



Liens utiles :

- Sélection des autogames. Exercice : <http://www.biotech-ecolo.net/autogames-selection-exercice.html>
- Sélection assistée par marqueurs : <http://www.biotech-ecolo.net/selection-marqueurs-MAS.html>
- Marqueurs moléculaires de type RFLP/ : <http://www.biotech-ecolo.net/diversite-genetique-mesures/marqueurs-moleculaires-RFLP.html>
- Marqueurs RFLP : http://www.takween.com/techniques/10_RFLP.pdf

Marqueurs moléculaires et Amélioration des Plantes,

Élément de Module 'Génétique et amélioration des plantes'

MODULE 'Biochimie, Génétique et Amélioration des Plantes'

Parcours S5 : 'Biologie Appliquée aux Productions Végétales'

Contrôle de rattrapage, Janvier 2012, Enseignant : M. Baaziz, durée : 45 minutes .. Réponses brèves à la fin de l'épreuve

L'oranger (*Citrus sinensis* L.) est un arbre fruitier

de la famille des Rutacées, plantes qui produisent les agrumes (الحوامض).



'Trovia' orange
(*Citrus sinensis*)
(T)



Jessamine orange
(*Murraya paniculata*)
(O)



Somatic hybrid plantlet (TO)

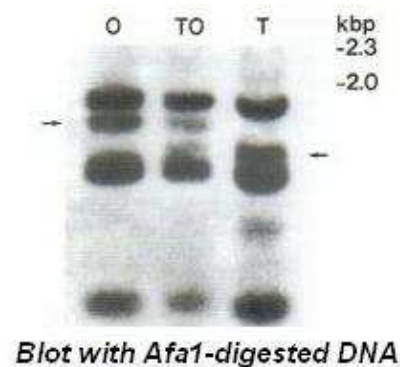
Somatic hybrid plantlet derived from 'Trovia' orange and Jessamine orange leaf protoplasts

تكوين

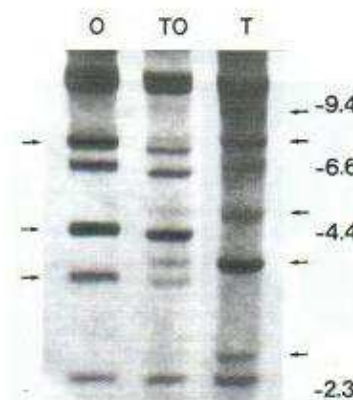
Shinozaki et al., 1992.
Japan J. Breed. 42, 227-95

L'oranger est un hybride ancien résultant probablement d'un croisement entre le pamplemousse (*Citrus maxima*) et la mandarine (*Citrus reticulata*). Décidant d'améliorer génétiquement cette espèce (appelée 'Trovia orange', Shinozaki et al. (1992, Japan J. Breed. 42, 227-95) ont réalisé la fusion des protoplastes de cet oranger avec ceux de l'espèce *Murraya paniculata* (orange sauvage ou 'oranger jasmin') qui s'adapte bien aux sols alcalins, en plus d'être résistante aux nématodes (voir figure ci-dessous). Les plantes régénérées à partir des protoplastes fusionnés ont été analysées pour le polymorphisme de restriction de leurs ADN par la technique 'RFLP'. L'ADN a été hydrolysé séparément par deux enzymes de restriction (*Afa1* et *Xho1*). L'hybridation a été réalisée par une sonde hétérologue (ADN de riz) marquée à la peroxydase. Les résultats obtenus sont résumés dans la figure ci-dessous.

- 1) Quelles peuvent être les raisons possibles de recours à d'autres espèces de rutacées (comme *Murraya paniculata*) pour l'amélioration génétique de l'oranger (*Citrus sinensis*) ?
- 2) Rappeler brièvement la technique de fusion des protoplastes dans la création variétale.
- 3) Quel(s) critère(s) moléculaire(s) exploite la technique d'électrophorèse de l'ADN. S'il s'agit de plusieurs critères, en préciser le principal. Justifier votre réponse
- 4) Rappeler les étapes principales de la technique 'RFLP'.
- 5) Interpréter les électrophorégrammes correspondant à la digestion par les enzymes de restriction *Afa1* et *Xho1* des ADN provenant de 'orange jessamine' (*Murraya paniculata*, O), 'orange Trovita' (*Citrus sinensis*, T) et de l'hybride résultant de la fusion des protoplastes (TO). Quelles sont les conclusions à tirer quant à l'efficacité d'utilisation du marquage de type 'RFLP' dans ce genre d'étude?. Justifier votre réponse.



Blot with *Afa1*-digested DNA



Blot with *Xho1*-digested DNA

DNA blot hybridized to 7.7 Kbp *EcoR1* fragments from rice-rDNA labeled with the peroxidase complex

O : Orange jessamine
 TO : Somatic hybrid
 T : 'Trovita' orange

Shinozaki et al., 1992.
Japan J. Breed. 42, 227-95

Réponses brèves

Réponse à la Question 1: Les raisons possibles à l'origine du recours à d'autres espèces de rutacées (comme *Murraya paniculata*, oranger sauvage) pour l'amélioration génétique de l'oranger (*Citrus sinensis*) résident essentiellement dans le rétrécissement de la diversité génétique de l'oranger (*Citrus sinensis*). Lien utile : <http://www.biotech-ecolo.net/amelioration-genetique-plantes.html>

Réponse à la Question 2: La préparation des protoplastes dans le but de réaliser leur fusion, consiste à détruire la paroi cellulaires par digestion enzymatique, grâce à des enzymes telles que la pectinase, la cellulase ou le lysozyme. On obtient ainsi des cellules sphériques. Ensuite, les cellules sont fusionnées par PEG ou par application d'un courant électrique dans le but d'obtenir des hybrides somatiques.

Réponse à la Question 3: L'électrophorèse de l'ADN exploite les critères de la taille et de l'ionocité (charge électrique). Cependant, la même charge (-) des fragments de l'ADN (dues au phosphore) entraîne une séparation sur le critère de la taille, uniquement. La forme des fragments d'ADN résultant de la digestion de l'ADN n'intervient pas dans la séparation. Lien utile : <http://www.takween.com/techniques/techniques-biochimie.html>

Réponse à la Question 4: Les étapes principales de la technique RFLP sont :

- Purification suffisante de l'ADN
- Digestion de l'ADN par une enzyme de restriction
- Electrophorèse des fragments d'ADN sur gel
- Transfert des fragments d'ADN séparés sur membrane de nitrocellulose

- Hybridation des fragments par une sonde (homologue ou hétérologue) marquée par une enzyme (comme la peroxydase) ou par radioactivité

Lien utile : http://www.takween.com/techniques/10_RFLP.pdf

Réponse à la Question 5: Interprétation des électrophorégrammes obtenus avec les deux enzymes de restriction :

- Enzyme de restriction *Afa1* :

On constate que l'hybride somatique hérite de l'oranger sauvage (*Murraya paniculata*) et de l'oranger cultivé plusieurs séquences nucléotidiques (représentées par des bandes), dont :

- ✓ Bande de R_f d'environ 0,25 qui provient de *Murraya paniculata*, mais n'existant pas chez l'oranger cultivé (*Citrus sinensis*)
- ✓ Bande de R_f égal à 0,35, environ existant uniquement chez l'oranger cultivé

- Enzyme de restriction *Xho1* :

Avec l'enzyme de restriction *Xho1*, on découvre que l'ADN de l'hybride somatique contient des séquences nucléotidiques provenant des deux espèces d'oranger. On peut en citer le fragment d'ADN correspondant à la bande de approximatif 0,60 (taille proche de 4,4 kbp) hérité de l'oranger sauvage, mais n'existant pas chez l'oranger cultivé.

Les fragments d'ADN caractéristiques des deux espèces d'oranger sont apparents chez l'hybride somatique. Ceci témoigne de la **codominance** du marquage de type RFLP. Le caractère codominant des marqueurs RFLP fait d'eux des outils moléculaires puissants dans l'identification des hybrides.