1994; Pereira et al. 1994; Lin et al. 1995; Dufour et al. 1997; maize: Hoisington and Coe, 1990; Beavis et al. 1991; Burr and Burr, 1991; Ahn and Tanksley, 1993; Heredia et al. 1994; Chao et al. 1994, Maize Genetics

Table 1: Distribution of the 279 markers mapped on R570 linkage groups and locus coincidence with sorghum, maize and rice homoeologous segments. Roman numbers indicate sugarcane linkage groups (in accordance with Grivet et al. 1996), L indicate cosegregation groups yet unassigned to any defined linkage group and U indicates markers yet unlinked. The nomenclature of sorghum linkage groups is that of Pereira et al. (1994).

Linkage group	Number of markers/linkage group	Number of probes involved	Locus coincidence with homoeologous regions			
			Sorghum D	Maize 4	Maize 5	Rice 2
I	11	5	2	2	2	-
II	12	6	2	-	4	-
IV	4	2	-	1	-	1
V	4	4	1	-	3	-
VII	122	53	17	11	14	14
VIII	10	7	1	3	1	2
IX	36	18	4	3	13	-
X	13	8	2	2	4	1
XI	5	2	-	1	1	-
Total	217		29	23	42	18
L	32	9				
U	30	34				
Total	279					

Tableau III.1. du document

Cooperation Newsletter 1996; BNL 96, Mycogen and UMC 98 maps in maize DB: <http://www.agron.missouri.edu> and rice: Causse et al. 1994; Kurata et al. 1994). The initial framework of each chromosome segment was founded on the most saturated published genetic map of each species, and additional probes, from others maps, were added approximately.

On the basis of our own experiments, a composite map of sugarcane linkage group VII was built based on the 10 largest cosegregation groups out of the 17. The analysis was performed using the matrix [probes x cosegregation groups] as described in D'Hont et al. (1994). An initial set of eight markers, well distributed along the linkage group, were chosen and ordered with a multipoint analysis at a threshold LOD score of 1. Other markers were added to this group and ordered with the same analysis threshold. Markers that could not be ordered at this LOD score were placed at the most likely position according to multipoint analysis and were highlighted on the map. The probes mapped on the other seven cosegregation groups and not integrated in the above procedure were added on the composite map on the basis of their relative position on the individual cosegregation groups.

Results

Probe CDSR29, that was not linked on the initial R570 genetic map, was analyzed on the progeny of the sorghum cross IS2807 x 379 used to build our sorghum genetic map. It revealed one marker mapped at the extremity of sorghum linkage group D, using our nomenclature derived from that of Pereira et al. (1994). The established homoeology relationships enabled us to target maize and rice chromosome segments homoeologous to the sorghum segment bearing the locus CDSR29: two segments on the maize map, one on the extremity of linkage group 4 and the other one in the centromeric region of linkage group 5; one segment on the rice map at the extremity of linkage group 2.

One hundred and eighty four probes were selected in these targeted homoeologous regions: 32 on the basis of various sorghum maps, 86 on maize maps and 66 on rice maps. They include 9 sorghum probes, 87 maize probes, 75 rice probes and 13 oat and barley probes (11 and 2 respectively). cDNA clones (68%) were preferentially chosen because the transcribed sequences are more likely to be conserved between species than other genomic sequences.

One hundred and six of the 184 probes produced a good hybridization signal with sugarcane DNA and were further hybridized on our mapping population. Sixty of them

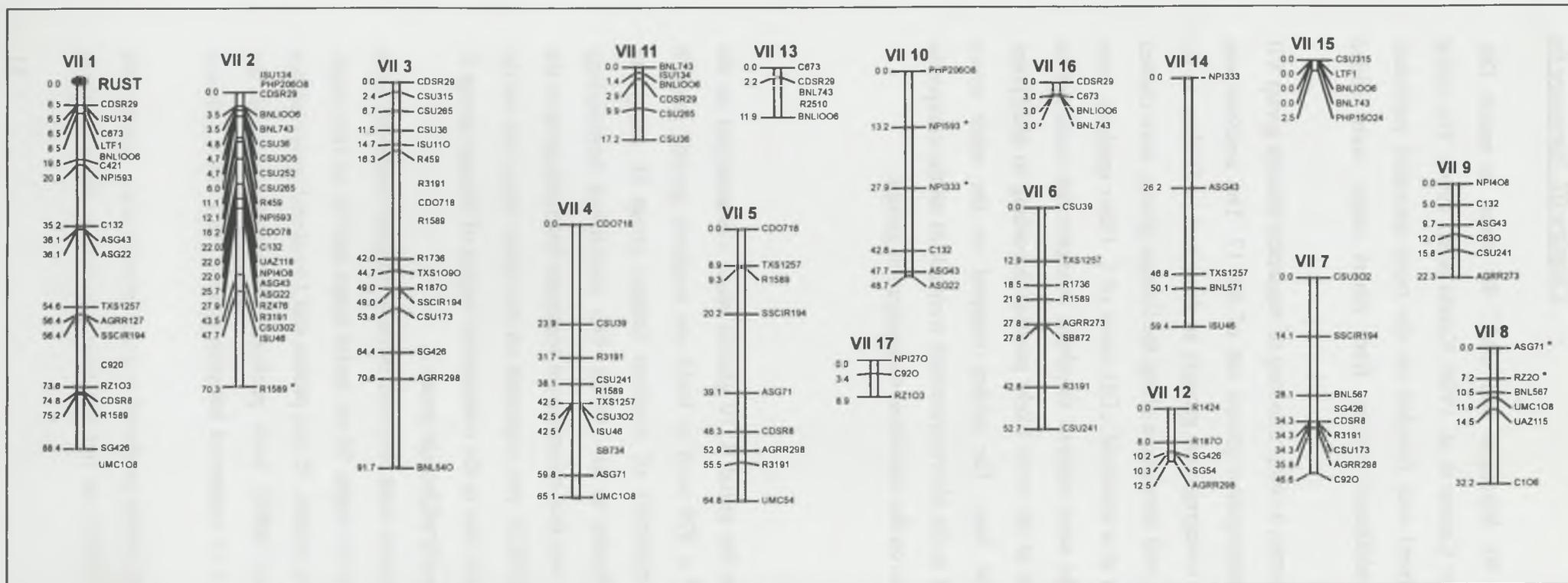


Figure 1: Cosegregation groups of sugarcane linkage group VII. Distances between markers were calculated with Haldane mapping function. Markers whose position is not indicated with an horizontal tick were ordered at a LOD score < 1. * indicate markers showing segregation distortion and "RUST" indicates the position of the rust resistance locus.

Figure 20 du document

produced a poor or unscorable signal for mapping, with bands too weak or background levels too high, and the other 18 probes did not produce any hybridization signal on sugarcane DNA. The percentage of heterologous probes that cross-hybridized with sugarcane DNA (at the stringency levels described above) was 78% (7/9) for sorghum, 68% (59/87) for maize, 45% (34/75) for rice and 36% (4/11) for oat.

A total of 106 probes, involved in 115 probe/enzyme combinations, were surveyed on the R570 progeny. They produced 1020 bands, from which 524 were polymorphic and 311 segregated 3:1. Among the latter simplex markers, 32 were redundant. On average, each polymorphic probe generated 5.5 segregating bands of which 3.3 were simplex markers whereas 11 probes did not reveal any polymorphic marker.

Segregation of 279 non redundant markers with complete or near complete data sets were analyzed using MAPMAKER 3.0 program together with the 730 preexisting RFLP markers of our current R570 map yielded as many as 508536 pairwise comparisons.

A total of 217 markers (representing 75% of the probes analyzed) were located on cosegregation groups belonging to one of the nine linkage groups of the current R570 map, whereas 32 were placed in cosegregation groups that were not yet integrated into any linkage group, and 30 markers were left unlinked (table 1). Of the 217 markers integrated into a linkage group, 122 (representing 66% of the mapped probes) were assigned to linkage group VII and 36 to linkage group IX, while the other 59 markers were scattered among 7 linkage groups.

The resulting new state of linkage group VII is as follows: it is composed of 17 cosegregation groups and encompasses 146 markers revealed by 61 probes (figure 1). The cosegregation group that contains the rust resistance gene is composed of 19 RFLP markers (figure 1) covering 88 cM. Only one side of the resistance gene has been marked and the gene itself appears in the terminal position of the group. The closest marker to the gene is at 6.5 cM and is revealed by the sugarcane probe CDSR29. At the same position, there are two other markers, revealed by rice and maize probes C673 and ISU134, respectively. The other 16 cosegregation groups of linkage group VII varied in length from 2.5 to 92 cM and bore from 3 to 22 markers. The new markers incorporated into the cosegregation groups of linkage groups II, IV, V, VIII, IX, X and XI were also ordered. Generally, they were scattered on several cosegregation groups and dispersed along them (data not shown).

A composite linkage group VII map, bearing the rust resistance gene, was built and compared with the homoeologous segments of sorghum, maize and rice maps (figure 1). The construction of the composite linkage group was performed as described in D'Hont et al.

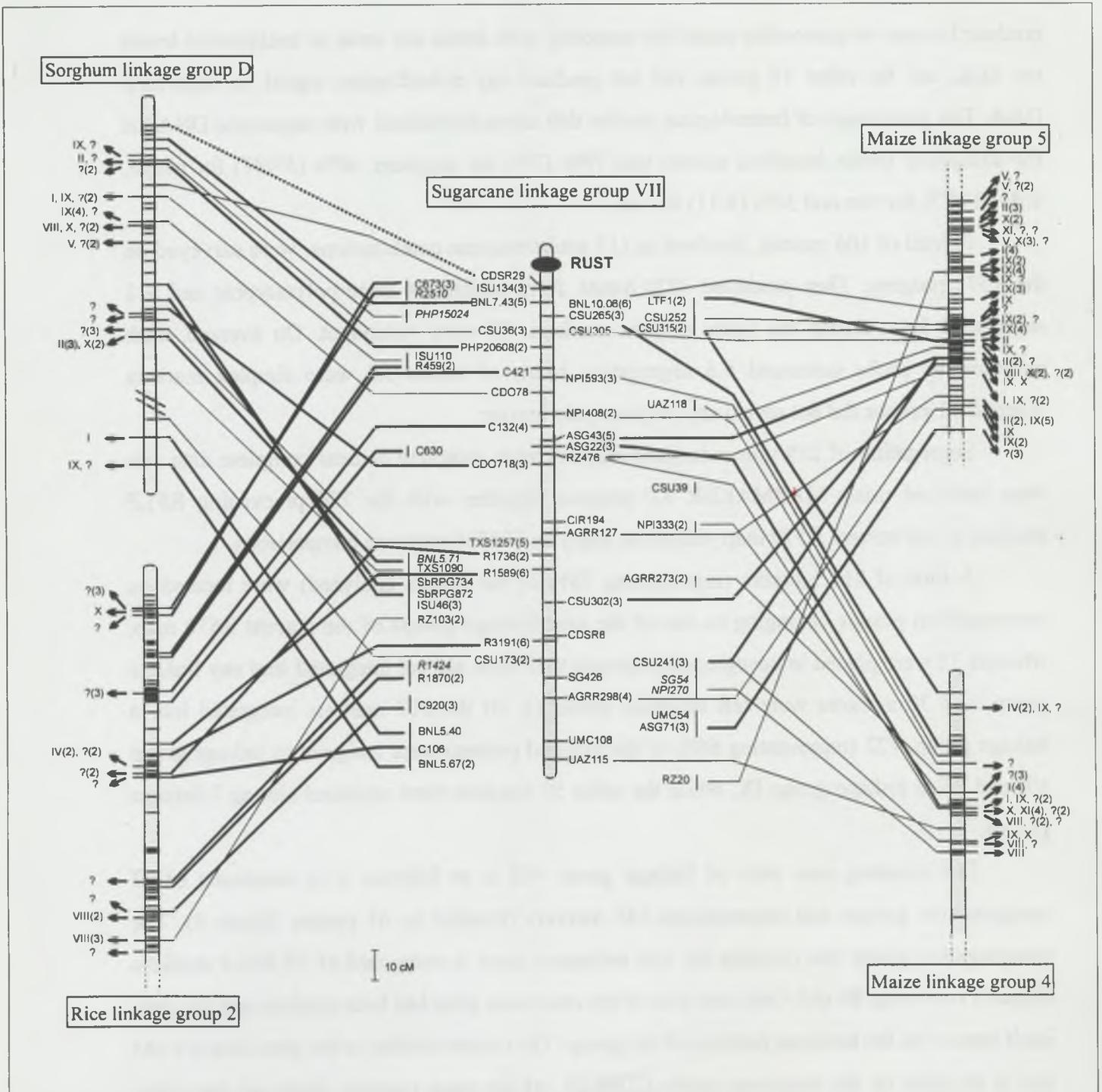


Figure 2: Location, on the R570 sugarcane map, of the probes selected from homoeologous chromosomes in several grass species. Vertical bars represent chromosomal segments of sorghum, maize and rice compared to the sugarcane segment that bears the rust resistance locus. The maps for sorghum, maize and rice result from synthesis between published maps. Positions of probes are indicated with an horizontal tick mark (i) short ticks indicate probes that do not cross-hybridize with sugarcane DNA (ii) long ticks indicate probes that reveal marker so on sugarcane linkage group VII and/or on other linkage group (indicated on the side of an arrow). The sugarcane map uncompasses probes with specific locations and probes whose location is approximate (vertical bars). The horizontal/diagonal lines between chromosome segments indicate the position of syntenic loci between sugarcane and the other three grasses. Thick lines connect probes having an accurate localization on homoeologous segments and fine lines connect those with a relative unprecise position.

(1994) pooling the segregation data of the ten largest cosegregation groups, representing 55 of the 61 RFLP probes mapped on this linkage group. The other six probes (BNL5.71, NPI270, PHP15024, R1424, R2510 and SG54) were added in a second round on the basis of their relative position in individual cosegregation groups.

Among the 32 probes selected from the targeted area of sorghum map, 22 cross-hybridized with sugarcane DNA and 17 revealed markers located on linkage group VII, including five which revealed duplicated loci (CSU36 revealed markers on linkage groups II and VII, ISU110 on I, VII and IX, CDO78 on VII and IX, BNL5.71 on II, VII and X and BNL5.67 on VII and IX) (figure 2). Three probes revealed markers mapped on other linkage groups and two revealed markers unlinked on R570 molecular map (figure 2). Colinearity of the 17 loci syntenic in both sugarcane and sorghum was very well conserved, except for four loci (BNL5.71, SbRPG734, SbRPG872 and ISU46) whose order was uncertain on linkage group VII composite map. The rust resistance gene is located at the extremity of the composite linkage group VII, that also corresponds to the extremity of sorghum composite linkage group D. The terminal probe, CDSR29, of sorghum linkage group D reveals the closest marker to the rust resistance gene in sugarcane, at 6.5 cM.

Out of the 86 probes selected from the targeted area of maize genetic maps, 56 could be positioned on the sugarcane R570 map; 17 belong to maize linkage group 4, 36 to linkage group 5 and 3 probes reveal a locus mapped on both linkage groups. Sixteen of the 20 probes selected from maize linkage group 4 revealed 3:1 segregating markers. Eleven of them revealed markers mapped on linkage VII, among which three (RZ476, CSU241 and NPI 270) revealed duplicated loci mapped on other linkage groups as well. The other five probes were mapped on different linkage groups (figure 2). Among the 39 probes selected from maize linkage group 5, 33 displayed at least one marker segregating 3:1. Fourteen of them mapped on linkage group VII, including six which revealed duplicate loci into other linkage groups. Seventeen probes mapped only on other linkage groups, with a majority of linkage group IX, and two revealed markers unlinked on the current R570 molecular map (figure 2). Probes selected from maize linkage group 4 and 5 allowed to identify 23 and 42 loci, respectively, on R570 genetic map (table 1). The comparison of composite sugarcane linkage group VII and linkage groups 4 and 5 of maize reveals some rearrangements between genomes of both species. The comparison with maize linkage group 4 involves 11 probes of which five (ASG22, RZ476, NPI333, AGRR273 and UAZ115) apparently do not respect map colinearity. However, the position of four of these five probes (RZ476, NPI333, AGRR273 and UAZ115) was uncertain on the genetic map of at least one of the two species compared.

The terminal probe CSU315 is the probe that reveals the closest marker to the rust resistance gene in sugarcane among those selected from maize linkage group 4. Among the 14 common probes mapped on maize linkage group 5, four (LTF1, CSU302, CSU241 and RZ20) markedly reveal colinearity breaks (figure 2). Some of them have approximate locations, and the global pattern does not suggest any particular simple rearrangement. The closest marker to the rust resistance gene was revealed by BNL10.06. This locus is penultimate on the considered region of maize linkage group 5. The next marker located just above, namely RZ20, does not respect colinearity and maps on the opposite end of the sugarcane composite linkage group VII.

Among the 66 probes selected from the rice genetic map, 28 cross-hybridized with sugarcane DNA and 19 of them revealed markers segregating 3:1 in sugarcane. Fourteen were mapped on linkage group VII, one (RZ103) of which revealed another locus on linkage groups VIII (figure 2). Three probes were mapped in linkage groups IV, VIII and X, and two revealed markers unlinked on R570 molecular map (figure 2). The order of the 14 markers mapped on sugarcane linkage group VII was conserved with rice except for two markers revealed by R1736 and C106. Two other probes, namely C673 and R2510, apparently do not respect map colinearity (figure 2), but, they revealed very close markers whose location was not accurate on the sugarcane map. The rust resistance gene is localized at the extremity of the composite linkage group VII that corresponds also to the extremity of rice linkage group 2. The two terminal probes of rice linkage group 2, namely C673 and R2510, reveal the closest markers to the rust resistance locus.

Discussion

The current knowledge on sugarcane, sorghum, maize and rice genetic maps enabled us to identify chromosome segments corresponding to the region that harbors the rust resistance gene in sugarcane. These segments are located at the extremity of sorghum linkage group D, rice linkage group 2, maize linkage group 4 and in the centromeric region of maize linkage group 5. The existence of two different homoeologous linkage group of maize is consistent with the duplicated origin of this genome (Gottlieb 1982; Helentjaris et al. 1988). The use of heterologous probes selected from these regions allowed to locate the rust resistance gene at the extremity of a cosegregation group belonging to linkage group VII of the current R570 genetic map. However, none of the mapped loci was located closer to the target gene than the marker revealed by CDSR29 and only one side of the gene was marked. All synteny and

colinearity relationships with sorghum, rice and maize linkage group 4 indicate that the resistance gene is in a subtelomeric position. The homoeologous segment identified in the centromeric region of maize linkage group 5 is adjacent to a breakpoint of synteny conservation; all probes above this breakpoint that could be mapped on R570 fell into linkage groups other than VII (figure 2) whereas all probes derived from below this breakpoint were mapped on a single side of CDSR29.

The efficiency of the comparative approach was slightly different between the three species used. The percentage of cross-hybridization of the heterologous probes was 78, 68 and 45% for sorghum, maize and rice, respectively (table 1). These values are slightly lower but close to values reported in earlier studies: 78 to 97% cross-hybridization was observed between maize probes and sugarcane DNA (D'Hont et al. 1994; Da Silva et al. 1993; Grivet et al. 1996) with stringency conditions of 0.1 X SSC to 0.5 X SSC, and 52% between rice probes and sugarcane DNA (Da Silva et al. 1993) with 0.5 X SSC. This pattern of cross-hybridization with sugarcane DNA places sorghum closer to sugarcane than maize while rice is more distant. These results agree with current phylogenic hypothesis. The three genera *Saccharum*, *Sorghum* and *Zea* are members of the *Andropogoneae* tribe while the genus *Oryza* belongs to the *Oryzeae* tribe.

Among the 81 heterologous probes linked on R570 genetic map, 53 (or 65%) were assigned to R570 linkage group VII (table 1) together with the rust resistance gene. Locus coincidence between the homoeologous regions compared was high for sorghum and rice, with 60% and 78% respectively. The same parameter amounted 48% and 33% for maize linkage groups 4 and 5, respectively. The synteny was thus relatively well conserved between sugarcane (R570), sorghum, rice and maize linkage group 4, whereas, maize linkage group 5 seems to depart. Non syntenic probes usually were scattered on various linkage groups (table 1) and were not clustered in particular regions of the sugarcane map. Therefore, disruption of synteny could not be explained by simple rearrangements. However, it is noteworthy that the segment of maize linkage group 5 was the source of many probes that mapped on both sugarcane linkage group VII and IX. This may be indicative of specific processes that affected the evolution of this region in maize.

Colinearity of syntenic loci was relatively well conserved between the different species compared (figure 2). Few intrachromosomal rearrangements were observed and some of these rearrangements could be due to uncertain location of markers on sugarcane composite map. The global picture that we observed follows the standard described by Bennetzen and

Freeling (1997), who stated that 20 to 40% of the DNA markers in one grass species will not be colinear with DNA markers of another grass.

Despite the failure to find markers on both sides of the target locus, the general level of colinearity is promising for developing heterologous molecular resources to assist gene analysis in sugarcane. Sugarcane cultivars have a very complex genome with around 12 homologous or homoeologous versions of each basic chromosome. Map based cloning could be facilitated by the use of species with smaller and simpler genomes. Among the three species we used, the genetic information and molecular resources derived from sorghum appeared to be most valuable. However, the current genetic maps of sorghum are not completely saturated yet. Rice also showed a high degree of synteny and colinearity at the genetic map level with sugarcane for the region studied. Rice has a small genome (0.46 pg per basic genome compared to 0.8 pg for sorghum, 0.9 pg for sugarcane, and 2.9 pg for maize; Bennett and Leitch 1995, unpublished data for sugarcane) and advanced physical maps (Zhang and Wing, 1997). It thus appears as the species immediately best adapted that could readily be used to accelerate chromosome walking toward the rust resistance identified in R570.

Map based cloning assisted by synteny requires also conservation of microcolinearity across the two species involved in the chromosome walk. Several studies have demonstrated that there can be local conservation of colinearity at the microlevel between different grass species (Kilian et al. 1995; Dunford et al. 1995; Foote et al. 1997; Gallego et al. 1998). The subtelomeric situation of the gene could, however, be a source of difficulty, since an increasing rate of recombination in distal parts of grass chromosomes, that can lead to rearrangements, has been observed (Kilian et al. 1995; Van Deynze et al. 1995; Gallego et al. 1998). When markers close enough to the resistance gene are detected in R570, it will be thus important to determine if synteny and colinearity are conserved between rice and sugarcane at the microlevel.

Acknowledgments: We would like to thank Drs T. Musket from University of Missouri-Columbia, I. Saab from University of Illinois, G.E. Hart from Texas A & M University, T. Sullivan from University of Wisconsin-Madison and T. Sasaki from Rice Genome Research Program who kindly provided RFLP probes and the international Consortium for Sugarcane Biotechnology that funded part of this research. The experiments comply with the current laws of the country in which the experiments were performed.

References

- Ahn S. and Tanksley S.D., 1993. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 : 7980-7984.
- Al-Janabi S.M., Honeycutt R.J., McClelland M. and Sobral W.S., 1993. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208'. *Genetics*, 134: 1249-1260.
- Beavis W.D., Grant D., Albertsen M. and Fincher R., 1991. Quantitative trait loci for plant height in four maize populations and their associations with qualitative genetic loci. *Theor. Appl. Genet.*, 3: 141-145.
- Bennett M.D. and Leitch I.J., 1995. Nuclear DNA amount in angiosperms. *Ann. Bot.*, 76: 113-176.
- Binelli G., Gianfranceschi L., Pè M.E., Taramino G., Busso C., Stenhouse J. and Ottaviano E., 1992. Similarity of maize and sorghum genomes as revealed by maize RFLP probes. *Theor. Appl. Genet.*, 84: 10-16.
- Burr B. and Burr F.A., 1991. Recombinant inbreds for molecular mapping in maize. *Trends in Genetics*, 7 (2): 55-60.
- Causse M.A., Fulton T.M., Cho Y.G., Ahn S.N., Chunwongse J., Wu K., Xiao J., Yu Z., Ronald P.C., Harrington S.E., Second G., McCouch S.R. and Tanksley S.D., 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics*, 138 1251-1274.
- Chao S., Baysdorfer C., Heredia-Diaz O., Musket T., Xu G. and Coe E.H., 1994. RFLP mapping of partially sequenced leaf cDNA clones in maize. *Theor. Appl. Genet.*, 88 717-721.
- D'Hont A., Lu Y.H., Gonzalez de Leon D., Grivet L., Feldmann P., Lanaud C. and Glaszmann J.C., 1994. A molecular approach to unraveling the genetics of sugarcane, a complex polyploid of the Andropogoneae tribe. *Genome*, 37: 222-230.
- D'Hont A., Grivet L., Feldmann P., Rao S., Berding N. and Glaszmann J.C., 1996. Characterization of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Mol. Gen. Genet.*, 250: 405-413.
- D'Hont A., Ison D., Alix K., Roux C. and Glaszmann J.C., 1998. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. *Genome*, 41: 221-225.
- Da Silva J.A.G., Sorelles M.E., Burnquist W.L. and Tanksley S.D., 1993. RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*. *Genome*, 36: 782-791.
- Daugrois J.H., Grivet L., Roques D., Hoarau J.Y., Lombard H., Glaszmann J.C. and D'Hont A., 1996. A putative major gene for rust resistance linked with a RFLP marker in sugarcane cultivar 'R570'. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 1059-1064.

Dufour P., Grivet L., D'Hont A., Deu M., Trouche G., Glaszmann J.C. and Hymon P., 1996. Comparative genetic mapping between duplicated segments on maize chromosomes 3 and 8 and homoeologous regions in sorghum and sugarcane. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 1024-1030

Dufour P., Deu M., Grivet L., D'Hont A., Paulet F., Bouet A., Lanaud C., Glaszmann J.C. and Hamon P., 1997. Construction of a composite sorghum genome map and comparison with sugarcane, a related complex polyploid. *Theor. Appl. Genet.*, 94: 409-418.

Dunford R. P., Kurata N., Laurie D. A., Money T. A., Minobe Y. and Moore G., 1995. Conservation of fine-scale DNA marker order in the genomes of rice and Triticeae. *Nucleic Acids Res.*, 23(14) : 2724-2728.

Foot T., Roberts M., Kurata N., Sasaki T. and Moore G., 1997. Detailed comparative mapping of cereal chromosome regions corresponding to the *Ph1* locus in Wheat. *Genetics*, 147: 801-807.

Gallego F., Feuillet C., Messner M., Penger A., Graner A., Yano M., Sasaki T. and Keller B., 1998. Comparative mapping of the two wheat leaf rust resistance loci Lr1 and Lr10 in rice and barley. *Genome*, 41: 328-336

Glaszmann J.C., Dufour P., Grivet L., D'Hont A., Deu M., Paulet F. and Hamon P., 1997. Comparative genome analysis between several tropical grasses. *Euphytica*, 96: 13-21.

Goettlieb L.D., 1982. Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science*, 216 : 373-380.

Grivet L., D'Hont A., Dufour P., Hamon P., Roques D. and Glaszmann J. C., 1994. Comparative genome mapping of sugarcane with other species within the Andropogoneae Tribe. *Heredity*, 73: 500-508.

Grivet L., D'Hont A., Roques D., Feldmann P., Lanaud C. and Glaszmann J. C., 1996. RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp.): genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. *Genetics*, 142: 987-1000.

Guimaraes C.T., Sills G.R. and Sobral B.W., 1997. Comparative mapping of Andropogoneae: *Saccharum* L. (sugarcane) and its relation to sorghum and maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 14261-14266.

Heredia D. O., Gardiner J., Hoisington D., Chao S. M., Coe E., Musket T. and Xu G. L., 1994. Combined f2 and if2 RFLP map. *Maize Genetics Cooperation News Letter*, 68: 30-35.

Hoisington D.A. and Coe E.H., 1990. Mapping in maize using RFLP's. In, *Gene manipulation in plant improvement*, edited by J. P. Gustafson. Plenum Press, New York. pp 331-351.

Hoisington D., 1992. Laboratory protocols. CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Mexico, D.F. CIMMYT.

Hulbert S.C., Richter T.E., Axtell J.D. and Bennetzen J.L., 1990. Genetic mapping and characterization of sorghum and related crops by means of maize DNA probes. *Genetics*, 87: 4251-4255.

Kilian A., Kudrna D. A., Kleinhofs A., Yano M., Kurata N., Steffenson B. and Sasaki T., 1995. Rice-barley synteny and its application to saturation mapping of the barley Rpg1 region. *Nucleic Acids Res.*, 23(14): 2729-2733.

Kurata N., Nagamura Y., Yamamoto K., Harushima Y., Sue N., Wu J., Antonio B.A., Shomura A., Shimizu T., Lin S.Y., Inoue T., Fukuda A., Shimano T., Kuboki Y., Toyama T., Miyamoto Y., Kirihara T., Hayasaka K., Miyao A., Monna L., Zhong H.S., Tamura Y., Wang Z.X., Monna T., Umehara Y., Yano M., Sasaki T. and Minobe Y., 1994. A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nature Genetics*, 8: 365-372.

Lander E., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J. *et al.*, 1987. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1: 174-181.

Lin Y.R., Schertz K.F. and Paterson A.H., 1995. Comparative analysis of QTLs affecting plant height and maturity across the Poaceae, in reference to an interspecific sorghum population. *Genetics*, 141: 391-411.

Melake-Berhan A., Hulbert S.H., Butler L.G. and Bennetzen J.L., 1993. Structure and evolution of the genome of *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *Theor. Appl. Genet.*, 86: 598-604.

Ming R., Liu S.C., Lin Y.R., Da Silva J., Wilson W., Braga D., Van Deynze A., Wenslaff T.F., Wu K.K., Moore P.H., Burnquist W., Sorrells M.E., Irvine J.E. and Paterson A.H., 1998. Detailed alignment of *Saccharum* and sorghum chromosomes: comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. *Genetics*, 150: 1663-1682.

Pereira M.G., Lee M., Bramel-Cox P., Woodman W., Doebley J. and Whitkus, 1994. Construction of an RFLP map in sorghum and comparative mapping in maize. *Genome*, 37: 236-243.

Tai P.Y.P., Miller J.D. and Dean J.L., 1981. Inheritance of resistance to rust in sugarcane. *Field Crop Res.*, 4: 261-268.

Tomkins J.P., Yu Y., Miller-Smith H., Frisch D.A., Woo S.S. and Wing R., 1999. A bacterial artificial chromosome library for sugarcane. *Theor. Appl. Genet.*, 99: 419-424.

Van Deynze A.E., Nelson J.C., Yglesias E.S., Harrington S.E., Braga D.P., McCouch S.R. and Sorrells M.E., 1995. Comparative mapping in grasses. Wheat relationships. *Mol. Gen. Genet.*, 248: 744-754.

Whitkus R., Doebley J. and Lee M., 1992. Comparative genome mapping of sorghum and maize. *Genetics*, 132: 1119-1130.

Xu G.W., Magill C.W., Schertz K.F. and Hart G.E., 1994. A RFLP linkage map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Theor. Appl. Genet.*, 89: 139-145.

Zhang H.B. and Wing R.A., 1997. Physical mapping of the rice genome with BACs. Plant Mol. Biol., 35: 115-127.

COMPLEMENT D'INFORMATION

L'existence de gènes de résistance orthologues ayant été observée entre espèces apparentées (Van Deynze *et al.*, 1995a et 1995b ; Paterson *et al.*, 1995 ; Lin *et al.*, 1995 ; Pereira et Lee, 1995), nous avons tenté d'établir des relations d'orthologie entre le gène de résistance à la rouille identifié chez R570 et les facteurs génétiques de la résistance à cette maladie chez le sorgho, le maïs et le riz. La cartographie des gènes de résistance à la rouille est peu ou pas développée chez le riz et le sorgho. En revanche, l'interaction maïs-*P. sorghi* a été largement étudiée et 24 spécificités de résistance ont été localisés dans trois régions du génome du maïs, sur les chromosomes 3, 4 et 10. Même si le groupe de liaison VII de la canne est homéologue à un segment du chromosome 4 du maïs, le gène de résistance *Rp4* cartographié sur ce chromosome est situé à l'autre extrémité par rapport à la position du gène de résistance cartographié chez R570 et aucun locus orthologue n'a pu être identifié.

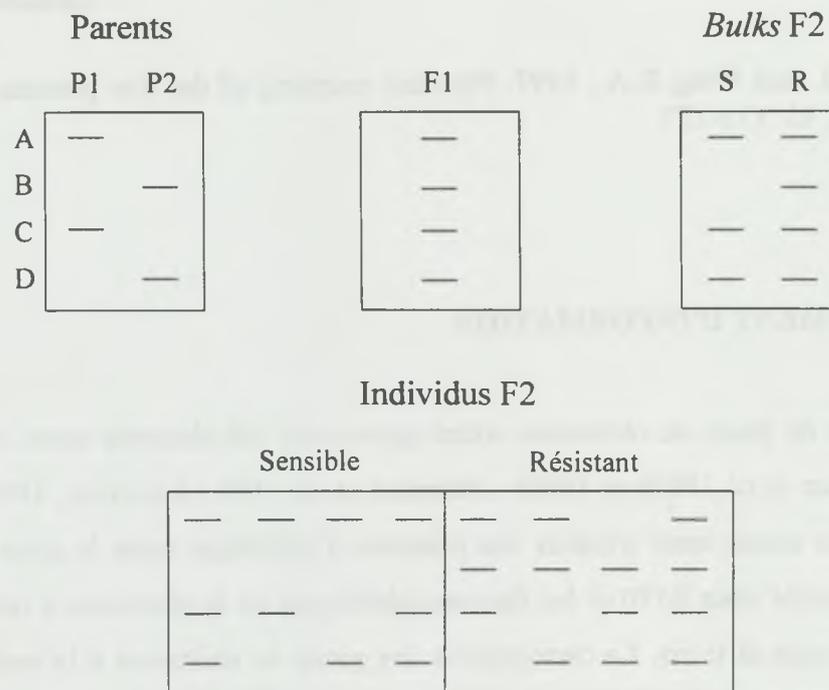


Figure 22 : Bases génétiques de l'analyse de ségrégation en mélange. A, B, C et D sont quatre locus AFLP détectés chez les parents P1 et P2, dans les descendances F1 et F2 et dans les *bulks* d'individus F2 sensibles (S) et résistants (R). L'allèle dominant au locus B est lié en couplage avec l'allèle qui contrôle la résistance et il apparaît polymorphe entre les *bulks* S et R. En revanche, les trois autres allèles ne sont pas liés à l'allèle qui contrôle la résistance et sont monomorphes entre les *bulks* (d'après Michelmore *et al.*, 1991).

Tableau III.2. Détection de marqueurs liés à un gène par analyse de ségrégation en mélange, en fonction du type de descendance utilisé. R et r représentent les allèles dominant et récessif, respectivement, du locus étudié et 0 et 1 représentent l'absence et la présence de bande, respectivement, pour un locus marqueur dominant totalement lié au gène. Les phénotypes des pools obtenus pour chaque type de descendance sont indiqués entre crochets (d'après de Vienne, 1998).

Descendance	Phase		
	Couplage	Répulsion	Marqueurs informatifs
F1 (génotypes)	$\frac{R1}{r0}$	$\frac{R0}{r1}$	-
Haploïdes doublés	[R1] et [r0]	[R0] et [r0]	tous
Backcross ⁽¹⁾	[R1] et [r0]	[R1] et [r1]	marqueurs en couplage
F2	[R1] et [r0]	[R1] ⁽²⁾ et [r1]	marqueurs en couplage
Lignées recombinantes	[R1] et [r0]	[R0] et [r0]	tous

(1) le rétrocroisement est fait sur le parent homozygote récessif pour le gène étudié.

(2) ce mélange est hétérogène puisqu'il est constitué pour deux tiers d'individus [R1] et pour un tiers d'individus [R0].

B. ANALYSE DE SEGREGATION EN MELANGE AU MOYEN DE MARQUEURS AFLP

Ce travail a été réalisé avec la participation de Claudia Kaye (chercheur post-doctorant) et Sandrine Ruffel (stagiaire DESS).

L'exploitation de la synténie entre la canne à sucre, le sorgho, le maïs et le riz a permis d'ajouter des marqueurs sur le groupe de coségrégation qui porte le gène de résistance à la rouille et de le rattacher au groupe de liaison VII de la carte génétique du cultivar R570 (Asnaghi *et al.*, soumis). Le gène apparaît en position terminale, et le marqueur RFLP le plus proche est cartographié à 7 cM environ. Une seconde approche, basée sur l'utilisation de l'analyse de ségrégation en mélange ou "*Bulked Segregant Analysis*" (BSA), associée aux marqueurs AFLP ("*Amplified Fragment Length Polymorphism*") a été mise en œuvre pour saturer les régions flanquantes du gène de résistance.

La BSA, décrite par Michelmore (1991), est une méthode simple et rapide qui permet d'identifier des marqueurs moléculaires liés à un gène majeur. Elle consiste à comparer des mélanges (*bulks*) d'ADN constitués d'individus dont le phénotype est identique pour un caractère donné (par exemple résistant ou sensible à la rouille) mais aléatoire pour les autres caractères. Les marqueurs polymorphes entre ces *bulks* sont potentiellement liés au gène qui détermine le caractère utilisé pour construire les *bulks* (figure 22). La probabilité d'identifier des marqueurs liés à un gène avec cette méthode dépend de plusieurs facteurs :

- le taux de recombinaison entre le gène ciblé et le marqueur. Plus le marqueur est loin du gène plus la probabilité de détecter ce marqueur avec la BSA diminue.
- la taille des *bulks*. La probabilité de détecter des faux positifs entre les *bulks* (marqueurs polymorphes entre les *bulks* indépendants du locus ciblé) dépend du nombre d'individus par *bulk*. Les marqueurs multiplex ségrègent peu dans la descendance (cf. chapitre I, paragraphe A.3.1.) et nous considérerons qu'ils sont négligeables dans l'estimation de ce paramètre. Si l'on considère une population F₂, des marqueurs simplex et dominants et si n est le nombre d'individus par *bulk*, la probabilité P de détecter des faux positifs est de (voir annexe 3) :

$$P = 2 \left(\frac{1}{4} \right)^n \left[1 - \left(\frac{1}{4} \right)^n \right]$$

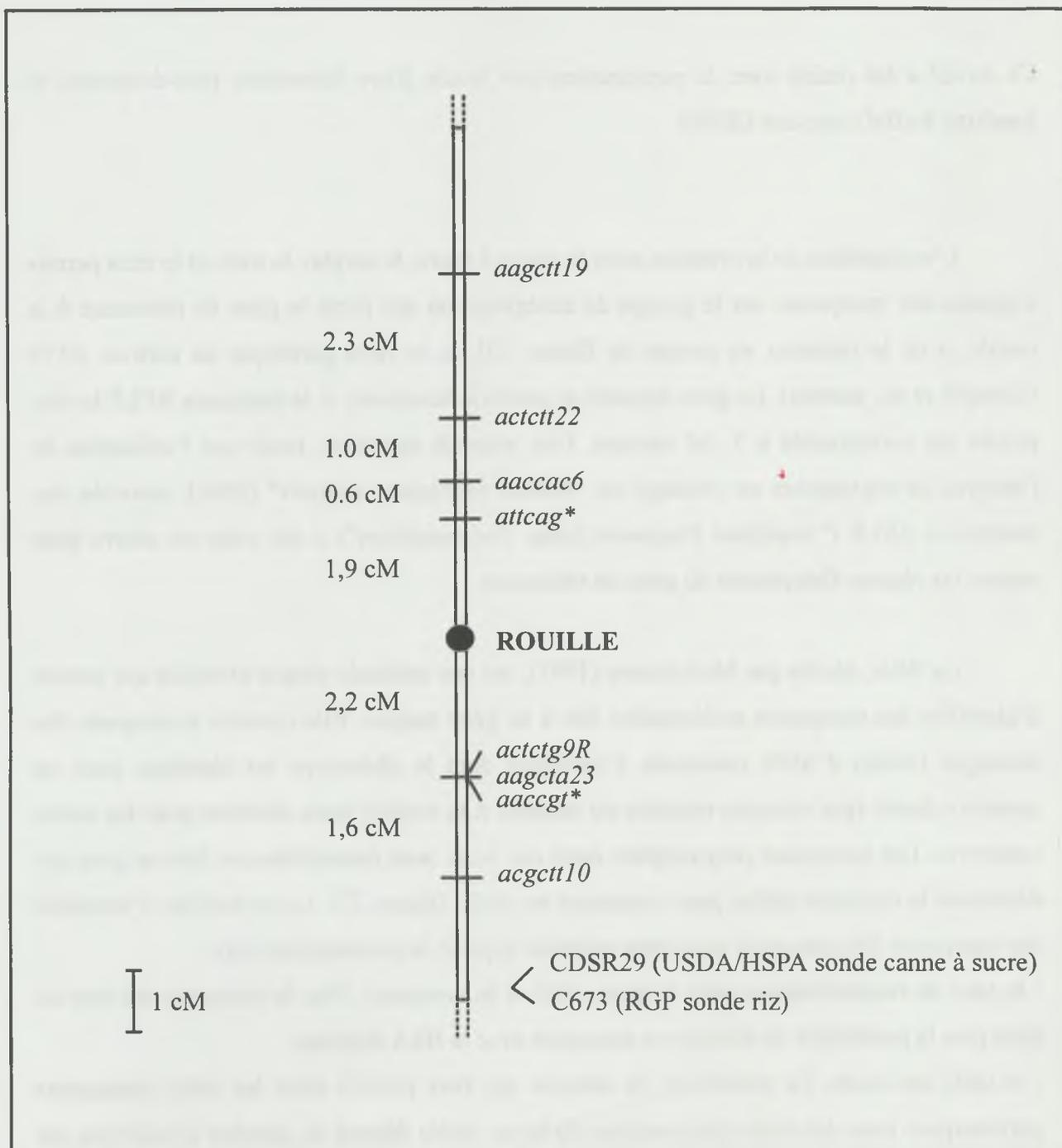


Figure 23 : Carte génétique des régions flanquantes du gène de résistance à la rouille chez R570. Les marqueurs écrits en italique sont des marqueurs AFLP et les autres sont des marqueurs RFLP. Les distances entre les marqueurs AFLP ont été calculées à partir des données de ségrégation de 295 individus (* marqueurs cartographiés à partir des données de ségrégation de 26 individus recombinants uniquement) et avec la fonction de cartographie de Haldane. Les marqueurs RFLP ont été analysés sur une autre population.

Pour $n = 5$, la probabilité d'avoir des marqueurs polymorphes entre les *bulks* bien qu'ils soient indépendants du gène ciblé est d'environ 1,9 %.

- le type de descendance utilisée. Lorsque les marqueurs et le gène sont caractérisés par des locus dominants, les marqueurs liés en répulsion ne sont pas détectables par la méthode d'analyse de ségrégation en mélange si les individus qui constituent les *bulks* sont issus d'une descendance F2 ou d'un *backcross* (tableau III.2.).

- le type de marqueurs (dominant ou codominant). Les marqueurs codominants permettent de différencier les différentes formes alléliques d'un locus et de déceler l'éventuelle présence de recombinants parmi les individus utilisés.

La BSA est généralement associée à des techniques de marquage basées sur la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) telles que les RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) ou les AFLP qui permettent de générer un grand nombre de marqueurs rapidement.

La réalité de la liaison est ensuite vérifiée sur une population en ségrégation ; ceci permet de préciser, le cas échéant, la position et la distance des marqueurs par rapport au gène cible.

L'analyse de ségrégation en mélange a été utilisée avec succès pour identifier des marqueurs proches de gènes de résistance dans de nombreuses espèces telles que l'orge (Lahaye *et al.*, 1998 ; Simons *et al.*, 1998), le riz (Chen *et al.*, 1999), la tomate (Chagué *et al.*, 1996), la pomme de terre (Ballvora *et al.*, 1995 ; Meksem *et al.*, 1995), la laitue (Michelmore, 1991), la betterave à sucre (Halldén *et al.*, 1997) ou le peuplier (Cervera *et al.*, 1996).

Dans le cadre de travaux préliminaires de mise au point de la technique AFLP sur la canne à sucre, un marqueur AFLP (actctg9R) lié au gène de résistance à la rouille a été identifié par BSA (Elias, rapport de DEA, 1996), il est cartographié à 2,2 cM du gène (figure 23). Par ailleurs, quatre marqueurs AFLP supplémentaires (aagctt19, aaccac6, aagcta23 et acgctt10) ont été cartographiés à proximité du gène de résistance à la rouille lors de la construction d'une carte génétique AFLP du cultivar R570 utilisée dans le cadre d'une étude sur le déterminisme génétique des composantes du rendement (Hoarau *et al.*, en préparation). Cette carte est basée sur les données de ségrégation de 892 marqueurs simplex révélés par 37 couples d'amorces et analysés sur 295 individus issus de l'autofécondation de R570. Les quatre marqueurs liés au gène de résistance à la rouille sont répartis de part et d'autre du gène, les plus proches, aagcta23 et aaccac6, sont situés à 2,2 et 2,5 cM du gène, respectivement (figure 23).

Dans la présente étude, nous avons analysé de nouvelles combinaisons d'amorces AFLP sur des *bulks* composés d'individus sensibles et résistants, afin d'identifier de nouveaux marqueurs étroitement liés au gène de résistance à la rouille de la canne à sucre.

B.1. Matériel et Méthode

B.1.1. Matériel végétal

Les populations de cartographie utilisées pour l'établissement des cartes génétiques RFLP (Grivet *et al.*, 1996) et AFLP (Hoarau *et al.*, en préparation) du cultivar R570 sont deux sous-ensembles de 77 et 295 individus, respectivement, issus de l'autofécondation de R570. Les *bulks* ont été constitués à partir d'individus appartenant à ces deux sous-populations.

B.1.2. Evaluation de la résistance à la rouille

Les dispositifs expérimentaux utilisés pour l'évaluation du degré de résistance de la descendance étudiée sont détaillés dans le paragraphe A.2. de ce troisième chapitre. Les méthodes d'évaluation sont décrites par Daugrois *et al.* (1996).

B.1.3. Protocole AFLP

L'ADN génomique a été extrait selon le protocole décrit par Hoisington *et al.* (1992). Les analyses moléculaires AFLP (Vos *et al.*, 1995) ont été réalisées avec le kit Gibco BRL génome I en utilisant les amorces de ce kit ainsi que des amorces supplémentaires que nous avons défini. Chaque *bulk* est composé d'un mélange de 10 ng d'ADN de cinq individus et est traité comme un seul individu dans les différentes étapes du protocole AFLP qui a été utilisé avec quelques modifications par rapport au protocole recommandé par le fabricant. Les produits de préamplification sont deux fois moins dilués (1:25 au lieu de 1:50). L'électrophorèse (60 W pendant deux heures environ) est effectuée à partir de 6µl de chaque amplification et sur gel (31 x 38,5 cm) de polyacrylamide à 5% (20:1 acrylamide:bisacrylamide, urée 7M et tampon TBE 1X). Après migration, les gels sont séchés à 80°C pendant 20 minutes.

Le nom des marqueurs comporte six lettres. Les trois premières lettres correspondent aux nucléotides sélectifs du site *EcoRI* et les trois autres aux nucléotides sélectifs du site *MseI*. Certains marqueurs ont également un chiffre qui correspond à un numéro de bande attribué lors de la lecture des autoradiographies.

Les marqueurs moléculaires exploitables pour la cartographie génétique chez la canne à sucre sont des marqueurs en copie unique dans le génome des clones analysés et sont représentés par des bandes de faibles intensités. Nous avons utilisé des films Kodak Biomax X-ray dont la sensibilité permet de révéler les bandes faibles plus rapidement et avec une meilleure qualité de signal.

B.1.4. Hybridation Southern

Le protocole d'hybridation *Southern* sur la canne à sucre est décrit dans le paragraphe A.2. de ce troisième chapitre.

B.1.5. Cartographie des marqueurs potentiellement liés au gène ciblé

Chaque bande est codée comme un marqueur dominant, c'est-à-dire en présence/absence. L'ordre et les distances entre marqueurs ont été calculés à l'aide du logiciel Mapmaker 3.0 (Lander *et al.* 1987) selon les paramètres définis par Grivet *et al.* (1996). Les marqueurs ont été assemblés en groupes de coségrégation par une analyse deux points avec un LOD score de 5. L'ordre des marqueurs d'un groupe de coségrégation a été défini par une analyse multipoint et accepté lorsque le LOD associé aux deuxième ordre le plus probable avait une valeur inférieure à -1 (c'est-à-dire que le deuxième ordre était, au moins, 10 fois moins probable que le premier).

B.2. Résultats et Discussion

Les cinq marqueurs AFLP (actctg9R, aagctt19, aaccac6, aagcta23 et acgctt10) identifiés lors des travaux précédents ont été analysés sur la sous-population composée de 295 individus issus de l'autofécondation de R570. Vingt six individus recombinants ont été identifiés et sont utilisés dans la présente étude, d'une part pour établir un *bulk* composée

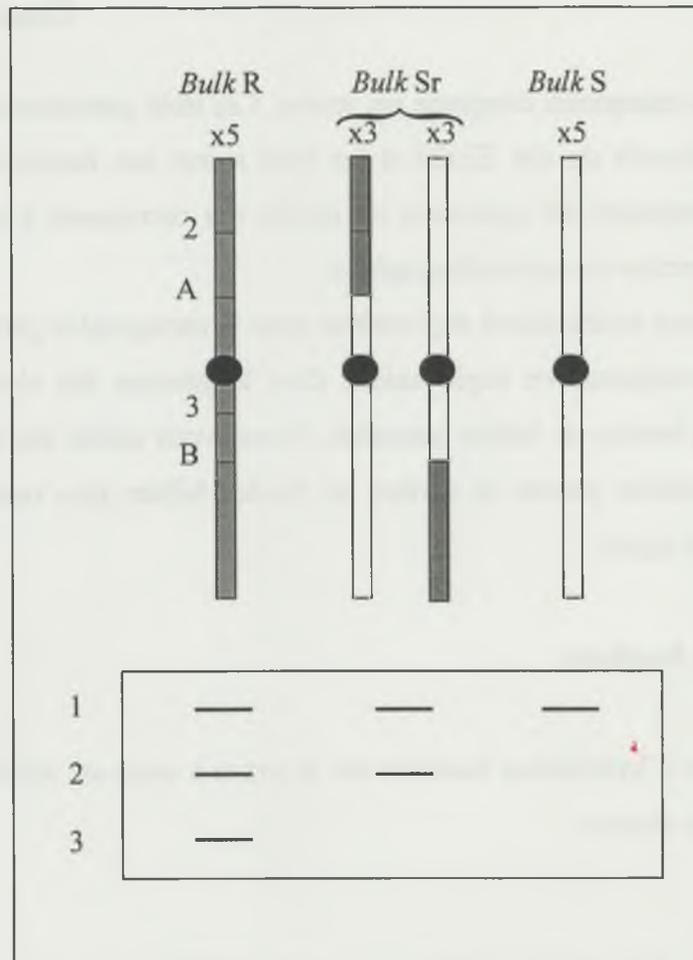


Figure 24 : Principe de l'utilisation d'un *bulk* constitué d'individus sensibles recombinants (Sr) pour des marqueurs (A et B) situés de part et d'autre du gène ciblé. Le marqueur 1 n'est pas lié au gène ciblé, il est présent dans tous les *bulks*. Le marqueur 2 est lié au gène ciblé mais il se trouve en dehors de l'intervalle formé par les marqueurs A et B, il est présent dans les *bulks* R et Sr et absent dans le *bulk* S. Le marqueur 3 est lié au gène ciblé et se trouve entre le marqueur B et le gène ciblé, il est présent uniquement dans le *bulk* R.

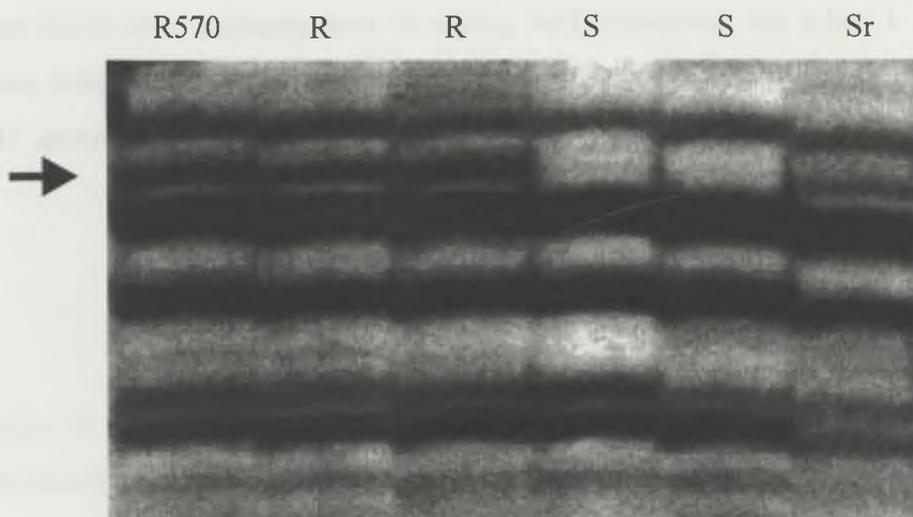


Figure 25 : Exemple de repérage d'un marqueur AFLP lié au gène de résistance par analyse de différents *bulks*. (R) *bulk* composé d'individus résistants, (S) sensibles, (Sr) sensibles recombinants (Sr). Les *bulks* sont constitués de cinq individus, excepté, le *bulk* Sr qui est composé de six individus dont trois sont recombinants pour le marqueur *aaccac6* et trois pour *actctg9R*. La flèche indique le marqueur *actctg9R* qui coségrège avec la résistance à la rouille chez R570.

d'individus recombinants, et d'autre part, pour cartographier les marqueurs proches du gène de résistance. L'utilisation d'un *bulk* composé d'ADN d'individus recombinants pour l'intervalle compris entre *aaccac6* et *actctg9R* permet de cibler précisément le voisinage immédiat du gène (figure 24). Les marqueurs identifiés comme étant potentiellement liés au gène de résistance à la rouille avec la BSA (*i.e.* présent dans le *bulk* des individus résistants et absent du *bulk* des individus sensibles) sont, dans un premier temps, analysés sur 10 individus sensibles et 10 résistants de la population issue de l'autofécondation de R570 afin de vérifier la liaison. Si la liaison est confirmée, ces marqueurs sont analysés sur les 26 individus recombinants. Les données de ségrégation nous indiqueront si (i) le locus du nouveau marqueur est situé à l'extérieur de l'intervalle défini par *actctg9R* et *acgctt10*. Dans ce cas, il sera nécessaire d'analyser le nouveau marqueur sur la population entière pour le cartographier. (ii) le locus du nouveau marqueur est situé à l'intérieur de l'intervalle défini par *actctg9R* et *acgctt10*, dans ce cas seuls les individus recombinants seront informatifs pour la cartographie.

Chaque couple d'amorces est analysé sur cinq *bulks* d'ADN ainsi que sur R570. Ces cinq *bulks* comprennent deux *bulks* de cinq individus sensibles, deux *bulks* de cinq individus résistants et un *bulk* de six individus sensibles recombinants pour les deux marqueurs AFLP les plus proches du gène préalablement identifiés (trois individus recombinants pour chacun des deux marqueurs *aaccac6* et *actctg9R*). Chacun des cinq *bulks* a été analysé avec les cinq marqueurs liés au gène de résistance à la rouille (figure 25) afin de vérifier la validité de la composition des *bulks*.

Le kit compte 8 amorces pour chaque enzyme de restriction *EcoRI* et *MseI*, ce qui permet de générer 64 combinaisons d'amorces différentes. Trente sept combinaisons d'amorces avaient déjà été analysées, sur les sous-populations de descendants issus de l'autofécondation de R570, dans des études antérieures (Elias, 1996 ; Hoarau *et al.*, en préparation). Les 27 combinaisons restantes ont été analysées sur les cinq *bulks* ainsi que sur R570 (tableau III.3.). L'un des couples d'amorces a révélé un marqueur, *actctt22*, lié au gène de résistance à la rouille. L'analyse des données de ségrégation de ce marqueur sur les 26 recombinants indique qu'il est localisé à 3,5 cM du gène dans la partie distale du groupe de coségrégation dépourvue de marqueurs RFLP (figure 23).

Le succès de la BSA repose sur le nombre de marqueurs utilisé pour cribler les mélanges d'individus. De nouvelles amorces AFLP ont donc été développées afin

Tableau III.3. Résultats du criblage des amorces AFLP sur les bulks d'individus résistants (R) et sensibles (S).

Type et d'amorces	Nombre de combinaisons testées avec BSA	Nombre de profils de qualité	Nombre de marqueurs polymorphes entre bulks R et S	Nombre de marqueurs liés au gène de résistance
<i>EcoRI</i> -A+2 / <i>MseI</i> -C+2 (Kit Gibco BRL®)	27 (37*)	27	2	1
<i>EcoRI</i> -A+2 / <i>MseI</i> -C+2	170	146	16	2
<i>EcoRI</i> -G+2 / <i>MseI</i> -C+2	17	13	1	-
<i>PstI</i> -A+2 / <i>MseI</i> -C+2	192	110	16	-
Total	406	296	35	3

* les 37 autres amorces du kit ont été testées par BSA ou directement cartographiées lors d'études antérieures

d'augmenter le nombre de combinaisons d'amorces par rapport au kit AFLP commercial. Plusieurs types de modifications permettent de générer de nouvelles amorces : (i) modification des deux derniers nucléotides des amorces d'amplification (ii) modification du dernier nucléotide des amorces de préamplification (ceci a permis de générer de nouvelles amorces d'amplification de type *EcoRI*-G). (iii) modification des enzymes de restriction, une nouvelle enzyme *PstI* a été utilisée et 16 nouvelles amorces d'amplification développées (*PstI*-A). Globalement, nous disposons de 16, 16 et 19 amorces *MseI*, *PstI* et *EcoRI*, respectivement, permettant de générer 864 combinaisons d'amorces. Les nouvelles amorces ont été commandées auprès de différents fournisseurs et purifiées selon plusieurs méthodes (PAGE, *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* et HPLC, *High Pressure Liquid Chromatography*).

Les amorces que nous avons fait synthétiser en supplément du kit ont posé d'importants problèmes. En effet, de nombreuses amorces se sont avérées inutilisables en raison de la mauvaise qualité du profil AFLP obtenu. Ces profils sont caractérisés soit par une absence quasi totale de bandes soit par une absence de bandes de faible intensité qui correspondent aux marqueurs simplex que nous recherchons. La vérification systématique de la qualité des profils obtenus avec différents lots d'amorces a révélé, dans la majorité des cas, plusieurs amorces défectueuses quel que soit le fournisseur (Eurogentec, Eurobio et Genesys).

La modification des deux derniers nucléotides des amorces a permis de générer huit amorces supplémentaires pour chaque enzyme de restriction *EcoRI* et *MseI*, soit 192 nouvelles combinaisons d'amorces. Au total, 170 combinaisons d'amorces ont été analysées sur les *bulks*, et 24 ont produit un profil de mauvaise qualité (tableau III.3.). Parmi les 146 profils exploitables, 16 marqueurs potentiellement liés au gène de résistance à la rouille ont été détectés. Ces marqueurs ont été analysés sur 10 individus sensibles et 10 résistants afin de confirmer la liaison avec le gène étudié et deux marqueurs sur les seize (*attcag* et *aaccgt*) se sont avérés effectivement lié au gène de résistance. Ces deux marqueurs ont été cartographiés, sur les 26 individus recombinants, à 1,9 et 2,2 cM de part et d'autre du gène de résistance (figure 23).

Parmi les nouvelles combinaisons d'amorces générées par modification du dernier nucléotide des amorces de préamplification (*EcoRI*-G), 17 couples ont été testés et 13 ont produit un profil AFLP exploitable (tableau III.3.). Un marqueur polymorphe entre les *bulks*

Tableau III.4. Données de ségrégation des huit marqueurs AFLP encadrant le gène de résistance à la rouille sur 26 individus recombinants issus de l'autofécondation de R570. 1 marqueur présent et 0 marqueur absent.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
aagctt19	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
actctt22	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
aaccac6	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1
attcag	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
Rouille	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0
actcg9r	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
aagcta23	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
aaccgt	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	-	1	-	0	0	0	0	-
acgctt10	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0

sensibles et résistants a été détecté, mais après vérification, ce marqueur s'est révélé indépendant du gène de résistance à la rouille.

Seize amorces *PstI*-A ont été combinées avec 12 amorces *MseI*-C. L'ensemble des 192 combinaisons possibles a été testé sur les *bulks* et l'examen de 110 profils de bonne qualité a permis de détecter 16 marqueurs potentiellement liés au gène de résistance (tableau III.3.). Ces marqueurs ont été analysés sur un échantillon de la descendance mais aucune liaison avec le gène n'a été confirmée.

Au total, 406 couples d'amorces (*EcoRI*+2 / *MseI*+3 et *PstI*+2 / *MseI*+2) (annexe 4) ont été testés sur les cinq *bulks* d'individus et 296 ont produit un profil AFLP de bonne qualité (bandes de faible intensité lisibles). Sur l'ensemble des profils exploitables, 35 marqueurs étaient absents dans les *bulks* sensibles et présents dans les *bulks* résistants. Après vérification de la ségrégation de ces marqueurs sur un échantillon de 10 individus sensibles et 10 résistants, trois d'entre eux se sont avérés liés au gène de résistance à la rouille. Le taux de faux positifs révélé dans cette étude est considérable comparé aux 1,9 ‰ attendus et représente certainement l'une des conséquences de la qualité des amorces. Il est probable que la mauvaise qualité des profils soit directement liée au pourcentage de conformité des amorces (c'est-à-dire le pourcentage d'amorces correspondant à la séquence commandée sur la totalité des fragments synthétisés), qui détermine leur "pouvoir d'amplification". Ce phénomène a d'autant plus d'impact chez la canne à sucre que nous recherchons des marqueurs simplex qui sont dilués compte tenu du niveau de ploïdie. Les problèmes de qualité des amorces ont engendré de nombreuses analyses supplémentaires qui ont eu des répercussions sur le nombre total de couples d'amorces testés et sur le nombre de marqueurs candidats identifiés.

Le gène de résistance à la rouille est maintenant encadré par huit marqueurs AFLP dans un intervalle de 9,8 cM (figure 23 et tableau III.4.). Les marqueurs les plus proches du gène ciblé sont localisés de part et d'autre du gène à 1,9 et 2,2 cM.

C. CARTOGRAPHIE COMPAREE ENTRE LA CANNE A SUCRE, LE SORGHO ET LE RIZ DANS LA REGION SITUEE AU DESSUS DU GENE DE RESISTANCE CHEZ R570

L'utilisation de la BSA associée aux marqueurs AFLP nous a permis de cartographier des marqueurs de part et d'autre du gène ciblé dont quatre définissent une zone distale de 5,8 cM au-dessus du gène (figure 23). L'un de ces marqueurs, aacac6 (cartographié à 2,5 cM du gène de résistance), a été cloné puis analysé sur le sorgho ainsi que sur le riz afin d'affiner la comparaison entre la canne à sucre, le sorgho et le riz dans cette région et de confirmer que la position terminale du gène est effectivement à l'origine de l'absence de marqueurs RFLP d'un côté du gène.

C.1. Matériel et Méthode

C.1.1. Matériel végétal

La population de sorgho utilisée pour cartographier le marqueur AFLP cloné a été décrite par Dufour *et al.* (1996). Cette population est constituée de 110 lignées recombinantes dérivées du croisement IS2807 x 379.

Les deux cultivars de riz, IR64 et Azucena, utilisés sont les parents d'une descendance d'haploïdes doublés utilisée comme population de cartographie dans le projet EGRAM auquel le Cirad participe.

C.1.2. Clonage d'un marqueur AFLP puis identification et sous-clonage de clones BAC contenant ce marqueur

La bande correspondant au marqueur à cloner est prélevée directement sur le gel de polyacrylamide, puis le fragment de gel est placé dans 7 à 10 µl d'eau ultrapure. Après 4 à 12 heures, 10 µl du mélange d'eau et d'ADN sont amplifiés par PCR avec les amorces du kit qui ont permis de révéler ce marqueur. Le produit d'amplification est ligué au plasmide pGEM[®]-t (Promega) puis des bactéries DH5-α compétentes sont transformées avec le plasmide ligué

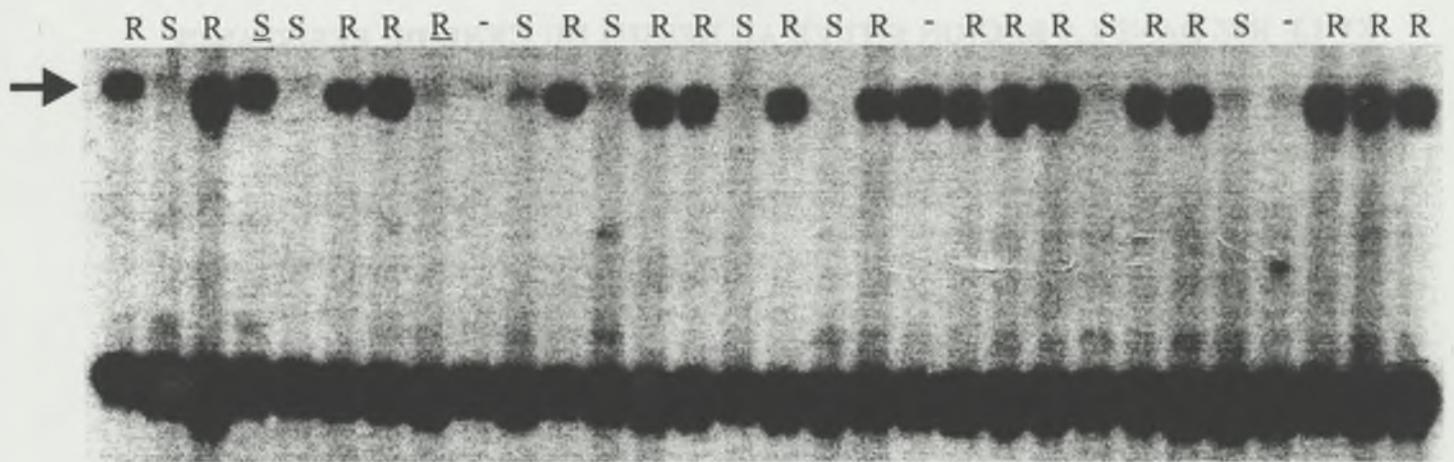


Figure 26 : Hybridation *Southern* du marqueur *aaccac6* cloné sur 30 individus issus de l'autofécondation du cultivar R570. Les lettres R et S correspondent à résistant et sensible à la rouille (*Puccinia melanocephala*) et - signifie que la donnée est manquante. La flèche indique le marqueur qui ségrège avec la résistance à la rouille. Les individus recombinants pour ce marqueur sont soulignés.

par la méthode des chocs thermique (Maniatis *et al.*, 1989). Les bactéries transformées ont été sélectionnées sur un milieu contenant de l'ampicilline.

L'hybridation du marqueur cloné sur la banque BAC de canne à sucre, développée à partir du cultivar R570 (Tomkins *et al.*, 1999), a permis d'identifier les clones BAC qui contiennent ce marqueur. Ces clones BAC ont été sous-clonés par double digestion avec les enzymes de restriction *Hind*III et *Bam*HI, ligation avec le plasmide pUC19 puis transformation de bactéries DH5- α compétentes avec les plasmides ligués.

C.1.3. Hybridation Southern sur le sorgho et sur le riz

Les protocoles d'hybridation *Southern* sur le sorgho et la description des membranes sont détaillés dans le paragraphe A.2. de ce troisième chapitre. Les mêmes conditions expérimentales ont été appliquées pour l'hybridation *Southern* sur le riz. Les membranes utilisées comportent l'ADN des deux cultivars IR64 et Azucena digérés par 11 enzymes de restriction (*Bam*HI, *Bgl*II, *Dra*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sca*I et *Xba*I).

C.2. Résultats et Discussion

Le marqueur AFLP aaccac6 cartographié au dessus du gène de résistance a été cloné, nous nommerons ce marqueur RFLP6. L'identité du fragment cloné a été confirmée par (i) une analyse AFLP, en incluant le fragment d'ADN cloné à l'ADN d'un individu sensible et en comparant le niveau de bande obtenu avec le niveau du marqueur chez un individu résistant, et par (ii) hybridation *Southern* sur 88 individus issus de la descendance autofécondée de R570 (figure 26). Le marqueur a également été séquencé (il a une taille de 395 pb).

Les tentatives d'hybridation *Southern* de ce marqueur sur le sorgho et sur le riz n'ont pas produit des résultats satisfaisants. En effet, l'intensité des bandes était trop faible chez le sorgho et les bandes étaient illisibles chez le riz.

Nous avons alors cherché à identifier un clone BAC qui contienne ce marqueur, de façon à pouvoir utiliser les sous-clones de ce BAC comme sonde RFLP pour les cartographier sur le sorgho et sur le riz. La banque BAC de canne à sucre, réalisée à partir du cultivar R570

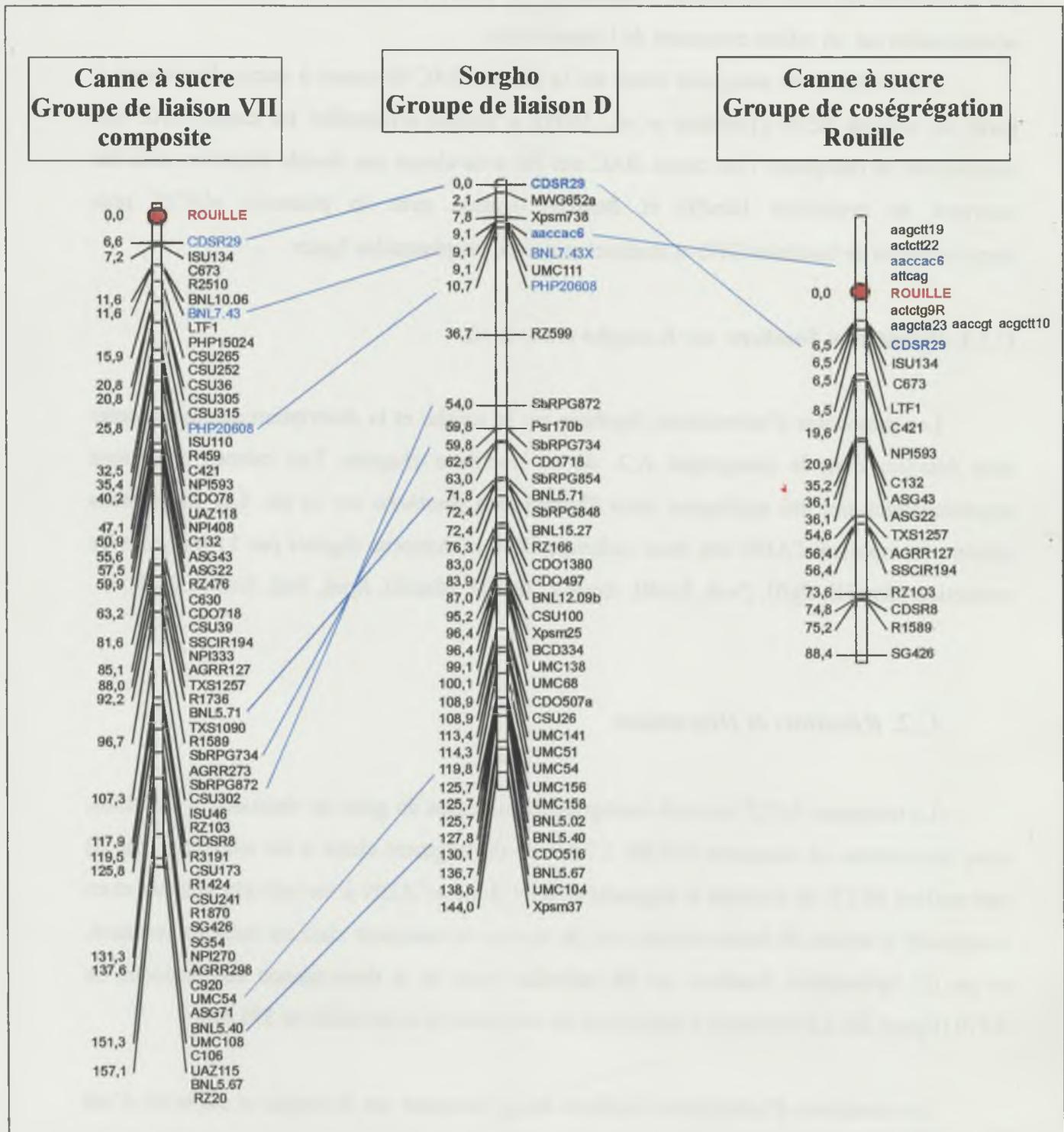


Figure 27 : Cartographie du marqueur aaccac6 cloné sur le groupe de liaison D du sorgho et comparaison avec la canne à sucre. Le groupe de liaison D du sorgho est décrit par Boivin *et al.* (1999). Le groupe de liaison composite VII et le groupe de coségrégation de la canne à sucre sont décrits au chapitre II paragraphe A.2. La position des locus est indiquée par un trait sauf pour les marqueurs dont la position est incertaine. Les locus homéologues dans la région ciblée du gène de résistance à la rouille sont représentés en bleu.

(Tomkins *et al.*, 1999), a été criblée avec RFLP6. Vingt deux clones BAC contenant le locus du marqueur ont été identifiés. L'analyse de ces clones avec les amorces qui révèlent le marqueur aaccac6 a permis d'identifier deux clones qui contiennent ce marqueur. La comparaison des profils de restriction de ces clones BAC montre qu'ils se chevauchent. Les deux BAC ont été sous-clonés et quatre fragments dont la taille avoisinait 1 kpb ont été sélectionnés aléatoirement et hybridés séparément sur le riz et sur le sorgho. Aucun des sous-clones testé sur le riz n'a permis d'obtenir un profil utilisable en cartographie. En revanche, l'un des sous-clones a pu être cartographié sur le groupe de liaison D du sorgho (carte de Boivin *et al.*, 1999). Le marqueur RFLP6 est situé, chez le sorgho, à environ 9 cM en dessous du marqueur révélé par la sonde de canne à sucre CDSR29 (figure 27). Ce locus respecte donc la synténie entre la canne à sucre et le sorgho mais il n'est pas colinéaire par rapport à sa position chez R570. Notons que le marqueur révélé par la sonde BNL7.43, qui coségrège avec RFLP6 chez le sorgho, respecte la colinéarité avec la canne à sucre (BNL7.43 est cartographié sur le groupe de liaison VII composite de R570). De la même façon, le marqueur révélé par la sonde PHP20608, cartographié à proximité de RFLP6 chez le sorgho, respecte la colinéarité entre les deux génomes. La synténie semble donc conservée entre la canne à sucre et le sorgho dans la région ciblée et la rupture de colinéarité observée pour le marqueur RFLP6 est probablement due à un remaniement ponctuel. Le clonage et la cartographie sur le sorgho des trois autres marqueurs AFLP distaux (aagctt19, actctt22 et attcag) par rapport au gène de résistance devraient permettre de préciser ce résultat.

D. CONCLUSION

Au début de ce travail, le gène de résistance à la rouille était lié au marqueur révélé par la sonde CDSR29 mais n'était pas rattaché au reste de la carte génétique de R570. L'utilisation de la synténie entre les Poacées et de la BSA, dans le but de saturer cette région du génome, ont principalement permis (i) de montrer que le gène est localisé en bout de chromosome et (ii) d'identifier des marqueurs proches encadrant le gène ciblé.

Ces marqueurs ont été utilisés pour tester l'existence éventuelle d'un déséquilibre de liaison dans une population de différents cultivars. Cette étude fait l'objet du quatrième chapitre.

**IV. RECHERCHE D'UN DESEQUILIBRE DE
LIAISON ENTRE LA RESISTANCE A LA
ROUILLE ET LES MARQUEURS PROCHES
DU GENE MAJEUR DE RESISTANCE
IDENTIFIE CHEZ R570**

IV. RECHERCHE D'UN DESEQUILIBRE DE LIAISON ENTRE LA RESISTANCE A LA ROUILLE ET LES MARQUEURS PROCHES DU GENE MAJEUR DE RESISTANCE IDENTIFIE CHEZ R570

A. INTRODUCTION

A.1. *Le déséquilibre de liaison*

Le déséquilibre de liaison est un paramètre qui décrit l'association statistique entre deux gènes à des locus différents. Il représente l'écart par rapport à la situation d'équilibre de liaison, qui voit l'association gamétique aléatoire entre les allèles de différents locus. Le terme de liaison peut prêter à confusion car deux gènes peuvent être en déséquilibre de liaison alors qu'ils sont portés par des chromosomes différents et donc ne sont pas liés génétiquement, il est d'ailleurs également appelé déséquilibre gamétique. Le déséquilibre de liaison peut évoluer en fonction de différents facteurs tels que la mutation, la migration, la dérive, la recombinaison, la sélection, "l'auto-stop" ou le système de reproduction.

Différentes notions sont utiles pour décrire le déséquilibre de liaison, en particulier chez une plante polyploïde. Un haplotype est une combinaison d'allèles au niveau de plusieurs locus, un allèle et un seul représentant l'état à chacun des locus. Si l'on considère, par exemple, les descendants issus de l'autofécondation de R570, chaque groupe de coségrégation est un haplotype qui représente un chromosome ou un segment chromosomique tel qu'il existe chez la variété mère, en l'occurrence R570 dans cet exemple. Chaque groupe de coségrégation peut être plus ou moins bien déterminé : seuls y figureront les allèles simplex, c'est-à-dire les allèles en copie unique chez la variété mère, soit les allèles spécifiques de cet haplotype (par rapport aux autres haplotypes homologues présents chez la variété mère). Ce groupe de coségrégation correspond donc à un haplotype plus ou moins différencié au sein de la population des haplotypes qui sont confrontés.

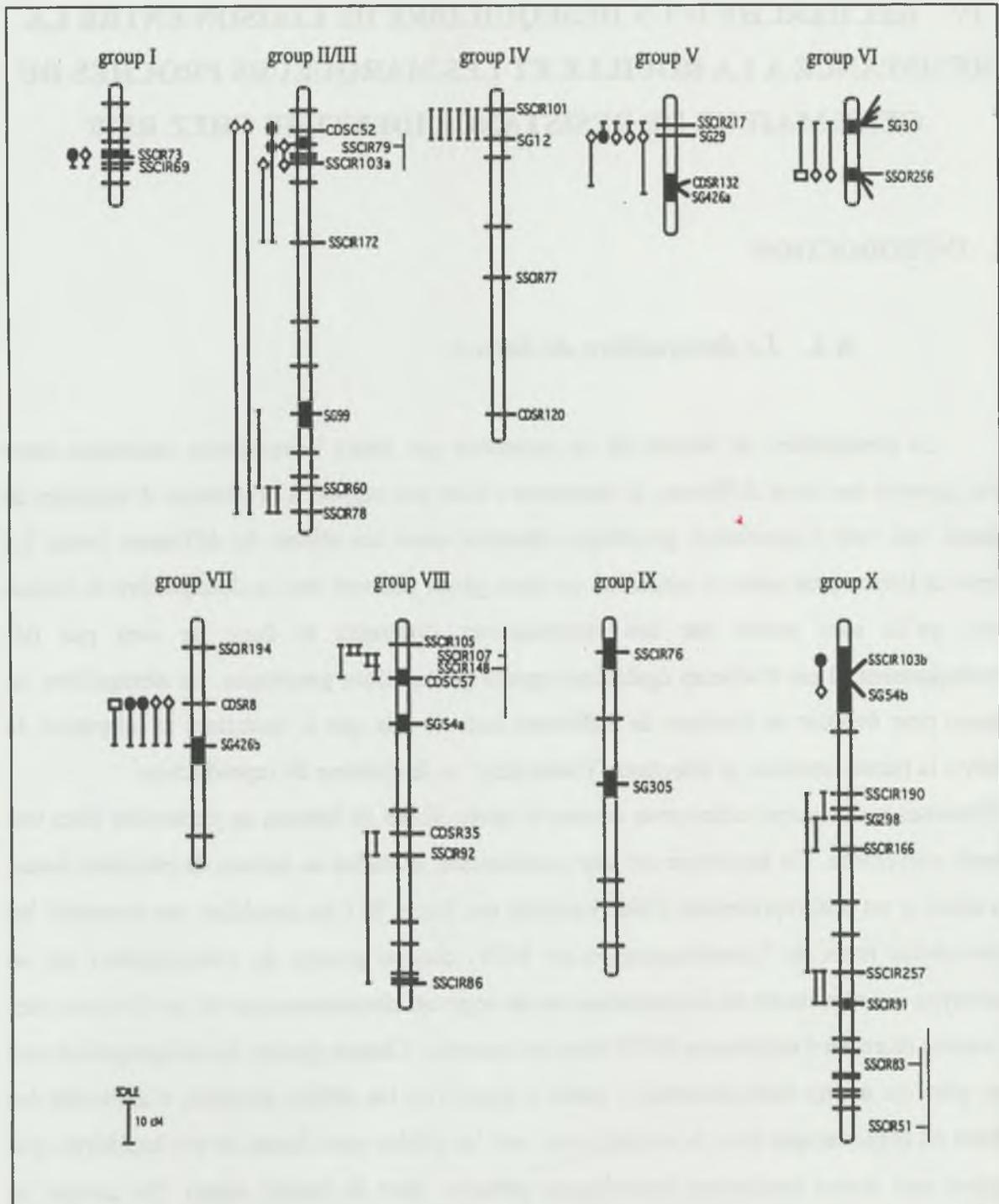


Figure 28 : Représentation des déséquilibres de liaison détectés entre 59 cultivars, sur la carte composite de R570 (Grivet *et al.*, 1996). Lorsque les locus sont dupliqués, ils portent chacun une lettre a ou b. Les ordres incertains entre locus sont indiqués par une zone noire sur le groupe de liaison, ou une barre "T" située sur la droite du groupe de liaison. Les déséquilibres de liaison entre locus sont indiqués par une barre sur la droite du groupe de liaison. L'origine des allèles est indiquée quand elle est connue (● *S. officinarum*, ◇ *S. spontaneum* et □ origine ambiguë) (d'après Jannoo *et al.*, 1999b).

A.2. Le cas des cultivars modernes de canne à sucre

L'histoire de la sélection de la canne à sucre ainsi que l'observation de l'appariement des chromosomes à la méiose fournissent des éléments qui laissent présager l'existence de déséquilibres de liaison dans les cultivars modernes de canne à sucre.

1/ La sélection de variétés de canne à sucre repose sur des croisements entre hybrides interspécifiques dits nobilisés. A l'origine, ces hybrides ont été élaborés à partir d'un nombre restreint de clones qui proviennent essentiellement des espèces *S. officinarum* et *S. spontaneum* (Arceneaux, 1967). On pourra assimiler l'effet de cette diversité restreinte à un effet de fondation générateur de déséquilibre de liaison.

2/ Compte tenu du temps nécessaire à l'évaluation et à la sélection d'une variété, 7 à 12 ans, les cultivars modernes résultent d'un nombre limité de méioses (5 à 7) depuis les premiers croisements interspécifiques. Ceci implique, pour des locus liés, peu de recombinaisons et donc peu de brassage intrachromosomique, ce qui tend à maintenir les déséquilibres de liaison par conservation des arrangements initiaux entre locus.

3/ L'essentiel de la diversité entre les cultivars modernes réside principalement dans la part de génome apportée par *S. spontaneum* (Lu *et al.*, 1994a et 1994b), bien que les chromosomes de cette espèce ne représentent qu'environ 15 à 25% du génome des hybrides interspécifiques (D'Hont *et al.*, 1996). Par ailleurs, il a été montré que peu de recombinaisons (enjambements) interspécifiques se produisent (D'Hont *et al.*, 1996 ; Grivet *et al.*, 1996), c'est-à-dire que les chromosomes issus de *S. spontaneum* s'apparient préférentiellement entre eux. L'existence de cette hétérogénéité dans la population de chromosomes, conduit théoriquement à un déséquilibre de liaison opposant des haplotypes caractéristiques de l'une ou l'autre des espèces parentales.

Lu *et al.* (1994b) ont étudié la diversité moléculaire RFLP et la structure du génome de 40 variétés modernes de canne à sucre, de diverses origines géographiques, à l'aide de 22 sondes. Au total, 30 associations entre locus ont été mises en évidence, la plupart de ces liaisons statistiques faisant intervenir des locus qui sont cartographiés dans un même groupe de liaison. Une seconde étude portant sur un ensemble de 59 cultivars, composé majoritairement de variétés mauriciennes et de quelques clones impliqués dans leur généalogie, a permis de révéler 42 cas d'associations entre marqueurs répartis sur 33 locus (Jannoo *et al.*, 1999b) (figure 28). La plupart de ces déséquilibres de liaison concernent des

Tableau IV.1. Liste des cultivars utilisés et de leur lieu de sélection. Le comportement général des ces cultivars vis à vis de la rouille est noté selon quatre niveaux de résistance : R = résistant, FS = faiblement sensible, S = moyennement sensible et TS = très sensible.

Cultivar	Lieu de sélection	Lieu d'évaluation	Niveau de résistance
M377/56	Maurice	Maurice	R
M3035/66	Maurice	Maurice	R
M1176/77	Maurice	Maurice	R
M624/78	Maurice	Maurice	R
M2077/78	Maurice	Maurice	R
M2229/80	Maurice	Maurice	R
S17	Taiwan	Maurice	R ou FS
M31/45	Maurice	Maurice	FS
M93/48	Maurice	Maurice	FS
M13/56	Maurice	Maurice	FS
M351/57	Maurice	Maurice	FS
M574/62	Maurice	Maurice	FS
M2173/63	Maurice	Maurice	FS
M376/64	Maurice	Maurice	FS
M657/66	Maurice	Maurice	FS
M695/69	Maurice	Maurice	FS
M292/70	Maurice	Maurice	FS
M298/71	Maurice	Maurice	FS
M536/75	Maurice	Maurice	FS
M1557/70	Maurice	Maurice	FS
M52/78	Maurice	Maurice	FS
M725/78	Maurice	Maurice	FS
M1658/78	Maurice	Maurice	FS
M147/44	Maurice	Maurice	S
M202/46	Maurice	Maurice	S
M356/53	Maurice	Maurice	S
M555/60	Maurice	Maurice	S
M1156/66	Maurice	Maurice	S
M1205/70	Maurice	Maurice	S
M1236/71	Maurice	Maurice	S
M50/75	Maurice	Maurice	S
M134/75	Maurice	Maurice	S
M791/75	Maurice	Maurice	S
M1077/75	Maurice	Maurice	S
Q96	Australie	Maurice	S
R576	Réunion	Maurice	S
M1030/71	Maurice	Maurice	TS
SP80-1043	Brésil	Brésil	S ⁽¹⁾
H49-5	Hawaii		S
B4362	Barbade		S

⁽¹⁾ évaluation du niveau de résistance sur une échelle graduée de 1 (très résistant) à 9 (très sensible)

marqueurs fréquents et des locus distants de moins de 10 cM. Toutes les associations détectées ont été retrouvées dans les variétés qui sont à l'origine des cultivars mauriciens étudiés et les deux tiers des allèles proviennent de l'espèce *spontaneum*.

Les résultats de ces travaux suggèrent la possibilité d'utiliser des cultivars modernes pour détecter des associations entre des marqueurs moléculaires et des gènes impliqués dans l'élaboration de caractères d'intérêt agronomique. L'utilisation de telles associations dans une démarche de sélection assistée par marqueurs pourrait être très bénéfique aux programmes d'amélioration variétale de la canne à sucre.

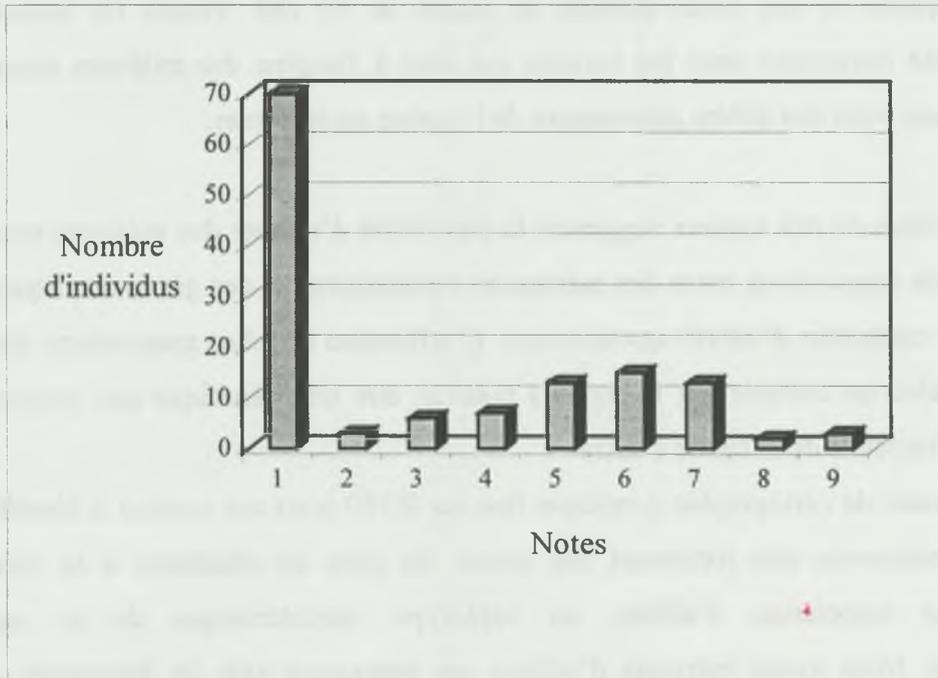
Nos travaux de cartographie génétique fine sur R570 nous ont conduit à identifier un ensemble de marqueurs très fortement liés autour du gène de résistance à la rouille et constituant une association d'allèles, un haplotype, caractéristique de ce segment chromosomique. Nous avons entrepris d'utiliser ces marqueurs afin de déterminer si des combinaisons alléliques similaires peuvent être observées dans d'autres cultivars et si elles sont associées à la résistance. Dans un premier temps, nous avons analysé ces marqueurs sur une descendance issue d'un croisement biparental entre deux cultivars brésiliens et qui ségrège pour la résistance de façon monofactorielle. Ceci nous permettra de déterminer si l'haplotype qui porte la résistance à la rouille est le même que celui qui a été défini chez R570. Puis, ces mêmes marqueurs ont été analysés sur 40 cultivars, associés à un programme de sélection particulier (Maurice), afin d'évaluer si l'haplotype porteur de la résistance à la rouille chez R570 est un élément important dans cette population de cultivars.

B. MATERIEL ET METHODE

B.1. Matériel végétal

La descendance brésilienne est constituée de 132 individus issus d'un croisement biparental entre deux cultivars SP (São Paulo, Brésil) : SP81-1763 (parent femelle, sensible à la rouille) et SP82-3349 (parent mâle, résistant à la rouille). Les 132 descendants, ainsi que les deux parents du croisement nous ont été fournis par la station expérimentale de la COPERSUCAR (coopérative des producteurs de canne à sucre brésiliens de l'état de São Paulo) située à Piracicaba.

A



B

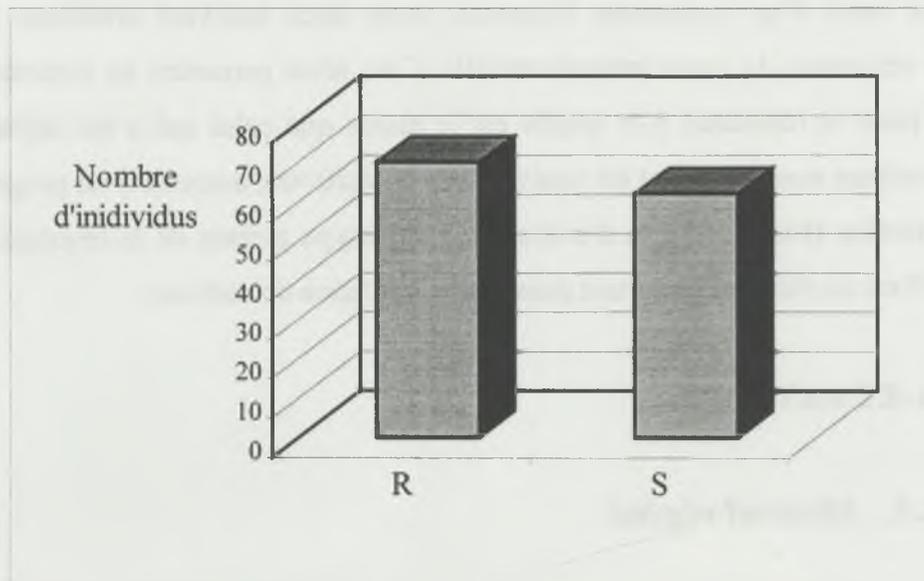


Figure 29 : Répartition des niveaux de résistance à la rouille dans la descendance du croisement SP81-1763 x SP82-3349. A Répartition des notes de chaque individu. B Répartition des individus résistants (R) et sensibles (S).

Quarante variétés ont été utilisées dans cette étude. Trente sept, originaires de l'île Maurice (tableau IV.1.) ou cultivées à Maurice au cours des 50 dernières années, nous ont été fournies par le MSIRI (centre de sélection mauricien). Les trois autres variétés correspondaient à des variétés sensibles utilisées comme témoin à certaines étapes de nos travaux, une variété provient du Brésil (SP80-1043) et nous a été fournie par la COPERSUCAR, les deux autres sont originaires de Barbade (B4362) et d'Hawaii (H49-5) et étaient en collection au Cirad (France, Montpellier) (tableau IV.1.).

B.2. Evaluation de la résistance à la rouille

La descendance a été évaluée au champ pour la résistance à la rouille en condition naturelle d'infestation. Ces évaluations ont été effectuées en 1997 dans une station expérimentale de la COPERSUCAR située à Piracicaba (état de São Paulo). La parcelle élémentaire de chaque clone était constituée d'une ligne de deux mètres sans répétition. Les lignes étaient séparées les unes des autres latéralement et longitudinalement par une distance de 1,4 et 2 mètres, respectivement. Les notes attribuées à chaque clone s'échelonnent de 1 (très résistant) à 9 (très sensible) selon les critères définis par Tai *et al.* (1981). Le cultivar brésilien (SP80-1043) a été évalué selon les mêmes modalités.

La répartition des notes de résistance sur l'ensemble de la descendance du Brésil est bimodale (figure 29A), et permet de séparer les individus en deux classes : résistant et sensible. Nous classerons parmi les résistants tous les individus qui ont une note de 1 et parmi les sensibles tous ceux qui ont une note supérieure à 2. Les proportions d'individus résistants et sensibles ainsi départagés (figure 29B) sont conformes à un ratio de ségrégation 1:1 (résistant:sensible), avec une probabilité associée $P = 0,486$, et indiquent la présence d'un gène majeur de résistance dominant et en copie unique dans le génome du parent résistant (SP82-3349). Il existe une grande variabilité des niveaux de résistance parmi les individus sensibles dont la distribution suit une loi normale (test de Shapiro-Wilks, $P = 0,9964$). Cette variabilité suggère l'intervention de QTL à effets mineurs dans les facteurs qui contrôlent la résistance à la rouille. Daugrois *et al.* (1996) ont observé une répartition des niveaux de résistance comparable dans la descendance autofécondée du cultivar R570, et font le rapprochement avec les mécanismes de résistance à la rouille du maïs et du sorgho pour lesquels une résistance monogénique race spécifique et une résistance générale polygénique coexistent (Hooker, 1985).

Tableau IV.2. Ségrégation des 6 marqueurs AFLP et d'un marqueurs AFLP cloné (RFLP6) liés au gène de résistance à la rouille chez R570 dans la descendance du croisement SP81-1763 x SP82-3349. R et S désignent les phénotypes résistant et sensible à la rouille. + et - désignent la présence et l'absence du marqueur.

Marqueur	Parent [R] SP82-3349	Parent [S] SP81-1763	Descendance			
			[R+]	[R-]	[S+]	[S-]
aagctt19	+	-	54	4	10	38
actctt22	+	+	8	1	10	0
aaccac6	+	+	13	1	7	1
RFLP6	+	-	11	0	2	11
<i>Rouille</i>						
actctg9R	+	+	15	0	13	0
aagcta23	+	+	7	1	6	0
acgctt10	+	-	58	3	6	45

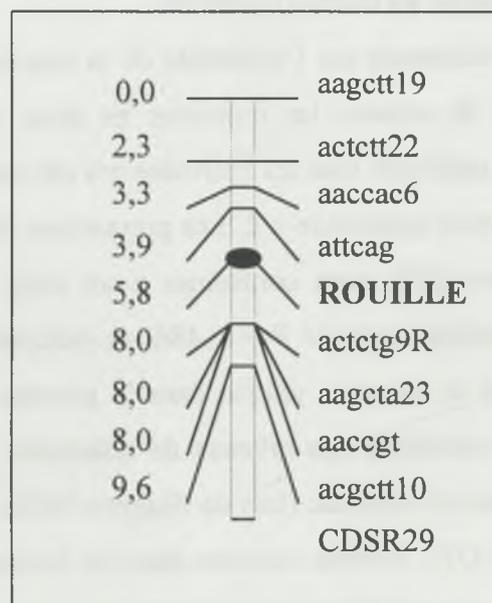


Figure 30 : Carte génétique des régions flanquantes du gène de résistance à la rouille chez R570. Le marqueur écrit en majuscule est un marqueur RFLP les autres sont des marqueurs AFLP. Les distances ont été calculées avec la fonction de cartographie de Haldane.

Les 37 variétés fournies par le MSIRI ainsi que les deux variétés H49-5 et B4362 ont été exploitées pour l'industrie sucrière pendant de nombreuses années. Le comportement général de chacun de ces cultivars par rapport à la rouille a été classé selon quatre niveaux de résistance à partir d'observations globales dans les plantations mais aucune évaluation particulière n'a été faite. Sur ces 39 cultivars, 6 sont considérés résistants, 16 faiblement sensibles, 13 moyennement sensibles et 3 très sensibles. Le cultivar S17 présente des niveaux de résistance hétérogènes et a été classé résistant ou faiblement sensible (tableau IV.1.).

Les techniques de marquage moléculaire AFLP et RFLP ainsi que le codage des marqueurs et leur cartographie génétique (logiciel et valeurs des paramètres utilisés) sont décrits dans le chapitre III paragraphe B.1. Deux marqueurs AFLP, aaccac6 et actctg9R, clonés ont été utilisés dans ce travail. La technique de clonage est décrite au chapitre III paragraphe C.1.2. Pour distinguer les deux types de marqueurs nous nommerons RFLP6 et RFLP9R les deux sondes issues des marqueurs AFLP aaccac6 et actctg9R clonés, respectivement.

C. RESULTATS ET DISCUSSION

C.1. Caractérisation de l'haplotype porteur de la résistance à la rouille chez SP82-3349

Six marqueurs AFLP (aagctt19, actctt22, aaccac6, actctg9R, aagcta23 et acgctt19) ont été recherchés dans la descendance issue du croisement entre les cultivars SP81-1763 x SP82-3349. Les résultats de la ségrégation de ces marqueurs sont présentés dans le tableau IV.2. Sur les six marqueurs AFLP, tous sont présents chez le parent résistant (SP82-3349) et deux sont absents chez le parent sensible (SP81-1763). Ces deux marqueurs, aagctt19 et acgctt10, sont les deux marqueurs AFLP les plus extrêmes identifiés sur l'haplotype porteur du gène de résistance à la rouille chez R570 (figure 30). Ils sont majoritairement présents chez les individus résistants et absents chez les individus sensibles (aux recombinaisons près) de la descendance, c'est-à-dire qu'ils coségrègent avec la résistance à la rouille dans la descendance étudiée. Les quatre autres marqueurs, (actctt22, aaccac6, actctg9R et aagcta23), présents à la fois chez le parent sensible et le parent résistant, ne ségrègent pratiquement pas dans la descendance.

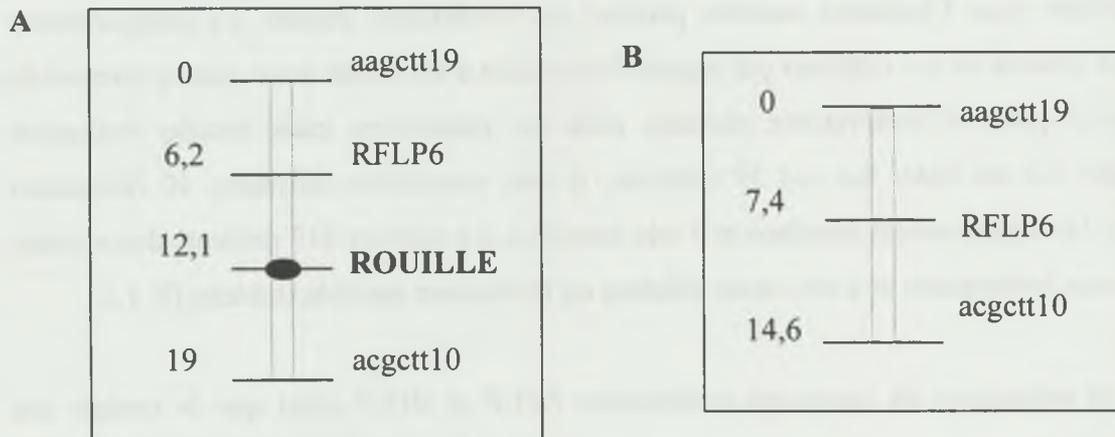


Figure 31 : Carte génétique des régions flanquantes du gène de résistance à la rouille dans la descendance du croisement SP81-1763 x SP82-3349 (B). Les distances entre marqueurs ont également été calculées en excluant de l'analyse le locus qui confère la résistance à la rouille (A). Le marqueur écrit en majuscule est un marqueur RFLP les autres sont des marqueurs AFLP. Les distances ont été calculées avec la fonction de cartographie de Haldane.

Tableau IV.3. Analyse de 40 cultivars avec 7 marqueurs AFLP liés au gène de résistance à la rouille chez R570. R et S désignent les phénotypes résistant et sensible à la rouille. + et - désignent la présence et l'absence du marqueur.

Marqueur	Cultivar [R]		Cultivar [S]	
	[R+]	[R-]	[S+]	[S-]
aagctt19	3	4	15	16
actctt22	6	1	25	5
aaccac6	2	5	18	15
attcag	6	1	14	16
<i>Rouille</i>				
actctg9R	5	1	29	4
aagcta23	6	1	21	3
acgctt10	4	3	11	19

Les deux sondes RFLP6 et RFLP9R (issues des marqueurs AFLP clonés) ainsi que la sonde CDSR29 ont été analysées par hybridation *Southern* sur un échantillon de 10 descendants (dont quatre sont résistants et six sont sensibles). Chaque sonde a été combinée avec six enzymes de restriction (*DraI*, *HindIII*, *EcoRI*, *EcoRV*, *XbaI* et *BamHI*) et donc 18 couples enzyme/sonde ont été testés au total. Les 12 combinaisons impliquant les sondes RFLP9R et CDSR29 n'ont révélé aucun marqueur coségrégant avec la résistance à la rouille dans la descendance. En revanche, la sonde RFLP6 associée aux enzymes *HindIII* et *XbaI* a permis de révéler trois marqueurs ayant une ségrégation conforme à celle de la résistance à la rouille dans la descendance. L'un de ces marqueurs, révélé par l'enzyme *HindIII*, a été analysé sur 14 individus supplémentaires (dont 7 sont sensibles et 7 sont résistants) afin de confirmer la liaison avec le locus du gène de résistance à la rouille dans la descendance (tableau IV.2.).

Les trois marqueurs qui ségrègent avec la résistance (aagctt19, RFLP6 et acgctt10) ont été cartographiés sur la descendance. Les positions de ces marqueurs par rapport au gène de résistance à la rouille sont les mêmes que celles qui ont été observées chez R570 (figure 31), mais les distances entre locus sont supérieures. L'augmentation est modérée quand on ne prend en compte que les marqueurs ; la longueur du segment considéré passe de 9,6 cM à 14,6 cM. Elle est plus forte quand on inclut la résistance à la rouille ; la longueur du segment est alors de 19 cM chez SP82-3349. L'examen des données de ségrégation révèle la présence de deux doubles recombinants sensibles. Cependant, étant donné la probabilité de cet évènement, il est envisageable que des erreurs d'identification des individus soient à l'origine de ce phénomène et provoquent un allongement des distances entre marqueurs. En dépit de ces légères différences, on peut conclure que l'haplotype porteur du gène de résistance à la rouille chez la variété SP82-3349 comporte les marqueurs aagctt19 et acgctt10. Les résultats sont par ailleurs compatibles avec l'hypothèse qu'il comporte aussi les marqueurs actctt22, aaccac6, actctg9R et aagcta23. La fréquence limitée de ces marqueurs dans un ensemble de variétés analysées au hasard (cf. paragraphe suivant) rend improbable que l'identité de ces deux haplotypes soit fortuite. Il est donc probable que l'haplotype présent chez SP82-3349 ait la même origine que celui présent chez R570.

Compte tenu de l'historique de l'amélioration de la canne à sucre et de la structure du génome des cultivars modernes (Lu *et al.*, 1994a et 1994b ; Jannoo *et al.*, 1999b), on pouvait s'attendre à observer des associations entre locus dans la région du gène de résistance à la

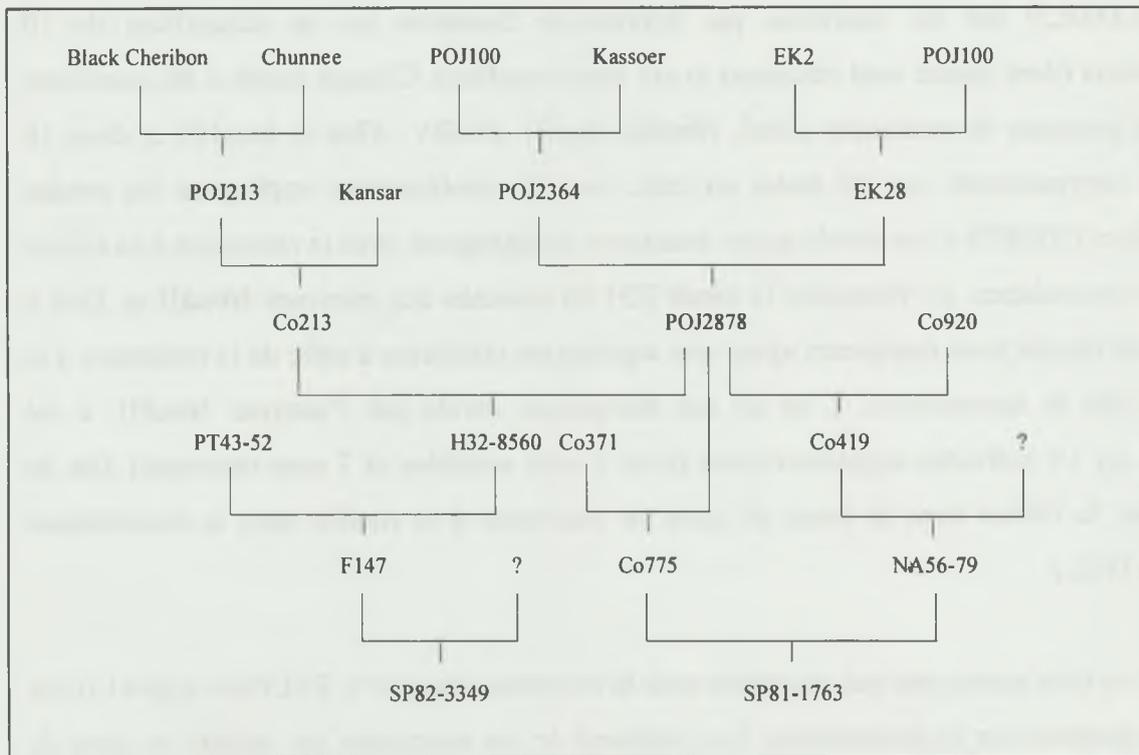


Figure 32 : Généalogie des cultivars brésiliens SP82-3349 (résistant) et SP81-1763 (sensible).

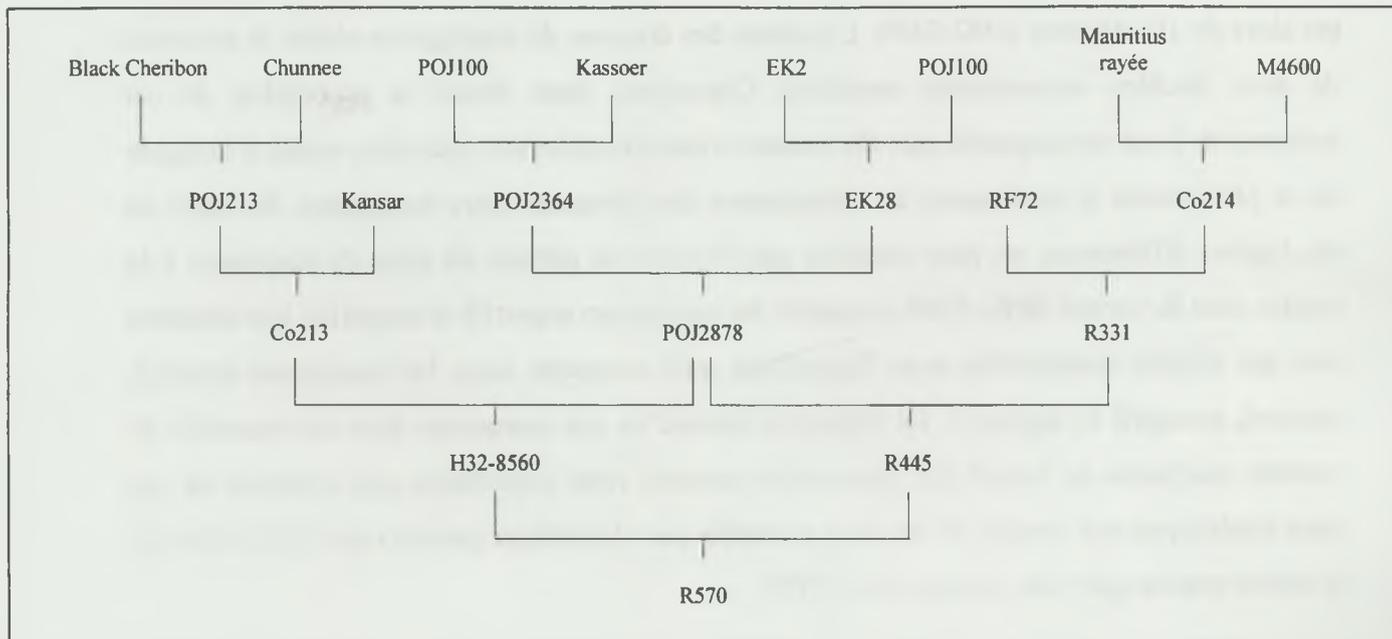


Figure 33 : Généalogie du cultivar R570 (résistant).

rouille pour plusieurs cultivars. Il est probable que les cultivars SP82-3349 et R570 aient hérité d'un segment chromosomique identique portant le locus impliqué dans la résistance à la rouille et provenant d'un ancêtre commun. La comparaison de la généalogie de ces deux cultivars met en évidence l'existence d'un parent commun proche : H32-8560 (génération n-1 pour R570 et n-2 pour SP82-3349) qui n'a pas participé à l'élaboration du cultivar SP81-1763, le parent sensible de la descendance étudiée (figure 32 et 33). H32-8560 pourrait être à l'origine de la transmission du segment chromosomique compris entre les marqueurs aagctt19 et acgctt10 et commun à SP82-3349 et R570.

Il est à noter que les marqueurs cartographiés entre aagctt19 et acgctt10 chez R570 sont présents chez le parent sensible SP81-1763, et se retrouvent à la fois chez les individus sensibles et résistants dans la descendance. Si cette distribution est représentative de l'état initial chez les hybrides fondateurs des cultivars actuels, cela signifie que les allèles correspondant à ces marqueurs n'étaient pas en copie unique dans le génome et étaient, en particulier, présents sur des haplotypes non porteurs de la résistance. Cette distribution peut bien sûr aussi être le résultat de recombinaisons intervenues au fil des générations de sélection. Il est cependant également à noter que le passage aux RFLP a permis pour l'un des trois marqueurs (aaccac6) de discriminer l'allèle porté par l'haplotype vecteur de la résistance.

C.2. Analyse des cultivars mauriciens

Les sept marqueurs AFLP (aagctt19, actctt22, aaccac6, attcag, actctg9R, aagcta23 et acgctt10) ont également été étudiés sur 40 cultivars. Les résultats sont présentés dans le tableau IV.3. L'analyse la plus directe est la recherche d'une association éventuelle entre la résistance et la présence de chacun des marqueurs pris séparément. Les trois marqueurs actctt22, actctg9R et aagcta23 sont présents chez la majorité des cultivars, aussi bien chez les résistants que chez les sensibles, et ne permettent pas réellement de tester les hypothèses sur un plan statistique. En revanche, les marqueurs aagctt19, aaccac6 et acgctt10 ont une fréquence intermédiaire qui rend les tests de (χ^2) possibles. Ces tests ne donnent aucun résultat significatif. Dans tous les cas, s'il y a association, elle est très ténue.

On peut également essayer de caractériser la contribution de l'haplotype porteur de la résistance chez R570 à la diversité parmi les cultivars de Maurice. L'analyse du matériel brésilien suggère que les marqueurs actctt22, aaccac6, actctg9R et aagcta23 ne sont pas

Tableau IV.4. Phénotypes de six marqueurs AFLP chez 40 cultivars. 0 et 1 signifient marqueur absent et présent, respectivement, et - indique une donnée manquante. Signification des niveaux de résistance : R = résistant, FS = faiblement sensible, S = moyennement sensible et TS = très sensible. Signification des préfixes du nom des cultivars : M = Maurice, S = Taiwan, Q = Queensland, R = Réunion, SP = São Paulo, H = Hawaii et B = Barbade.

Cultivar	Niveau de résistance	aagctt19	actctt22	aaccac6	actctg9R	aagcta23	acgctt10
M2229/80	R	1	1	1	1	1	1
M2077/78	R	1	1	1	1	1	1
M31/45	FS	1	1	1	1	1	1
M2173/63	FS	1	1	1	1	1	1
M298/71	FS	1	1	1	1	1	1
M52/78	FS	1	1	1	1	1	1
M202/46	S	1	1	1	1	1	1
M134/75	S	1	-	1	1	1	1
M555/60	S	1	1	0	1	1	-
M1205/70	S	1	1	0	1	1	-
M377/56	R	1	1	0	1	1	0
M93/48	FS	1	1	1	1	1	0
M356/53	S	1	1	1	1	1	0
M292/70	FS	1	-	0	1	1	0
M791/75	S	1	1	1	1	-	0
M1077/75	S	1	1	1	1	1	0
R576	S	1	1	0	1	-	0
M1030/71	TS	1	1	1	0	-	0
M3035/66	R	0	1	0	1	1	1
M624/78	R	0	0	0	1	1	1
M351/57	FS	0	0	1	1	1	1
M376/64	FS	0	1	0	1	1	1
M695/69	FS	0	1	1	1	1	1
M725/78	FS	0	1	1	1	1	1
Q96	S	0	1	0	0	0	-
M1176/77	R	0	1	0	0	0	0
S17	R ou FS	0	1	0	-	1	0
M13/56	FS	0	1	1	1	-	0
M574/62	FS	0	1	1	1	0	0
M657/66	FS	0	0	0	0	0	0
M536/75	FS	0	1	0	1	1	0
M1557/70	FS	0	-	1	1	1	0
M1658/78	FS	0	1	0	1	-	0
M147/44	S	0	0	1	1	-	0
H49-5	S	0	1	0	1	-	0
SP80-1043	S	0	0	0	0	1	0
B4362	S	0	1	0	1	-	0
M1156/66	S	0	1	0	1	-	0
M1236/71	S	-	1	0	1	1	1
M50/75	S	-	0	0	1	1	0

spécifiquement associés à l'haplotype référence, alors que aagctt19 et acgctt10 le sont sur la population des quelques trente chromosomes étudiés (les chromosomes hom(é)ologues de R570, de SP82-3349 et SP81-1763). Si l'on admet que ceci est vrai d'une façon générale dans l'ensemble des cultivars, on pourra considérer la présence (absence) de aagctt19 et celle de acgctt10 comme des traces de la présence (absence) de l'haplotype recherché. Par contre, pour les marqueurs actctt22, aaccac6, actctg9R et aagcta23, seule l'absence sera informative, la présence étant ambiguë en tant que trace de l'haplotype. Examinés dans cette optique, les résultats sont très cohérents avec l'hypothèse d'un rôle important de l'haplotype dans la production du polymorphisme moléculaire (tableau IV.4.) :

- quand les marqueurs aagctt19 et acgctt10 sont tous les deux présents, les marqueurs actctt22, aaccac6, actctg9R et aagcta23 le sont également ;
- ces derniers sont plus souvent absents quand le marqueur non ambigu (aagctt19 ou acgctt10) le plus proche est absent.

Néanmoins, il faut noter que l'association entre les marqueurs non ambigus externes (aagctt19 et acgctt10) est très faible (13 0/0, 8 1/1 et 14 1/0 ou 0/1). Il faut également noter que la présence ou l'absence de l'haplotype, dans sa totalité ou partiellement, n'est en rien associée au niveau de résistance du cultivar.

Globalement cet essai de caractérisation d'un déséquilibre de liaison utilisable pour étudier la diversité au niveau du gène de résistance à la rouille est peu concluant sans être complètement négatif.

L'étude souffre de nombreux handicaps. Tout d'abord une partie des marqueurs sont ambigus. Il s'agit d'AFLP dont la lecture peut être perturbée du fait d'une présence en plusieurs doses (allèle multiplex) mais aussi de la superposition avec d'autres bandes non alléliques. Le recours à des RFLP pour ce genre d'étude pilote permettra de lever une partie des difficultés. Les RFLP ont toute chance de ne révéler que des marqueurs issus du locus cible. L'utilisation de plusieurs enzymes de restriction permettra peut-être de caractériser de façon univoque l'allèle porté par l'haplotype, comme cela s'est révélé possible dans un cas sur trois pour l'étude de la descendance avec les sondes issues du clonage de fragments AFLP.

Ensuite, il est clair que la population utilisée induit différentes limitations. Du fait de sa taille faible d'abord, qui limite la puissance générale. Du fait des apparentements possibles entre groupes de variétés ensuite, qui peuvent biaiser les résultats en faveur d'évènements méiotiques sur-représentés dans le matériel.

Enfin, le mode d'évaluation de la résistance à la rouille est particulier. La note utilisée caractérise un comportement général observé sur de grandes surfaces et pendant de longues années de culture répétée. Il est possible que la gamme de variation globale soit très différente de celle observée dans une descendance. En effet, il est probable que des clones révélant une sensibilité correspondant à des notes supérieures à 3 dans la gamme utilisée pour la descendance soient généralement éliminés au cours des cycles de sélection clonale. La variation entre les 4 classes de cultivars peut correspondre à une part limitée de la variation observée dans la descendance et donc avoir une base génétique qui ne fait pas intervenir le gène de résistance que nous étudions.

Si ce type d'analyse devait être poursuivi, il faudrait prendre en considération les remarques précédentes. Notons cependant un résultat intéressant : des variétés comme M377/56 et M1176/77 sont très résistantes et semblent ne pas avoir le fragment chromosomique qui confère la résistance à R570 du fait de l'absence de cet haplotype de part et d'autre du gène de résistance. Il y a là des pistes pour diversifier les sources de résistance.

**V. DISCUSSION GENERALE ET
PERSPECTIVES**

V DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'étude globale du gène de résistance à la rouille, traitée sous différents aspects, nous a permis d'obtenir les résultats suivants :

- R570 est résistant aux isolats de *P. melanocephala* collectés dans différentes zones géographiques.
- la résistance à la rouille identifiée chez R570 est contrôlée par le même gène quel que soit l'isolat testé.
- le gène est situé en position terminale sur l'un des groupes de coségrégation du groupe de liaison VII de la carte de R570. Cette région est synténique avec les extrémités des chromosomes D du sorgho (de la carte de Dufour *et al.*, 1997), 2 du riz et 4 du maïs et avec la partie centrale du chromosome 5 du maïs.
- le gène est encadré par huit marqueurs AFLP dans un intervalle de 10 cM, les marqueurs les plus proches sont cartographiés à 1,9 et 2,2 cM de part et d'autre du gène.
- le même allèle de résistance à la rouille est également présent chez le SP82-3349 sélectionné au Brésil.
- l'haplotype porteur de la résistance à la rouille chez R570 ne semble pas présent dans certaines variétés mauriciennes résistantes étudiées.

Parmi les différentes interactions hôtes-pathogènes, on trouve des résistances générales à large spectre d'action et des résistances spécifiques qui contrôlent la résistance vis-à-vis de différentes races d'un agent pathogène. Pour la rouille de la canne à sucre, différentes études rapportent l'existence de plusieurs races de *P. melanocephala* en Inde, à Hawaii et en Floride (Srinivasan et Muthaiyan, 1965 ; Comstock, 1985 ; Comstock *et al.*, 1994). Etudiant une source ponctuelle de résistance à la rouille, il était important que nous testions l'étendue de l'action de cette résistance.

Nous avons d'abord montré que R570 est résistant à l'ensemble des isolats testés, originaires du Brésil, de Colombie, de Floride, de Guadeloupe, de la Réunion et du Zimbabwe. Ces résultats concordent avec les observations faites sur le terrain, puisque le cultivar R570 apparaît résistant à la rouille dans tous les territoires où il a été cultivé ou testé : le Brésil, la Côte d'Ivoire, la Guadeloupe, la Martinique, la Réunion ou Trinidad... Cette résistance pourrait être contrôlée par un gène à large spectre ou par plusieurs facteurs génétiques différents. On rencontre une grande multiplicité des facteurs génétiques de

résistance à la rouille chez différentes espèces. Par exemple, chez le lin 32 allèles ou gènes spécifiques de résistance à la rouille (*Melampsora lini*) sont répartis sur cinq locus (Pryor et Ellis, 1993 et Islam et Mayo, 1990). De la même façon, chez le maïs on compte 24 spécificités de résistance à la rouille (*Puccinia sorghi*) regroupées dans trois régions génomiques (Saxena et Hooker, 1968 ; Hooker, 1985). L'étude d'un échantillon de la descendance issue de l'autofécondation de R570 nous a permis de montrer que c'est la même région génomique, et elle seule, qui confère la résistance aux différents isolats. Il semble donc que le facteur de résistance étudié a une action très étendue et qu'il peut être utilisé avec efficacité dans les régions d'origine des isolats testés. Etant donné la très large répartition géographique de l'agent pathogène de la rouille, il serait intéressant de tester d'autres isolats (avec la même technique) afin de compléter cette étude.

L'un des huit isolats testés (FL78) a été collecté en Floride sur le cultivar CP78-1247 qui était résistant à la rouille jusqu'en 1988. Cet isolat constituerait donc une race plus virulente vis-à-vis de CP78-1247, capable de surmonter la résistance de ce cultivar (Raid, 1989). L'inoculation de cet isolat sur R570 ainsi que sur la descendance n'a provoqué aucune réaction particulière, indiquant que s'il existe différentes races parmi les échantillons testés elles n'ont pas été détectées.

Nous avons localisé le gène majeur de résistance à la rouille dans la partie terminale de l'un des groupes de coségrégation du groupe de liaison VII de la carte génétique de R570. La comparaison de cette région génomique avec les segments chromosomiques homéologues d'autres Poacées n'a pas révélé de gènes de résistance à la rouille orthologue candidats entre les différentes espèces. Notre travail de cartographie comparée nous a permis, à partir de sondes RFLP de sorgho, de maïs et de riz, d'affiner l'étude des relations de synténie et de colinéarité dans la région qui porte le gène de résistance à la rouille chez la canne à sucre. La synténie et l'ordre des locus étudiés sont bien conservés entre ces espèces et aucun réarrangement majeur n'a été détecté. Une comparaison précise des génomes dans la région ciblée permet de comprendre les raisons pour lesquelles aucun marqueur RFLP plus proche du gène ou au-dessus du gène n'a été détecté. En effet, (i) il n'y a pas de marqueur au-delà du locus révélé par la sonde CDSR29 chez le sorgho (ii) la sonde la plus extrême qui soit cartographiée sur le chromosome 4 du maïs est cartographiée en dessous de CDSR29 chez R570 (iii) les sondes révélant les marqueurs les plus extrêmes chez le riz sont peu nombreuses et ne s'hybrident pas sur l'ADN de canne à sucre (iv) la région ciblée correspond à l'extrémité d'un segment du chromosome 5 du maïs qui est homéologue avec le groupe de liaison VII de

la canne, alors que la partie adjacente du chromosome est homéologue avec le groupe de liaison IX de la canne.

Nous avons cartographié quatre marqueurs AFLP dans une zone de 6 cM au-dessus du gène. L'un de ces marqueurs a été cloné (RFLP6) puis cartographié chez le sorgho. La comparaison canne-sorgho révèle que la synténie est bien conservée pour ce locus, mais qu'il constitue une exception à la colinéarité entre les deux génomes. Cette colinéarité étant conservée pour deux autres marqueurs (BNL7.43 et PHP20608) cartographiés à proximité de ce locus (BNL7.43 coségrège avec RFLP6), on peut espérer que la rupture de colinéarité observée ne représente qu'un remaniement ponctuel. Le clonage des trois autres marqueurs AFLP situés dans la partie distale du groupe de coségrégation qui porte le gène de résistance et leur cartographie sur le sorgho, le maïs et le riz devraient permettre d'affiner la cartographie comparée dans les zones étudiées. A l'échelle du génome entier les ruptures de colinéarité entre la canne et le sorgho sont peu fréquentes (Grivet *et al.*, 1994 ; Dufour *et al.*, 1996 et 1997 ; Guimaraes *et al.*, 1997 ; Ming *et al.*, 1998). Par exemple, Dufour *et al.* (1997) montrent que la colinéarité générale est bien conservée entre les génomes de la canne et du sorgho à l'exception de quelques remaniements ponctuels. Glaszmann *et al.* (1997) décrivent en revanche des relations plus complexes dans des régions particulières des génomes du sorgho et de la canne (entre les chromosomes B et J du sorgho et le groupe de liaison VIII de la canne).

La BSA associée aux marqueurs AFLP est une technique qui s'est révélée efficace puisqu'elle nous a permis d'identifier quatre marqueurs situés de part et d'autre du gène de résistance dans un intervalle de 5,7 cM. Les marqueurs les plus proches sont cartographiés à 1,9 et 2,2 cM de chaque côté du gène. Si l'on prend en considération les quatre autres marqueurs AFLP liés au gène et identifiés lors de la construction de la carte AFLP de R570 (Hoarau *et al.*, en préparation), le gène de résistance est maintenant entouré de huit marqueurs AFLP dans un intervalle de 10 cM.

L'utilisation d'amorces AFLP différentes de celles du kit commercial a occasionné de nombreux problèmes, en terme de qualité des profils obtenus, qui ont certainement affecté l'efficacité de la méthode. Il est probable que l'origine de ces problèmes soit liée à la fois au degré de conformité des amorces (pourcentage d'amorces conformes à la séquence attendue sur la totalité des fragments synthétisés) et au fait que nous recherchions des marqueurs simplex dans un génome hautement polyploïde. Les bandes ciblées sont donc des bandes de faible intensité difficile à détecter. L'utilisation de ces amorces AFLP chez la canne à sucre

Tableau V.1. Comparaison de la taille du génome de quelques Poacées.

Espèce	Niveau de ploïdie (a)	Nombre de chromosomes de base (a)	Taille du génome pour 1C (a)	
			en pg	en Mpb
Riz (<i>Oriza sativa</i>)	2	12	0,45	450
Blé hexaploïde (<i>Triticum aestivum</i>)	6	7	17,90	18 000
Maïs (<i>Zea mays</i>)	2	10	2,90	2 900
Orge (<i>Hordeum vulgare</i>)	2	12	6,18	6 000
Avoine (<i>Avena sativa</i>)	6	7	11,70	12 000
Sorghum (<i>Sorghum bicolor</i>)	2	10	0,80	800
<i>S. officinarum</i>	8	10	0,96 ^(b)	1 000
<i>S. spontaneum</i>	8	8	0,78 ^(b)	800

(a) Benett et Leitch, 1995, (b) D'Hont communication personnelle.

reste limitée tant que nous ne disposerons pas d'amorces synthétisées dans des conditions optimales.

Le rapport moyen entre la distance génétique et la distance physique pour l'ensemble du génome de R570 a été estimé à 1500 kpb pour 1 cM. Selon ce rapport moyen le gène de résistance serait à 2,8 Mpb (1,9 cM) du marqueur le plus proche. Cependant, le rapport est très variable sur l'ensemble du génome car les fréquences de recombinaison ne sont pas uniformes le long des chromosomes. Au niveau des régions terminales, le taux de recombinaison est généralement plus élevé. Par exemple, chez la tomate, le rapport moyen entre distance physique et génétique est de 450 kpb/cM alors que ce rapport a une valeur de 43 kpb/cM, dans la région du gène *I2* qui est situé dans la partie terminale du chromosome 11. Le gène de résistance à la rouille étant situé en bout de chromosome, il est probable que l'estimation de distance physique faite ci-dessus soit surévaluée. Il serait donc utile de déterminer la correspondance entre distance physique et génétique dans cette région du génome de la canne. Parmi les marqueurs AFLP liés au gène de résistance, deux sont distants de 0,6 cM et pourraient être utilisés pour déterminer la valeur réelle de ce rapport. L'identification de BAC de canne à sucre contenant ces locus et l'établissement d'un *contig* entre ces BAC permettrait d'évaluer la distance physique qui sépare les deux locus.

La canne à sucre possède un génome complexe (hautement polyploïde) avec un génome de base de taille moyenne (0,96 pg par génome de base) (tableau V.1.). La proportion élevée d'ADN répété observée chez les espèces à grand génome est un obstacle au clonage de gène par marche chromosomique car la progression de la marche est considérablement ralentie. Han *et al.* (1998) soulignent l'intérêt d'utiliser un génome de petite taille comme outil d'un "clonage positionnel assisté par synténie". Ceci consiste à isoler des gènes identifiés dans des espèces à génomes complexes par marche chromosomique dans des espèces à petits génomes. Le riz, plante modèle pour les Poacées, est l'espèce la plus adaptée pour servir de support à la marche chromosomique car son génome est de petite taille (0,46 pg par génome haploïde) et une banque BAC de riz sera bientôt complètement ordonnée. Cette stratégie nécessite toutefois la conservation de la colinéarité à une échelle fine (< 1 cM).

Quelques études de comparaison entre les génomes de différentes Poacées illustrent des situations contrastées quant à la conservation de la colinéarité et de la synténie pour des marqueurs distants de 200 kpb à 1Mpb. La comparaison riz-orge, dans la région du gène de résistance à la rouille *Rp1* (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) chez l'orge, indique que la colinéarité est conservée entre les génomes de ces deux espèces pour plusieurs sondes

cartographiées dans un intervalle de 6,5 cM chez l'orge et de 2,7 cM chez le riz, mais un des neuf locus étudiés n'est pas synténique entre les deux espèces (Kilian *et al.*, 1995). Dunford *et al.* (1995) montrent que la colinéarité est conservée dans plusieurs régions synténiques entre le riz et le blé hexaploïde (dont le génome est 40 fois plus grand que celui du riz) pour des marqueurs séparés par une distance inférieure à 1,6 cM (ou 1 Mpb) chez le riz. Une comparaison riz-blé-orge-maïs, indique que la colinéarité est conservée pour des marqueurs distants de 1 Mpb environ dans la région du gène *phl* chez le blé, toutefois des ruptures de synténie ont également été observées pour certains locus (Foote *et al.*, 1990). Gallego *et al.* (1998) ont étudié les relations de synténie entre le riz, le blé et l'orge pour des marqueurs qui coségrègent avec les gènes de résistance à la rouille (*Puccinia recondita*) *Lr1* et *Lr10* chez le blé. Il apparaît que l'organisation des régions homéologues est différente chez le blé et le riz tandis que la synténie est conservée entre le blé et l'orge. Les régions génomiques homéologues correspondant aux locus *Sh2/a1* chez le maïs, le riz et le sorgho sont conservées entre les trois espèces (on retrouve les deux gènes) (Chen *et al.*, 1997 ; Bennetzen *et al.*, 1998). Tikhonov *et al.* (1999) ont observé un maintien de la colinéarité des locus synténiques entre des régions homéologues du maïs (225 kb) et du sorgho (78kb) portant le locus *adh*.

Une marche chromosomique vers le gène de résistance à la rouille fondée sur l'utilisation de la banque BAC de riz nécessiterait la cartographie des BAC de riz sur la carte de R570 à chaque étape de la marche chromosomique afin de s'assurer que la synténie et la colinéarité sont conservées.

La diversité restreinte à la base de la sélection des cultivars modernes de canne à sucre ainsi que le faible nombre de méioses depuis les premiers croisements interspécifiques sont à l'origine de la sur-représentation de certaines combinaisons alléliques pour les locus proches dans les variétés actuelles. Deux études réalisées à partir de différentes variétés ont montré que ce phénomène est réparti sur l'ensemble du génome et qu'il est surtout observé pour des fractions de génomes héritées de l'espèce *S. spontaneum*, qui ne représente que de 15 à 25 % du génome des cultivars modernes (Lu *et al.*, 1994b ; Jannoo *et al.*, 1999b). L'existence de déséquilibres de liaison entre des marqueurs moléculaires et des facteurs génétiques participant à l'élaboration de caractères sélectionnés pourrait être utilisée pour suivre les allèles favorables dans une gamme de matériel. Nous avons montré que les liaisons génétiques observées entre les marqueurs AFLP et le gène de résistance à la rouille chez R570 se retrouvent pour les deux marqueurs étudiés qui ségrègent chez le cultivar brésilien SP82-3349. La proximité d'un ancêtre commun est certainement à l'origine de la conservation de

l'haplotype porteur de la résistance entre ces deux cultivars. L'étude d'autres cultivars, sélectionnés à Maurice, montre que les marqueurs que nous avons étudiés ne sont pas associés à la résistance à la rouille chez ces cultivars, bien que les combinaisons entre ces marqueurs ne semblent pas être aléatoires. L'interprétation de cette étude doit être très prudente car elle est très imparfaite du fait des marqueurs utilisés, des caractéristiques de la population de variétés utilisées ou encore des méthodes d'évaluation du caractère étudié.

Notre travail a donc apporté diverses contributions à l'étude de la résistance à la rouille de la canne à sucre. Il permet d'aborder la cartographie physique de la région porteuse du gène majeur à large étendue d'action. Cette cartographie physique pourra se faire à l'aide de ressources développées sur le riz ou directement sur R570, grâce à la banque BAC disponible, si le rapport des distances génétique et physique le permet. Cette marche sur le chromosome sera l'occasion de produire de nombreuses sondes moléculaires utilisables pour étudier la variation allélique dans cette région. Ceci permettra, le cas échéant, de cibler la recherche de facteurs de résistance complémentaire vers d'autres cultivars.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aarts M.G.M., te Lintel Hekkert B., Holub E.B., Beynon J.L., Stiekema W.J. et Pereira A., 1998. Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 11 : 251-258.

Adam-Blondon A.F., 1994. Cartographie génétique de *Phaseolus vulgaris* L. Localisation de gènes de résistance à l'anthracnose. Thèse de l'INAP-G, Université Paris XI, 183 p.

Ahn S. and Tanksley S.D., 1993. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 : 7980-7984.

Al-Janabi S.M., Honeycutt R.J., McClelland M. et Sobral W.S., 1993. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208'. *Genetics*, 134 : 1249-1260.

Al-Janabi S.M., Honeycutt R.J. et Sobral B.W.S., 1994. Chromosome assortment in *Saccharum*. *Theor. Appl. Genet.*, 89 : 959-963.

Allard R.W., 1960. Principles of plant breeding. Jhon Wiley & Sons, Inc., New York.

Anderson D.L., Raid R.N., Irey M.S. et Henderson L.J., 1990. Association of sugarcane rust severity with soil factors in Florida. *Plant Disease*, 74 : 683-686.

Arceneaux G., 1967. Cultivated sugarcane of the world and their botanical derivation. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.*, 6 : 116-128.

Artschawager E., 1925. Anatomy of the vegetative organs of sugar cane. *J. Agric. Res.*, 30: 197-221.

Baker B., Zambryski P., Staskawicz B. et Dinesh-Kumar S.P., 1997. Signaling in plant-microbe interactions. *Science*, 276 : 726-733.

Ballvora A., Hesselbach J., Niewöhner J., Leister D., Salamini F. et Gebhardt C., 1995. Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene *Gro1*. *Mol. Gen. Genet.*, 249 : 82-90.

Beavis W.D., Grant D., Albertsen M. et Fincher R., 1991. Quantitative trait loci for plant height in four maize populations and their associations with qualitative genetic loci. *Theor. Appl. Genet.*, 3 : 141-145.

Bent A.F., Kunkel B.N., Dahlbeck D., Brown K.L., Schmidt R., Giraudat J., Leung J. et Staskawicz B.J., 1994. *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science*, 265 : 1856-1860.

Bennett M.D. et Leitch I.J., 1995. Nuclear DNA amount in angiosperms. *Ann. Bot.*, 76 : 113-176.

Bennetzen J.L. et Freeling M., 1998. The unified grass genome: synergy in synteny. *Genome Res.*, 7 : 301-306.

Binelli G., Gianfranceschi L., Pè M.E., Taramino G., Busso C., Stenhouse J. et Ottaviano E., 1992. Similarity of maize and sorghum genomes as revealed by maize RFLP probes. *Theor. Appl. Genet.*, 84 : 10-16.

Bonierbale M.W., Plaisted R.L. et Tanksley S.D., 1988. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics*, 120 : 1095-1103.

Browder L.E., 1964. A modified detached-leaf culture technique for study of cereal rusts. *Plant Dis. Rep.*, 48: 906-908.

Burr B. et Burr F.A., 1991. Recombinant inbreds for molecular mapping in maize. *Trends in Genetics*, 7 (2) : 55-60.

Cai D.G., Kleine M., Kifle S., Harloff H.J., Sandal N.N., Marcker K.A., Klein-Lankhorst R.M., Salentijn E.M.J., Lange W., Stiekema W.J., Wyss U., Grundler F.M.W. et Jung C., 1997. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science*, 275 : 832-834.

Caranta C., 1995. Dissection génétique de résistances complexes à plusieurs virus chez le piment (*Capsicum annuum* L.) à l'aide de marqueurs moléculaires : organisation des facteurs de résistance sur le génome. Thèse de l'Université de la Méditerranée, 182 p.

Causse M.A., Fulton T.M., Cho Y.G., Ahn S.N., Chunwongse J., Wu K., Xiao J., Yu Z., Ronald P.C., Harrington S.E., Second G., McCouch S.R. et Tanksley S.D., 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics*, 138 : 1251-1274.

Cervera M.T., Gusmão J., Steenackers M., Peleman J., Storme V., Vanden Broeck A., Van Montagu M. et Boerjan W., 1996. Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in *Populus*. *Theor. Appl. Genet.*, 93 : 733-737.

Chagué V., Mercier J.C., Guénard M., de Courcel A. et Vedel F., 1996. Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked to *Sw-5* in tomato by bulked segregant analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 92 : 1045-1051.

Chao S., Sharp P.J. et Gale M.D., 1988. A linkage map of wheat homoeologous group 7 chromosomes using RFLP markers. Dans : *Proceeding 7th International Wheat Genet. Symposium*. Miller T.E. et Koebner R.M.D. (eds), IPSR, Cambridge laboratory, Cambridge, Grande-Bretagne, pp 493-498.

Chao S., Baysdorfer C., Heredia-Diaz O., Musket T., Xu G. et Coe E.H., 1994. RFLP mapping of partially sequenced leaf cDNA clones in maize. *Theor. Appl. Genet.*, 88 : 717-721.

Chen M., SanMiguel P., de Oliveira A.C., Woo S.S., Zhang H., Wing R.A. et Bennetzen J.L., 1997. Microcolinearity in *sh2*-homologous regions of the maize, rice, and sorghum genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 : 3431-3435.

- Chen D.H., della Viña M., Inukai T., Mackill D.J., Ronald P.C. et Nelson R.J.**, 1999. Molecular mapping of the balst resistance gene, *Pi44(t)*, in a line derived from a durably resistant rice cultivar. *Theor. Appl. Genet.*, 98 : 1046-1053.
- Chu T.L., Serapion J.L. et Rodriguez J.L.**, 1982. Varietal reaction and inheritance trends of susceptibility of sugarcane to rust (*Puccinia melanocephala* H. & P. Syd). *The Journal of agriculture of the University of Puerto Rico*, LXVI(2) : 99-108.
- Collins N.C., Webb C.A., Seah S., Ellis J.G., Hulbert S.H. et Pryor A.**, 1998. The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 11(10) : 968-978.
- Comstock J.L.**, 1985. A new race of rust suspected. Hawaiian Sugar Planters' Association Experiment Station, Annual Report.
- Comstock J.C. et Ferreira S.A.**, 1986. Sugarcane rust: factors infection and symptom development. *Proceeding of International Society of Sugar Cane Technologists congress*, 19 : 403-410.
- Comstock J.C., Wu K.K. et Schnell R.J.**, 1992a. Heritability of resistance to sugar cane rust. *Sugar Cane*, 6 : 7-10.
- Comstock J.C., Shine J.M. et Raid R.N.**, 1992b. Effect of early rust infection on subsequent sugar cane growth. *Sugar Cane*, 4 : 7-9.
- Comstock J.C. et Raid R.N.**, 1994. Sugarcane common rust. Dans : *Current Trends in Sugarcane Pathology*. Rao G.P., Gillaspie A.G., Upadhyaya P.P., Bergamin A., Agnihotri V.P. et Chen C.T (eds), International Books & Periodicals Supply Service, Pitampura, Delhi, pp 1-10.
- Comstock J.C., Shine J.M., Dean J.L. et Irey M.S.**, 1994. Races of the common rust pathogen, *Puccinia melanocephala*, in Florida. *Phytopathology*, 84(8) : 867.
- Crute I.R.**, 1985. The genetics bases of relationships between microbial parasites and their hosts. Dans : *Mechanisms of resistance to plant diseases*. Fraser R.S.S. (ed), Junk Publishers, Grande-Bretagne, pp 80-142.
- Crute I.R.**, 1992. From Breeding to cloning (and back again?): a case study with lettuce downy mildew. *Annual Reviews of Phytopathology*, 30 : 485-506.
- D'Hont A., Lu Y.H., Gonzalez de Leon D., Grivet L., Feldmann P., Lanaud C. et Glaszmann J.C.**, 1994. A molecular approach to unraveling the genetics of sugarcane, a complex polyploid of the Andropogoneae tribe. *Genome*, 37 : 222-230.
- D'Hont A., Grivet L., Feldmann P., Rao S., Berding N. et Glaszmann J.C.**, 1996. Characterization of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Mol. Gen. Genet.*, 250 : 405-413.

- D'Hont A., Ison D., Alix K., Roux C. et Glaszmann J.C.**, 1998. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. *Genome*, 41 : 221-225.
- Danesh D., Aarons S., McGill G.E. et Young N.D.**, 1994. Genetic dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 7(4) : 464-471.
- Daniels J. et Roach B.T.**, 1987. Taxonomy and evolution. Dans : Sugarcane improvement through breeding. Heinz D.J. (ed). Elsevier Press, Amsterdam, Pays-Bas, pp 7-84.
- Da Silva J.A.G., Sorells M.E., Burnquist W.L. et Tanksley S.D.**, 1993. RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*. *Genome*, 36 : 782-791.
- Da Silva J., Honeycutt R., Burnquist W., Al-Janabi S.M., Sorells M.E., Tanksley S.D. et Sobral W.S.**, 1995. *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208' genetic linkage map combining RFLP- and PCR-based markers. *Molecular Breeding*, 1 : 165-179.
- Daugrois J.H., Grivet L., Roques D., Hoarau J.Y., Lombard H., Glaszmann J.C. et D'Hont A.**, 1996. A putative major gene for rust resistance linked with a RFLP marker in sugarcane cultivar "R570". *Theor. Appl. Genet.*, 92 : 1059-1064.
- Dean J.L. et Purdy L.H.**, 1984. Races of the sugarcane rust fungus, *Puccinia melanocephala*, found in Florida. *Sugar Cane*, 1 : 15-16.
- de Vienne D.**, 1998. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. de Vienne D. (ed). INRA, Paris, France, p 200.
- Devos K.M. et Gale M.D.**, 1997. Comparative genetics in the grasses. *Plant Mol. Biol.*, 35 : 3-15.
- de Wet J.M.J.**, 1980. Origins of polyploids. Dans : Polyploidy biology relevance. Lewis W.H. (ed). Plenum Press, New-York, USA.
- De Wit J.G.M.**, 1997. Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2(12) : 452-458.
- Dickinson M.J., Jones D.A. et Jones J.D.G.**, 1993. Close linkage between the *Cf-2/Cf-5* and *Mi* resistance loci in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 6(3) : 341-347.
- Dixon R.A., Jones D.A., Keddie J.S., Thomas C.M., Harrison K. et Jones J.D.G.**, 1996. The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell*, 84(3) : 451-459.
- Dufour P., Grivet L., D'Hont A., Deu M., Trouche G., Glaszmann J.C. et Hamon P.**, 1996. Comparative genetic mapping between duplicated segments on maize chromosomes 3 and 8 and homoeologous regions in sorghum and sugarcane. *Theor. Appl. Genet.*, 92 : 1024-1030.

- Dufour P., Deu M., Grivet L., D'Hont A., Paulet F., Bouet A., Lanaud C., Glaszmann J.C. et Hamon P., 1997.** Construction of a composite sorghum genome map and comparison with sugarcane, a related complex polyploid. *Theor. Appl. Genet.*, 94 : 409-418.
- Elias M., 1996.** Contribution à la cartographie du génome d'un polyploïde complexe, la canne à sucre (*Saccharum* spp.), au moyen de marqueurs AFLP. Rapport de DEA, Montpellier II, p 28.
- Dunford R.P., Kurata N., Laurie D.A., Money T.A., Minobe Y. et Moore G., 1995.** Conservation of fine-scale DNA marker order in the genomes of rice and Triticeae. *Nucleic Acids Res.*, 23(14) : 2724-2728.
- Farrara B.F., Ilot T.W. et Michelmore R.W., 1987.** Genetic analysis of factor for resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in species of lettuce (*Lactuca sativa* and *L. serriola*). *Plant Pathol.*, 36 : 499-514.
- Fauconnier R. et Bassereau D., 1970.** Génétique et sélection. Dans : La canne à sucre. Maisonneuve et Larose (eds), Paris, France, pp 27-53.
- Feldmann P., Rott P., Oriol P., Paulet F., Daugrois J. et Sapotille J., 1997.** Use of tissue culture of sugarcane for rapid propagation and disease control in Guadeloupe. Medio siglo de investigaciones caneras en Cuba/INICA Congress 23-27 June, Jovellanos-Mayari, Cuba, pp 1-5.
- Flor H.H., 1955.** Host-parasite interaction in flax rust. Its genetics and other implications. *Phytopathol.*, 45 : 680-685.
- Foote T., Roberts M., Kurata N., Sasaki T. et Moore G., 1997.** Detailed comparative mapping of cereal chromosome regions corresponding to the *Phl* locus in Wheat. *Genetics*, 147 : 801-807.
- Gallego F., Feuillet C., Messner M., Penger A., Graner A., Yano M., Sasaki T. et Keller B., 1998.** Comparative mapping of the two wheat leaf rust resistance loci *Lr1* and *Lr10* in rice and barley. *Genome*, 41 : 328-336.
- Giese H., 1981.** Powdery mildew resistance genes in the *Ml-a* and *Ml-k* regions on barley chromosome 5. *Hereditas*, 95 : 51-62.
- Giese H., Jorgensen J.H., Jensen H.P. et Jensen J., 1981.** Linkage relationships of ten powdery mildew resistance genes on barley chromosome 5. *Hereditas* 95 : 43-50.
- Giese H., Holm-Jensen A.G., Jensen H.P. et Jensen J., 1993.** Localization of the Laevigatum powdery mildew resistance gene to barley chromosome 2 by the use of RFLP markers. *Thor. Appl. Genet.*, 85 : 897-900.
- Glaszmann J.C., Dufour P., Grivet L., D'Hont A., Deu M., Paulet F. et Hamon P., 1997.** Comparative genome analysis between several tropical grasses. *Euphytica*, 96 : 13-21.
- Goettlieb L.D., 1982.** Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science*, 216 : 373-380.

Grant M.R., Godiard L., Straube E., Ashfield T., Lewald J., Sattler A., Innes R.W. et Dangl J.L., 1995. Structure of the *Arabidopsis RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science*, 269 : 843-846.

Grivet L., D'Hont A., Dufour P., Hamon P., Roques D. et Glaszmann J.C., 1994. Comparative genome mapping of sugarcane with other species within the Andropogoneae tribe. *Heredity* 73 : 500-508.

Grivet L., 1995. Marquage moléculaire chez la canne à sucre (*Saccharum* spp.) ; décomposition d'une structure génétique complexe et application à l'amélioration variétale. Thèse de l'Université de Paris XI, p 117.

Grivet L., D'Hont A., Roques D., Feldmann P., Lanaud C. et Glaszmann J. C., 1996. RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp.): genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. *Genetics*, 142 : 987-1000.

Guimaraes C.T., Sills G.R. et Sobral B.W., 1997. Comparative mapping of Andropogoneae: *Saccharum* L. (sugarcane) and its relation to sorghum and maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 : 14261-14266.

Haldén C., Säll T., Olsson K., Nilson N.L. et Hjerdin A., 1997. The use of bulked segregant analysis to accumulate RAPD markers near a locus for beet cyst nematode in *Beta vulgaris*. *Plant Breeding*, 116 : 18-22.

Hammond-Kosack K.E. et Jones J.D.G., 1997. Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48 : 575-607.

Han F., Kleinhofs S.E., Ulrich A., Kilian A., Yano M. et Sasaki T., 1998. Synteny with rice: analysis of barley malting quality QTLs and *rpg4* chromosome regions. *Genome*, 41 : 373-380.

Heredia D.O., Gardiner J., Hoisington D., Chao S.M., Coe E., Musket T. et Xu G.L., 1994. Combined f₂ and if₂ RFLP map. *Maize Genetics Cooperation News Letter*, 68 : 30-35.

Helentjaris T., Weber D. et Wright S., 1988. Identification of the genomic locations of duplicated nucleotide sequences in maize by analysis of restriction fragment length polymorphisms. *Genetics*, 118 : 353-363.

Hoarau J.Y., Offmann B., D'Hont A., Glaszmann J.C. et Grivet L. Genome mapping of a modern hybrid sugarcane (*Saccharum* spp.) using AFLP markers, en préparation.

Hoisington D.A. et Coe E.H., 1990. Mapping in maize using RFLP's. Dans : *Gene manipulation in plant improvement*. Gustafson J.P. (ed), Plenum Press, New York, USA, pp 331-351.

Hoisington D., 1992. Laboratory protocols. CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Mexico, D.F. CIMMYT.

- Hooker A.L.**, 1985. Corn and Sorghum rusts. Dans : The Cereals Rusts. Roelfs A.P. et Bushnell W.R. (eds). Academic Press, London, Angleterre. pp 207-235.
- Hulbert S.C., Richter T.E., Axtell J.D. et Bennetzen J.L.**, 1990. Genetic mapping and characterization of sorghum and related crops by means of maize DNA probes. *Genetics*, 87 : 4251-4255.
- Hunsigi G.**, 1993. Introduction. Dans : Production of Sugarcane. Van Vleck (eds). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 12-28.
- Islam M.R. et Mayo G.M.E.**, 1990. A compendium on host genes in flax conferring resistance to flax rust. *Plant Breeding*, 104 : 89-100.
- Jannoo N., Grivet L., Seguin M., Paulet F., Domaingue R., Rao P.S., Dookun A., D'Hont A. et Glaszmann J.C.**, 1999a. Molecular investigation of the genetic base of sugarcane cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 99 : 171-184.
- Jannoo N., Grivet L., Dookun A., D'Hont A. et Glaszmann J.C.**, 1999b. Linkage disequilibrium among modern sugarcane cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 99 : 1053-1060.
- Jannoo N., Grivet L., David J., Dookun A., D'Hont A. et Glaszmann J.C.** Investigation assortment in sugarcane cultivar R570. en préparation.
- Johal G.S. et Briggs S.P.**, 1992. Reductase activity encoded by the *HMI* disease resistance gene in maize. *Science*, 258 : 985-987.
- Jones D.A., Dickinson M.J., Balintkurti P.J., Dixon M.S. et Jones J.D.G.**, 1993. Two complex resistance loci revealed in tomato by classical and RFLP mapping of *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5* and *Cf-9* genes for resistance to *Cladosporium fulvum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 6(3) : 348-357.
- Jones D.A., Thomas C.M., Hammond-Kosack K.E., Balintkurti P.J. et Jones J.D.G.**, 1994. Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science*, 266 : 789-793.
- Jorgensen J.H.**, 1992. Multigene families of powdery mildew resistance genes in locus *Mla* on barley chromosome 5. *Plant Breeding*, 108 : 53-59.
- Kanazin V., Marek L.F. et Shoemaker R.C.**, 1996. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc. Natl. Acad. USA*, 93 : 11746-11750.
- Kellogg E.A. et Birchler J.A.**, 1993. Linking phylogeny and genetics: *Zea mays* as a tool for phylogenetic studies. *Syst. Biol.*, 42 : 415-439.
- Kesseli R., Witsenboer H., Stanghellini M., Vandermark G. et Michelmore R.**, 1993. Recessive resistance to *Plasmopora Lactucae-Radicis* maps by bulked segregant analysis to a cluster of dominant disease resistance genes in lettuce. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 6(6) : 722-728.

- Kesseli R., Paran I. et Michelmore R.W.**, 1994. Analysis of a detailed genetic linkage map of *Lactuca sativa* (lettuce) constructed from RFLP and RAPD markers. *Genetics*, 136(4) : 1435-1446.
- Kilian A., Kudrna D.A., Kleinhofs A., Yano M., Kurata N., Steffenson B. et Sasaki T.**, 1995. Rice-barley synteny and its application to saturation mapping of the barley *Rpg1* region. *Nucleic Acids Res.*, 23(14) : 2729-2733.
- Kunkel B.N.**, 1996. A useful weed put to work: genetic analysis of disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Trends Genet.*, 12(2) : 63-69.
- Kurata N., Nagamura Y., Yamamoto K., Harushima Y., Sue N., Wu J., Antonio B.A., Shomura A., Shimizu T., Lin S.Y., Inoue T., Fukuda A., Shimano T., Kuboki Y., Toyama T., Miyamoto Y., Kirihara T., Hayasaka K., Miyao A., Monna L., Zhong H.S., Tamura Y., Wang Z.X., Monna T., Umehara Y., Yano M., Sasaki T. et Minobe Y.**, 1994. A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nature Genetics*, 8: 365-372.
- Lahaye T., Hartmann S., Töpsch S., Freialdenhoven A., Yano M. et Schulze-Lefert P.**, 1998. High-resolution genetic and physical mapping of *Rar1* locus in Barley. *Theor. Appl. Genet.*, 97 : 526-534.
- Lander E., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J. Lincoln S.E. et Newberg S.**, 1987. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1 : 174-181.
- Lawrence G.J., Finnegan E.J., Ayliffe M.A. et Ellis J.G.**, 1995. The *L6* gene for flax rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene *N*. *Plant Cell*, 7(8) : 1195-1206.
- Lefebvre V. et Palloix A.**, 1996. Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease. A case study, the interaction pepper-*Phytophthora capsici* Leonian. *Theor. Appl. Genet.*, 93(4) : 503-511.
- Leister D., Ballvora A., Salamini F. et Gebhart C.**, 1996. A PCR-based approach for isolating pathogen from tomato with potential for wide application in plants. *Nat. Genet.*, 14 : 421-429.
- Leister D., Kurth J., Laurie D. A., Yano M., Sasaki T., Devos K., Graner A. et Schulze-Lefert P.**, 1998. Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes. *Proc. Natl. Acad. USA*, 95 : 370-375.
- Lin Y.R., Schertz K.F. et Paterson A.H.**, 1995. Comparative analysis of QTLs affecting plant height and maturity across the Poaceae, in reference to an interspecific sorghum population. *Genetics*, 141 : 391-411.
- Littlefield L.J.**, 1981. Biology of the plant rusts, an introduction. Iowa state university, Ames, USA, p 103.

- Liu J.L.**, 1980. Observation and consideration on sugarcane rust incidence, varietal reaction and possible occurrence of physiologic races. *Sugarcane Pathol. Newsl.*, 25 : 5.
- Lu Y.H., D'Hont A., Walker D.I.T., Rao P.S., Feldmann P. et Glaszmann J.C.**, 1994a. Relationships among ancestral species of sugarcane revealed with RFLP using single copy maize nuclear probes. *Euphytica*, 78 : 7-18.
- Lu Y.H., D'Hont A., Paulet F., Grivet L., Arnaud M. et Glaszmann J.C.**, 1994b. Molecular diversity and genome structure in modern sugarcane varieties. *Euphytica*, 78 : 217-226.
- Maisonneuve B., Bellec Y., Anderson P. et Michelmore R.W.**, 1994. Rapid mapping of two genes for resistance to downy mildew from *Lactuca serriola* to existing clusters of resistance genes. *Theor. Appl. Genet.*, 89(1) : 96-104.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook L.**, 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Ford N., Nolan C., Fergusson M., Ockler M. (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Mather K.**, 1957. Measurement of linkage in heredity. Methuen & Co. LTD, London.
- Martin G.B., Brommonschenkel S.H., Chunwongse J., Frary A., Ganai M.W., Spivey R., Wu T.Y., Earle E.D. et Tanksley S.D.**, 1993. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262 : 1432-1436.
- Mcmullen M.D. et Simcox K.D.**, 1995. Genomic organization of disease and insect resistance gene in maize. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 8(6) : 811-815.
- Meksem K., Leister D., Peleman J., Zabeau M., Salamini F. et Gebhardt C.**, 1995. A high-resolution map of the vicinity of the *R1* locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Mol. Gen. Genet.*, 249 : 74-81.
- Melake-Berhan A., Hulbert S.H., Butler L.G. et Bennetzen J.L.**, 1993. Structure and evolution of the genome of *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *Theor. Appl. Genet.*, 86 : 598-604.
- Michelmore R.W., Paran I. et Kesseli R.V.**, 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 : 9828-9832.
- Michelmore R.W., Anderson P.A., Okubara P. et Witsenboer H.**, 1994. Clusters of resistance genes in lettuce. IVth International Congress of the Plant Molecular Biology, Amsterdam, Pays-Bas, pp 19-24.
- Ming R., Liu S.C., Lin Y.R., Da Silva J., Wilson W., Braga D., Van Deynze A., Wenslaff T.F., Wu K.K., Moore P.H., Burnquist W., Sorrels M.E., Irvine J.E. et Paterson A.H.**, 1998. Detailed alignment of *Saccharum* and sorghum chromosomes: comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. *Genetics*, 150: 1663-1682.

- Moore P.H.**, 1987. Anatomy and morphology. Dans : Sugarcane improvement through breeding. Heinz D.J. (ed). Elsevier Press, Amsterdam, Pays-Bas, pp 85-142.
- Moore G., Devos K.M., Wang Z. et Gale M.D.**, 1995a. Grasses, line up and form a circle. *Cur. Biol.*, 5(7) : 737-739.
- Moore G., Foote T., Helentjaris T., Devos K., Kurata N. et Gale M.**, 1995b. Was there a single ancestral cereal chromosome ? *Trends Genet.*, 11(3) : 81-82.
- Moore G.**, 1995c. Cereal genome evolution: pastoral pursuits with "lego" genomes. *Current opinion in genetics & development*, 5 : 717-724.
- Moury B.**, 1997. Evaluation de sources de résistance au Tomato spotted wilt virus chez le piment. Création d'outils d'aide à la sélection. Thèse de L'ENSAR, p 203.
- Nelson R.R.**, 1978. Genetics of horizontal resistance to plant diseases. *Ann. Rev. Phythopathol.*, 16 : 359-378.
- Ori N., Eshed Y., Paran I., Presting G., Aviv D., Tanksley S., Zamir D. et Fluhr R.**, 1997. The *I2C* family from the wilt disease resistance locus *I2* belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *Plant Cell*, 9(4) : 521-532.
- Paterson A.H., Lin Y.R., Li Z., Schertz K.F., Doebley J.F., Pinson S.R.M., Liu S.C., Stansel J.W. et Irvine J.E.**, 1995. Convergent domestication of cereal crops by independent mutations at corresponding genetic loci. *Science*, 269 : 1714-1718.
- Parker J., Coleman M.J., Szabo V., Frost L.N., Schmidt R., Van Der Biezen E.A., Moores T., Dean C., Daniels M.J. et Jone J.D.G.**, 1997. The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene *RPP5* shares similarity to the Toll and Interleukin-1 receptors with *N* and *L6*. *Plant Cell*, 9 : 879-894.
- Pereira M.G., Lee M., Bramel-Cox P., Woodman W., Doebley J. et Whitkus R.**, 1994. Construction of an RFLP map in sorghum and comparative mapping in maize. *Genome*, 37 : 236-243.
- Pereira M.G. et Lee M.**, 1995. Identification of genomic regions affecting plant height in sorghum and maize. *Theor. Appl. Genet.*, 90 : 380-388.
- Peros J.P. et Lombard H.**, 1986. Epidemiology of sugar cane rust in Reunion. *Sugar Cane*, 3 : 15-17.
- Peros J.P. et Bonnel E.**, 1989. Utilisations de la culture *in vitro* de la canne à sucre en pathologie : cas de la striure, de la gommose et de la rouille. *L'agron. Trop.*, 44 (4) : 321-326.
- Peros J.P.**, 1990a. Relations entre les teneurs en minéraux des limbes de canne à sucre et l'infection par *Puccinia melanocephala*. I- Essais en pot. *L'agron. Trop.*, 45 (3) : 205-212.
- Peros J.P.**, 1990b. Relations entre les teneurs en minéraux des limbes de canne à sucre et l'infection par *Puccinia melanocephala*. II- Essais au champ. *L'agron. Trop.* 45 (3): 223-219.

- Price S.**, 1963. Cytological studies in *Saccharum* and allied genera. VIII. F2 and BC1 progenies from 112- and 136-chromosome *S. officinarum* x *S. spontaneum* hybrids. Bot. Gaz., 124 : 186-190.
- Pryor T.**, 1987. The origin and structure of fungal disease resistance gene in plants. Trends Genet., 3 : 157-161.
- Pryor T. et Ellis J.**, 1993. The genetic complexity of fungal resistance genes in plants. Adv. Plant Pathol., 10 : 281-305.
- Purdy L.H., Liu L.J. et Dean J.L.**, 1983. Sugarcane rust, a newly important disease. Plant disease, 67(11) : 1292-1296.
- Raid N.R.**, 1989. Physiological specialization in sugarcane rust (*Puccinia melanocephala*) in Florida. Plant Disease, 73 : 183.
- Rajhathy et Thomas**, 1974. Cytogenetics of oats (*Avena* L.) Misc. Publ. Genet. Soc. Canada No. 2, Ottawa, Ontario.
- Robertson D.S.**, 1989. Understanding the relationship between qualitative and quantitative genetics. Dans : Development and application of molecular markers to problems in plant genetics. Helentjaris T. et Burr B. (eds), Cold Spring Harbor, New York, USA, pp 81-87.
- Robbins M.A., Witsenboer H., Michelmore R.W., Laliberte J.F. et Fortin M.G.**, 1994. Genetic mapping of turnip mosaic virus resistance in *Lactuca sativa*. Theor. Appl. Genet., 89(5) : 583-589.
- Rott P., Bousquet J.F., Muller M. et Chatenet M.**, 1997. La quarantaine de canne à sucre du Cirad à Montpellier. Agriculture et développement, 13 : 22-28.
- Ryan C.C. et Egan B.T.**, 1989. Rust. Dans : Diseases of sugarcane. Ricaud C., Egan B.T., Gillaspie A.G. et Hughes C.G. (eds), Elsevier, Amsterdam, Pays-Bas, pp 189-210.
- Sandoval I., Picornell V., Chaves R. et Ramos N.**, 1983. *Puccinia melanocephala* H. & P. Syd.: Biological and ecological aspects. Sugar Cane, 2 : 15-18.
- Saxena K.M.S. et Hooker A.L.**, 1968. On the structure of a gene for disease resistance in maize. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68 : 1300-1305.
- Simons G., van der Lee T., Diergaard P., van Daelen R., Groenendijk J., Fritjers A., Büschges R., Hollricher K., Töpsch S., Schulze-Lefert P., Salamini F., Zabeau M. et Vos P.**, 1997. AFLP-based fine mapping of the *Mlo* gene to a 30-kb DNA segment of the barley genome. Genomics, 44 : 61-70.
- Snedecor G.W. et Cochran W.G.**, 1967. Statistical methods. 6th ed. Iowa State Univ. Press, Ames, USA, pp 66-90.
- Staskawicz B.J., Ausubel F.M., Baker B., Ellis J.G. et Jones J.D.G.**, 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. Science, 268 : 661-667.

Song W.Y., Wang G.L., Chen L.L., Kim H.S., Pi L.Y., Holsten T., Gardner J., Wang B., Zhai W.X., Zhu L.H., Fauquet C. et Ronald P., 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, 270 : 1804-1806.

Sotomayor I.A., Purdy L.H. et Trese T., 1983. Infection of sugarcane leaves by *Puccinia melanocephala*. *The american phytopathological Society*, 5 : 695-699.

Srinivasan K.V. et Muthaiyan M.C., 1965. A note on physiologic races in *Puccinia erianthi* Padw. and Khan affecting sugar-cane varieties. *International society of sugar cane technologists congress, Proc. XII, Puerto Rico, mar-appr 28-1, Elsevier, Amsterdam*, pp 1126-1129.

Stevenson G.C., 1965. The history of Sugar Cane Improvement. Dans : *Genetics and breeding of sugar cane*. Rhind D. (ed), Longmans, London, Grande-Bretagne, pp 39-71.

Tai P.Y.P., Miller J.D. et Dean J. L., 1981. Inheritance of resistance to rust in sugarcane. *Field Crops Res.*, 4 : 261-268.

Tai P.Y.P., Miller J.D., Comstock J.C. et Glaz B., 1998. Frequency distribution of rust resistance in breeding populations of the Canal Point sugarcane cultivar development program. *Sugar Journal*, 61(1) : 36-41.

Taylor P.W.J., Hogarth D.M. et Ryan C.C., 1982. Progress report inheritance of resistance to rust disease caused by *Puccinia melanocephala* H. & P. Syd, Bureau of sugarcane experiment stations, Queensland, Australia.

Taylor P.W.J., 1992. Evidence for the existence of a single race of common rust caused by *Puccinia melanocephala*, in australian sugarcane cultivars. *Aus. J. Agric. Res.*, 48 : 443-450.

Tikhonov A.P., SanMiguel P.J., Nakajima Y., Gorenstein N.M., Bennetzen J.L. et Avramova Z., 1999. Colinearity and its exceptions in orthologous *adh* regions of maize and sorghum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 : 7409-7414.

Thoquet P., Olivier J., Sperisen C., Rogowsky P., Latterot H. et Grimsley N., 1996. Quantitative trait loci determining resistance to bacterial wilt in tomato cultivar Hawaii7996. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 9(9) : 826-836.

Tomkins J.P., Yu Y., Miller-Smith H., Frisch D.A., Woo S.S. et Wing R., 1999. A bacterial artificial chromosome library for sugarcane. *Theor. Appl. Genet.*, 99 : 419-424.

Van Der Beek J.G., Pet G. et Lindhout P., 1994. Resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersicum*) in *Lycopersicum hirsutum* is controlled by an incompletely dominant gene *Ol-1* on chromosome 6. *Theor. Appl. Genet.*, 89(4) : 467-473.

Van Der Plank J.E., 1968. *Disease resistance in plants*. New York, USA, Academic Press.

Van Deynze A.E., Nelson J.C., Yglesias E.S., Harrington S.E., Braga D.P., McCouch S.R. et Sorrells M.E., 1995a. Comparative mapping in grasses. Wheat relationships. *Mol. Gen. Genet.*, 248 : 744-754.

Van Deynze A.E., Nelson C., O'Donoghue L.S., Ahn S.N., Siripoonwiwat W., Harrington S.E., Yglesias E.S., Braga D.P., McCouch S. et Sorrells M.E., 1995b. Comparative mapping in grasses. Oat relationships. *Mol. Gen. Genet.*, 249 : 349-356.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van der Lee T., Hornes M., Fritjers A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. et Zabeau M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23 : 4407-4414.

Walker D.I.T., 1987. Breeding for disease resistance. Dans : Sugarcane improvement through breeding. Heinz D.J. (ed), Elsevier Press, Amsterdam, Pay-Bas, pp 455-502.

Whitham S., Dinesh-Kumar S.P., Choi D., Hehl R., Corr C. et Baker B., 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to *Toll* and the interleukin-1 receptor. *Cell*, 78 : 1101-1115.

Whitham S., McCormick S. et Baker B., 1996. The *N* gene tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 93(16) : 8776-8781.

Whitkus R., Doebley J. et Lee M., 1992. Comparative genome mapping of sorghum and maize. *Genetics*, 132 : 1119-1130.

Whittle A.M., 1980. Do races exist in pathogens of sugarcane? Dans: Inter-American Sugar Cane Seminar: Cane Disease, Miami, pp 16-19.

Wilson W.A., Harrington S.E., Woodmann W.L., Lee M., Sorrells M.E. et McCouch S., 1999. Inferences on the genome structure of progenitor maize through comparative analysis of rice, maize and the domesticated panicoids. *Genetics*, 153 : 453-473.

Witsenboer H., Kesseli R.V., Fortin M.G., Stanghellini M. et Michelmore R.W., 1995. Sources and genetic structure of a cluster of genes for resistance to three pathogens in lettuce. *Theor Appl. Genet.*, 91(1) : 178-188.

Wu K.K., Burnquist W., Sorrells M.E., Tew T.L., Moore P.H. et Tanksley S.D., 1992. The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. *Theor. Appl. Genet.*, 83 : 294-300.

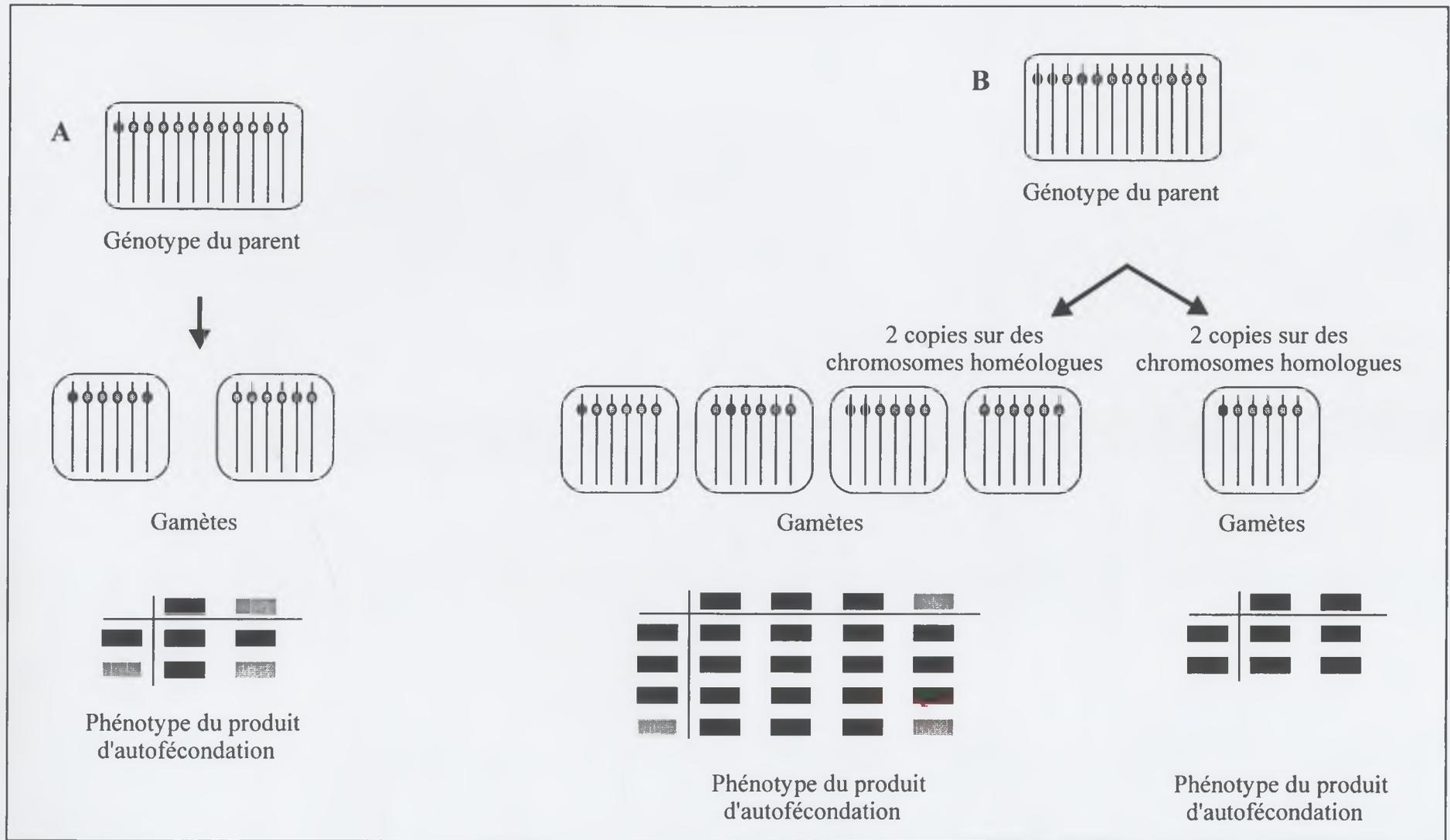
Xu G.W., Magill C.W., Schertz K.F. et Hart G.E., 1994. A RFLP linkage map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Theor. Appl. Genet.*, 89 : 139-145.

Yu Y.G., Buss G.R. et Saghai Maroof M.A., 1996. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes from soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proc. Natl. Acad. USA*, 93 : 11751-11756.

Zamir D., Ekstein-Michelson I., Zakay Y., Navot N., Zeidan M., Sarfatti M., Eshed Y., Harel E., Pleban T., Vanoss H., Kedar N., Rabinowitch H.D. et Czosnek H., 1994. Mapping of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *TY-1*. *Theor. Appl. Genet.*, 88(2) : 141-146.

Zhang H.B. et Wing R.A., 1997. Physical mapping of the rice genome with BACs. *Plant Mol. Biol.*, 35 : 115-127.

ANNEXES



Annexe 1 : Ségrégation d'un allèle simple dominant chez un polyploïde (12X) dont la ségrégation est disomique ou polysomique (A) et ségrégation d'un allèle duplex dominant chez un polyploïde dont la ségrégation est disomique (B).

ANNEXE 2

Distinction entre les marqueurs simplex et les marqueurs duplex (d'après Mather, 1957)

Calculons les χ^2 sous l'hypothèse de marqueurs simplex et duplex pour niveau de ploïdie, h , élevé :

$$\chi^2_{simplex} = \frac{([+]n - \frac{3}{4}n)^2}{\frac{3}{4}n} + \frac{([-]n - \frac{1}{4}n)^2}{\frac{1}{4}n}$$

$$\chi^2_{duplex} = \frac{([+]n - \frac{15}{16}n)^2}{\frac{15}{16}n} + \frac{([-]n - \frac{1}{16}n)^2}{\frac{1}{16}n}$$

La comparaison de ces χ^2 (1), qui ont le même nombre de degrés de liberté, permettra de déduire une relation simple (2) que l'on peut utiliser pour distinguer les marqueurs simplex (qui ségrègent 3:1) des marqueurs duplex (qui ségrègent 15:1) ou multiplex d'une façon générale.

$$(1) \quad \chi^2_{simplex} < \chi^2_{duplex}$$

$$(2) \quad [+] / [-] < 6,7$$

ANNEXE 3

Probabilité d'obtention de faux positifs avec la BSA

Considérons un caractère contrôlé par un gène majeur dominant (R/r) lié en couplage à un marqueur moléculaire également dominant (M/m) dans une population en ségrégation. La probabilité d'obtenir des faux positifs correspond à la probabilité d'observer un marqueur polymorphe entre les *bulks* [R] et [r] alors qu'il n'est pas lié au locus ciblé. Le tableau ci-dessous récapitule les différents gamètes produits par les individus de la génération F1 et le phénotype des individus de la génération F2 ainsi que les probabilités qui leurs sont associées.

	RM $\frac{1-r}{2}$	Rm $\frac{r}{2}$	rM $\frac{r}{2}$	rm $\frac{1-r}{2}$
RM $\frac{1-r}{2}$	[RM] $\frac{(1-r)^2}{4}$	[RM] $\frac{r-r^2}{4}$	[RM] $\frac{r-r^2}{4}$	[RM] $\frac{(1-r)^2}{4}$
Rm $\frac{r}{2}$	[RM] $\frac{r-r^2}{4}$	[Rm] $\frac{r^2}{4}$	[RM] $\frac{r^2}{4}$	[Rm] $\frac{r-r^2}{4}$
rM $\frac{r}{2}$	[RM] $\frac{r-r^2}{4}$	[RM] $\frac{r^2}{4}$	[rM] $\frac{r^2}{4}$	[rM] $\frac{r-r^2}{4}$
rm $\frac{1-r}{2}$	[RM] $\frac{(1-r)^2}{4}$	[Rm] $\frac{r-r^2}{4}$	[rM] $\frac{r-r^2}{4}$	[rm] $\frac{(1-r)^2}{4}$

Soit P [rm] et P [rM] les probabilités respectives d'obtenir des individus de phénotype [rm] [rM] dans la population des individus récessifs [r].

$$P [rm] = (1-r)^2$$

$$P [rM] = 1 - (1-r)^2$$

Soit P [RM] et P [Rm] les probabilités respectives d'obtenir des individus de phénotype [RM] et [Rm] dans la population des individus dominants [R].

$$P [Rm] = \frac{2r-r^2}{3}$$

$$P [RM] = 1 - \left(\frac{2r-r^2}{3} \right)$$

(ANNEXE 3 suite)

La probabilité P d'obtenir un marqueur polymorphe entre des *bulks* de n individus récessifs [r] et dominants [R] correspond à la probabilité de comparer les *bulks* [rm] avec [RM] ou [rM] avec [Rm].

$$P = \{P[rm]^n \times (1 - P[Rm]^n)\} + \{(1 - P[rm]^n) \times P[Rm]^n\}$$

Lorsque le locus du gène et le locus marqueur sont indépendants $r = 1/2$ et la probabilité P correspond à la probabilité P' d'obtenir des faux positifs en comparant les *bulks*.

$$P' = 2\left(\frac{1}{4}\right)^n \left[1 - \left(\frac{1}{4}\right)^n\right]$$

ANNEXE 4

Détail des 406 combinaisons d'amorces testées sur les bulks.

Amorce <i>EcoRI</i> et <i>PstI</i>	Amorce <i>MseI</i>															
	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CCA	M-CCC	M-CCG	M-CCT	M-CGA	M-CGC	M-CGG	M-CGT	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E-AAA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	X	X	X	X	X
E-AAC	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
E-AAG	-	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-
E-AAT	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X
E-ACA	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-	-
EI-ACC	-	-	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-
E-ACG	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X	X	-
E-ACT	X	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X
E-AGA	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X
E-AGC	-	X	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-
E-AGG	X	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-	X
E-AGT	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X
E-ATA	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X
E-ATC	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X
E-ATG	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X
E-ATT	X	X	X	X	X	X	-	X	X	-	-	X	X	X	X	X
E-GAC	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E-GCG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E-GTC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
P-AAA	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X
P-AAC	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X
P-AAG	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X
P-AAT	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X
P-ACA	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X
P-ACC	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X
P-ACG	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X
P-ACT	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X
P-AGA	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X
P-AGC	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X
P-AGG	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X
P-AGT	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X
P-ATA	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X
P-ATC	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X
P-ATG	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X
P-ATT	X	X	X	X	X	X	-	-	X	-	-	X	X	X	X	X

X : combinaison testée, - : combinaison non testée, E : *EcoRI*, M : *MseI* et P : *PstI*

RESUME

Un facteur génétique majeur de résistance à la rouille, causée par *Puccinia melanocephala*, a été identifié chez le cultivar de canne à sucre (*Saccharum* spp.) R570 sur la base d'une ségrégation monofactorielle dans une descendance. Les études les plus avancées de gènes de résistance chez les végétaux nous enseignent qu'il peut s'agir d'un facteur simple, mais aussi d'un facteur composite constitué de plusieurs gènes associés en tandem. En marge de cette question, nous avons entrepris la caractérisation du facteur de résistance sur plusieurs plans. L'étendue de la résistance a été testée sur une gamme de huit isolats de rouille collectés dans différents pays. Il apparaît que le facteur identifié chez R570 confère à lui seul la résistance aux différents isolats étudiés. Une cartographie fine de la région située au voisinage du site de la résistance a été réalisée. Deux approches ont été utilisées. La première est basée sur la conservation de la synténie entre la canne à sucre, le sorgho, le maïs et le riz et repose sur l'utilisation de 184 sondes situées dans des régions homéologues chez ces espèces. La cartographie de ces sondes chez R570 a permis de localiser le site en position terminale d'un groupe de coségrégation composé de 19 marqueurs RFLP et appartenant au groupe de liaison VII. La seconde approche repose sur l'utilisation de l'analyse de ségrégation en mélange associée à la technique de marquage AFLP. Trois nouveaux marqueurs AFLP répartis de part et d'autre du site de résistance ont été identifiés. Celui-ci est maintenant encadré par huit marqueurs AFLP dans un intervalle de 10 cM ; les deux marqueurs les plus proches de chaque côté sont à 1,9 et 2,2 cM du gène. Les huit marqueurs AFLP caractérisant l'haplotype porteur de la résistance chez R570 ont été recherchés chez d'autres cultivars afin de tester une éventuelle association avec la résistance à la rouille. Un cultivar brésilien, apparenté à R570, porte vraisemblablement la même source de résistance. Parmi les autres cultivars étudiés, essentiellement originaires de Maurice, l'association recherchée semble absente.

Mots clés : *Saccharum* spp., Poacées, gène de résistance à la rouille, *Puccinia melanocephala*, cartographie comparée, analyse de ségrégation en mélange, déséquilibre de liaison.

SUMMARY

A putative major gene that confers resistance to rust, caused by *Puccinia melanocephala*, has been identified in the sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivar R570 based on a monofactorial segregation. Current knowledge on resistance genes suggest that such a genetic factor can be simple, or composed of several closely linked genes. We have undertaken the characterization of this resistance with several regards. The action of this putative gene was tested against eight rust isolates collected from different countries. It appeared that the gene confers by itself the resistance against all tested isolates. Fine mapping of the region surrounding the resistance gene was then undertaken. Two strategies were used. The first one is relies on synteny conservation between sugarcane, sorghum, maize and rice and is based on the utilization of 184 probes located on homoeologous chromosome segments in these species. Mapping these probes on the genome of R570 resulted in locating the gene at the edge of a cosegregation group composed of 19 RFLP markers and part of linkage group VII. The second approach is a bulked segregant analysis associated with AFLP markers. Three new markers distributed on both sides of the resistance gene were identified. The gene is currently surrounded with eight AFLP markers in a 10 cM interval; the closest markers reside at 1.9 and 2.2 cM on either side of the gene. A survey of these eight AFLP markers that characterize the haplotype which bears the resistance, was conducted among other cultivars in order to test a possible association with rust resistance. One Brazilian cultivar, related to R570, probably contains the same rust resistance source. Among the other cultivars studied, mostly originating from Mauritius, the searched association seems absent.

Key words: *Saccharum* spp., Poaceae, rust resistance gene, *Puccinia melanocephala*, comparative mapping, bulked segregant analysis, linkage disequilibrium.