



**Liens utiles :**

- Mode de reproductions des plantes : <http://www.biotech-ecolo.net/plantes-autogames-allogames.html>
- Amélioration des plantes autogames : <http://www.biotech-ecolo.net/amelioration-plantes-autogames.html>
- 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 basés sur la PCR : <http://www.biotech-ecolo.net/diversite-genetique-mesures/marqueurs-moleculaires-PCR.html>
- Marqueurs moléculaires de type RFLP/ : <http://www.biotech-ecolo.net/diversite-genetique-mesures/marqueurs-moleculaires-RFLP.html>
- Marqueurs RAPD : [http://www.takween.com/techniques/11\\_RAPD.pdf](http://www.takween.com/techniques/11_RAPD.pdf)
- Marqueurs RFLP : [http://www.takween.com/techniques/10\\_RFLP.pdf](http://www.takween.com/techniques/10_RFLP.pdf)

Année universitaire 2011-2012

**Génétique et amélioration des plantes (ELEMENT DE MODULE)**

MODULE 'Biochimie, Génétique et Amélioration des Plantes'

Parcours S5 : 'Biologie Appliquée aux Productions Végétales'

Contrôle, durée : 1 heure

**Question 1**

Janvier 2011 (correction brève à la fin de l'épreuve)

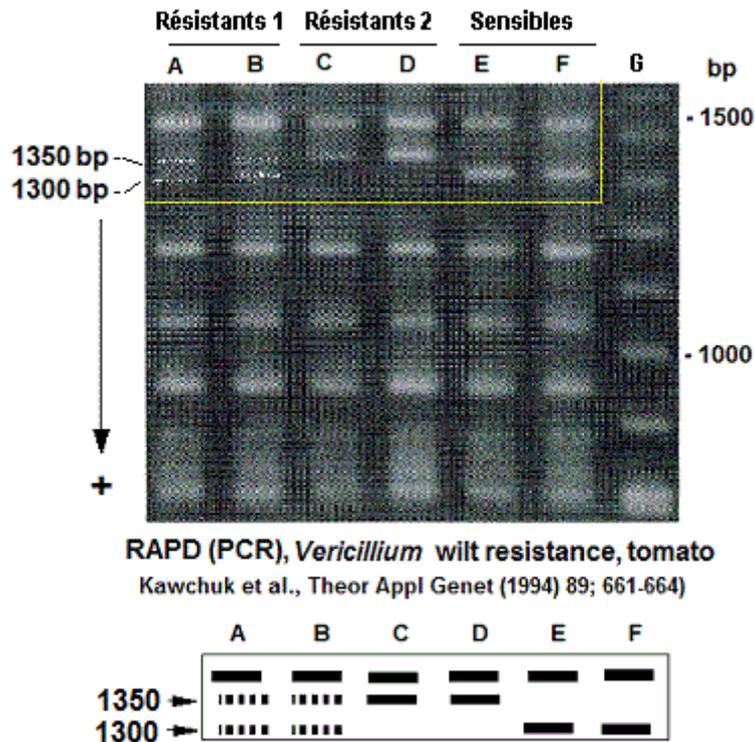


La verticilliose de la tomate est une maladie vasculaire causant des pertes énormes dans les cultures de la tomate (*Lycopersicon esculentum* ou *Solanum lycopersicum*). L'agent causal de la maladie est *Verticillium dahliae*.

Afin de trouver un marqueur moléculaire de la résistance de la tomate à la verticilliose, Kawchuk et al. (1994, Theor Appl Genet 89 ; 661-664) ont utilisé la technique RAPD pour suivre la transmission (*via* des croisements) de marqueurs moléculaires et de la résistance de deux plantes parentales (de comportements différents) à leurs générations 'F1' et 'F2'. Le comportement des plantes vis-à-vis de la verticilliose a été déterminé par infestation expérimentale en trempant les racines dans une solution de spores de *Verticillium dahliae*. La génération 'F1' s'est montrée résistante à 100%. La génération 'F2' a montré 20 plants sensibles et 56 plants résistants à l'infection. L'utilisation de l'amorce UBC458 (5'CTCACATGCC') dans l'amplification de l'ADN par technique RAPD, suivie par électrophorèse sur gel d'agarose 2%, a permis de révéler la présence d'un fragment d'ADN de taille 1300 bp chez les plants de tomate sensibles à la verticilliose et un autre fragment d'ADN de 1350 bp chez les plants résistants de la génération 'F2' (voir figure ci-dessous). En se basant sur les génotypes liés au marquage de type 'RAPD', on peut classer les plants de tomate en 'plants résistants 1' (A, B), 'plants résistants 2' (C, D) et 'plants sensibles' (E, F).

- 1) Rappeler le mode de reproduction de la tomate. Peut-on parler de 'variété fixée' ou 'variété hybride' (non fixée) pour la tomate ?
- 2) Dans quelle stratégie d'amélioration génétique des plantes rentrent les activités du suivi de la ségrégation d'un marqueur moléculaire et d'un trait agronomique précis, suite à des croisements définis.
- 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) Le marquage moléculaire de type 'RAPD' est basé sur la PCR (polymérisation en chaîne de l'ADN). Rappeler les principales étapes d'un protocole PCR.

- 5) Quelles sont les origines possibles du polymorphisme de type 'RAPD' montré par la tomate en passant d'un individu résistant à la verticilliose (exemple D) à un individu sensible (exemple F).
- 6) Sur la base du marquage moléculaire de type 'RAPD' obtenu par l'amorce UBC458, déterminer les génotypes des 'plants résistants 1', 'plants résistants 2' et 'plants sensibles'.
- 7) Comment envisagez vous l'exploitation du marquage de type 'RAPD' dans l'amélioration génétique de la tomate pour la résistance à la verticilliose ?



## Question 2.

A l'aide d'un tableau, comparer les marqueurs moléculaires de type 'RAPD' (apparus vers 1989) et les marqueurs de types RFLP (apparus vers 1980) en se limitant aux avantages et inconvénients principaux.

## Corrections brèves

**Réponse à la Question 1:** Rappeler le mode de reproduction de la tomate. Peut-on parler de 'variété fixée' ou 'variété hybride' (non fixée) pour la tomate ?

Le mode de reproduction de la tomate est l'autogamie (voir: QCM sur systèmes de reproduction des plantes, Autogames et allogames. Reproduction). Pour la tomate on parle de variété fixée car la fécondation se fait entre le pollen et les ovules de la même fleur.

**Réponse à la Question 2:** Dans quelle stratégie d'amélioration génétique des plantes rentrent les activités du suivi de la ségrégation d'un marqueur moléculaire et d'un trait agronomique précis, suite à des croisements définis.

La stratégie d'amélioration est la 'sélection assistée par marqueurs' (MAS ou 'Marker Assisted Selection'). Il faut au préalable vérifier (à travers des croisements dirigés) la liaison forte (linkage) entre le marqueur et le trait agronomique précis (Vvoir: sélection assistée par marqueurs).

**Réponse à la Question 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.

L'électrophorèse de l'ADN exploite les critères de la taille et de l'ionicité (charge électrique). Cependant, la même charge (-) des fragments de l'ADN (dus au phosphore) entraîne une séparation sur le critère de la taille, uniquement. La forme des fragments d'ADN résultant de la polymérisation par PCR n'intervient pas dans la séparation.

**Réponse à la Question 4:** Le marquage moléculaire de type 'RAPD' est basé sur la PCR (polymérisation en chaîne de l'ADN). Rappeler les principales étapes d'un protocole PCR.

Les étapes principale d'une PCR sont 1/ Dénaturation de l'ADN (température d'environ 94°C), 2/ Fixation des amorces ('annealing', température d'environ 35°C-50°C), 3/ Elongation par la Taq DNA polymerase (polymérisation, extension) réalisée à 72°C et 4/ Le nombre de répétition du cycle (variable, 40-60).

**Réponse à la Question 5:** Quelles sont les origines possibles du polymorphisme de type 'RAPD' montré par la tomate en passant d'un individu résistant à la verticilliose (exemple D) à un individu sensible (exemple F).

Les origine du polymorphisme de type RAPD enregistré en passant des plants de tomate résistants à la verticilliose aux plants sensibles peuvent être:

- Mutation de type délétion entraînant l'apparition d'une région (< ou = 3000 pb) courte donnant un fragment d'ADN court après polymérisation par la Taq DNA polymerase (voir les marqueurs de type RAPD).
- Mutation ponctuelle aboutissant à l'apparition d'un nouveau site de fixation de l'amorce derrière l'amplification de deux segments d'ADN dont un segment très court, produisant un petit fragment d'ADN qui sort rapidement du gel lors de l'électrophorèse. Le deuxième segments donne un fragment d'ADN de taille inférieure à celle du fragment d'ADN n'ayant pas subit de mutation.

**Réponse à la Question 6:** Sur la base du marquage moléculaire de type 'RAPD' obtenu par l'amorce UBC458, déterminer les génotypes des 'plants résistants 1', 'plants résistants 2' et 'plants sensibles'.

Les 'plants résistants 1' sont des hétérozygotes (Rs), les 'plants résistants 2' sont des homozygotes (RR) et les 'plants sensibles' sont homozygotes différents (ss).

**Réponse à la Question 7:** Comment envisagez vous l'exploitation du marquage de type 'RAPD' dans l'amélioration génétique de la tomate pour la résistance à la verticilliose ?

Le marquage RAPD obtenu avec l'amorce UBC458 (5'CTCACATGCC') peut être exploité comme un marqueur précoce de la résistance de la tomate à la verticilliose. On n'aura pas recours à l'infestation expérimentale par *Verticillium dahliae*. Il suffit de trier les plantes ayant un fragment d'ADN 1350 pb.

**Réponse à la Question 2:** Comparaison des marqueurs moléculaires de type 'RAPD' et les marqueurs de types RFLP.

	<b>RAPD</b>	<b>RFLP</b>
molécules du marquage	Fragment d'ADN résultant de l'amplification par PCR en présence d'une amorce	Fragment d'ADN provenant de la digestion de l'ADN par une enzyme de restriction suivie d'une hybridation par une sonde
Nécessité d'ADN suffisamment pure	Non	Oui
Caractère du marqueur	Dominant. Les individus hétérozygotes difficiles à distinguer des parents	Codominant. Les individus hétérozygotes se distinguent facilement des parents
Temps de réalisation	Rapide	Long
utilisation de sondes marquées	Non	Oui