

**INTROGRESSION DES QTLs DE TOLERANCE AU FROID
DANS LE FOND GENETIQUE D'UNE VARIETE AFRICAINE
DE RIZ [*Oryza sativa* (L.)]**

DEDICACES

Je dédie ce travail :

A mes parents. Vous m'avez élevé et montré le droit chemin en m'apprenant à respecter les autres, à honorer les anciens et à protéger les plus faibles.

A mes frères et sœurs pour leur attachement en ma personne. Mention spéciale à Abdou Diop qui n'a ménagé aucun effort pour ma réussite.

A mon tuteur Demba Diop à Ouest Foire pour son l'hospitalité, ses conseils.

REMERCIEMENTS

Je rends grâce à Dieu le tout puissant, son prophète Muhamed (PSL) et son serviteur le vénéré Cheikh Ahmadou Bamba de m'avoir donné la sagesse afin d'accomplir ce travail qui pour moi constitue un début.

A travers ces quelques phrases je tiens à remercier :

Dr Vincent Bado, Représentant régional d'AfricaRice/centre du Sahel pour m'avoir accepté au sein de la structure.

Dr Baboucarr Manneh et Dr Kofi Bimpong, mes maîtres de stage, pour leur dévouement inlassable et leur rigueur scientifique manifestés durant mes recherches. Vos précieux conseils et disponibilité m'ont incité à persévérer dans mes travaux. Je tiens ainsi à vous exprimer ma reconnaissance la plus sincère. A travers votre personne, je remercie tous vos collègues chercheurs d'AfricaRice/Saint Louis.

M. Ghislain Kanfany, Mlle Bathé Diop et Mlle Anta Gueye pour leur soutien dans la réalisation de ce modeste document. Mes remerciements également au personnel technique de la station expérimentale de Ndiaye.

Le doyen de la faculté des sciences et techniques, au chef de département de biologie végétale. A tous les professeurs de la faculté des sciences et techniques de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar pour leur dynamisme, leur rigueur durant mon cursus académique. Je suis fier de vous.

Le professeur Ibrahima Ndoye responsable du Master de Biotechnologies Végétales et Microbiennes pour m'avoir accepté dans le master.

Mon encadreur le professeur Diaga Diouf pour la peine qu'il prend de juger ce travail. A tous les enseignants qui nous ont dispensé les cours dans ce master Biotechnologies Végétales et Microbiennes.

A mes amies de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar : Mamadou Kane, Aboubacar Sow, Sérigne Taïba Diakhaté, Babacar Gueye, Alassane Camara, Mame Codou Sène et j'en passe pour votre esprit de partage et de soutien chaque fois que le besoin se faisait sentir.

A mes camarades du département des sciences naturelles et mes camarades de classe du Master. Votre esprit de groupe a été remarquable durant toute la formation.

TITRE : Introgression des QTLs de tolérance au froid dans le fond génétique d'une variété africaine de riz *Oryza sativa* (L)

Prénom et Nom : Soudou DIOP

Nature du mémoire : Master en Biotechnologies Végétales et Microbiennes

Présenté et soutenu le : 09 Mars 2013

Jury : Président: Pr. Ibrahima Ndoye

Membres: Pr. Diaga DIOUF

Dr. Baboucarr MANNEH

Professeur titulaire, UCAD

Professeur titulaire, UCAD

Sélectionneur, Africa Rice

Directeur de recherches : M. Diaga DIOUF

RESUME

Le stress induit par la basse température provoque des dommages importants sur la culture du riz dans la région du Sahel de l'Afrique de l'Ouest et aux hautes altitudes en Afrique de l'Est. Le développement des variétés tolérantes au froid est une alternative adoptée par les sélectionneurs pour améliorer les rendements de riz dans les régions affectées. Dans cette étude la variété Silewah tolérante au froid a été utilisée comme parent donneur pour la tolérance au froid afin de transférer cette tolérance dans les variétés de riz irriguées qui sont sensibles au froid. En effet deux populations BC₁F₁ ont été développées en faisant des croisements de deux variétés élites sensibles, Sahel108 et NERICA-L19 avec la variété Silewah. La première est formée de 65 individus et la deuxième de 33 individus. Le génotypage effectué d'abord chez les parents a permis d'identifier 82 marqueurs SSRs polymorphes entre les parents récurrents et le parent donneur Silewah. Ensuite chez les populations, la première sélection qui était réalisée sur le croisement NERICA L-19/Silewah, a permis d'identifier 20 descendants qui ont des introgressions de Silewah aux niveaux des QTLs *Qctb3* sur chromosome 3 et *Ctb1* et *Ctb2* sur chromosome 4. Par ailleurs, les analyses ont montré que sauf 4 individus parmi les 20 descendants avec introgression étaient des BC₁F₁s et les 16 autres étaient des F₂s. Ensuite, le background selection ou la sélection de fond génétique a permis d'identifier des descendants avec les QTLs d'intérêt et le minimum d'introgression de génomes de Silewah. De ce fait parmi les 20 individus avec introgression, les 4 BC₁F₁ étaient les plus intéressants ayant la plus faible introgression de Silewah dans les autres régions de leur génome. Au niveau des F₂s certaines lignées seraient intéressantes, à condition qu'elles aient les gènes d'intérêts en conditions d'homozygotes. Ce qui pourrait être le cas chez les génotypes 13, 14, 22 et 34.

Mots clés: Introgression, QTL, Foreground selection, Background selection, *Oryza sativa*

Abstract

The stress induced by the low temperature causes extensive damage to rice cultivation in the Sahel region of West Africa and high elevations in East Africa. The development of cold-tolerant varieties is an alternative adopted by breeders to improve rice yields in affected areas. In this study the cold-tolerant variety Silewah was used as donor parent for cold tolerance in order to transfer this tolerance in irrigated rice varieties are sensitive to cold. Indeed, two BC₁F₁ populations were developed by crossing two elite varieties sensitive Sahel108 and NERICA-L19 with the variety Silewah. The first consists of 65 individuals and 33 individuals of the second. Genotyping performed first in the parents identified 82 polymorphic SSRs between recurrent parents and the donor parent Silewah. Then among populations, foreground selection that was focused on the cross NERICA-L19/Silewah has allowed to identify 20 descendants who received introgression of QTLs at Silewah *Qctb3* on chromosome 3 and *Ctb1* and *Ctb2* on chromosome 4. At the same time, the analysis showed that except 4 of the 20 were descendants of BC₁F₁s and the remaining 16 were of F₂s. Then, the background selection or selection of genetic background identified descendants with QTLs of interest and minimal genomes Silewah introgression. This is among the 20 individuals with introgression, 4 BC₁F₁ were more interesting with the lowest introgression Silewah in other regions of their genome. At F₂s some lines would be interesting, if they are already receiving interesting genes in homozygous conditions. This could be the case with genotypes 13, 14, 22 and 34.

Key words: Introgression, QTL, Foreground selection, Background selection, *Oryza sativa*

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

bp: paire de bases

°C : Degré Celsius

cM: centi Morgan

CTAB: Cethyl-Trimethyl-Ammonium Bromide

dNTP: desoxynucleotide triphosphate

FAO : Organisation des Nations Unis pour l'alimentation et l'agriculture

IRRI : Institut International de Recherche sur le Riz

NERICA: New Rice for Africa

PCR : Polymorphism Chain Reaction (Amplification par Polymérisation en Chaîne)

QTL : Quantitative trait locus (Caractère à effet Quantitatif)

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

SAED : Société d'Aménagement et d'Exploitation du Delta du Fleuve Sénégal et des Vallées
du Fleuve Sénégal et de la Falémé

SCAR: Sequence Characterized Amplified Regions

SSR : Simple Sequence Repeat (Séquences simple répétées)

TBE: tris-borate EDTA

TEMED: N, N, N', N'-Tétraméthyléthylènediamine

UCAD : Université Cheikh Anta Diop de Dakar

UV : Ultraviolet

TABLE DES MATIERES

DEDICACE	p1
REMERCIEMENTS	p2
RESUME	p3
ABSTRACT	p4
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	p5
TABLE DES MATIERES	p6
INTRODUCTION	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	2
1. Plant de riz	2
1.1. Position taxonomique, origine et répartition.....	2
1.2. Caractéristiques génétiques.....	2
1.3. Morphologie du plant de riz.....	2
1.4. La croissance et le développement.....	4
1.5. Ecologie du riz.....	6
2. L'effet du froid sur le riz	6
3. L'utilisation des marqueurs moléculaires dans l'amélioration variétale	7
4. Les marqueurs microsatellites	7
5. La Sélection Assistée par Marqueurs (SAM)	8
6. Le développement de souches tolérantes au froid à partir de Silewah	10
MATERIEL ET METHODES	12
1. Matériel végétal et conditions d'expérimentation au champ	12
2. Analyse moléculaire	12
2.1. Extraction d'ADN.....	12
2.2. Amplification de l'ADN.....	14
2.3. Electrophorèse sur gel et Visualisation.....	14
3. L'analyse des données moléculaires	14
RESULTATS	15
1. Etude de polymorphisme	15
2. Le foreground selection : Identification des individus avec introgression	15
3. Le Background selection: Identification des individus avec le moins d'introgression de parent donneur	18
4. Représentation graphique des génotypes	20
DISCUSSION	23
1. Sur l'étude de polymorphisme	23
2. L'identification des descendants avec introgression : Foreground selection	23
3. Identification des individus avec le moins d'introgression : Background selection	24
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	26
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	27
ANNEXES	

INTRODUCTION

Première céréale cultivée pour la consommation humaine, le riz représente un enjeu vital pour de nombreux pays du sud. Il est l'un des piliers de la sécurité alimentaire dans le monde (Saurabh et al, 2009). Ainsi, améliorer les rendements est nécessaire pour atténuer la faim de milliers de personnes dans le monde qui dépendent du riz comme aliment de base. En Afrique, le taux de consommation du riz est supérieur à celui de la production locale. De ce fait une bonne partie de la consommation de riz provient de l'extérieur. En 2006 la FAO a estimé que les importations de riz dans les régions Ouest et du Centre de l'Afrique représentent plus de 6 millions de tonnes, ce qui équivaut à environ un milliard de dollars (NERICA, 2008). Au Sénégal, le riz est la céréale la plus cultivée et est produit essentiellement dans deux régions : le Sud du Sénégal (la Casamance) et le Nord du Sénégal (Vallée du Fleuve Sénégal). La production nationale couvre moins de 20% des besoins et les importations ont dépassé les 700.000 tonnes en 2002, pour un montant supérieur à 100 milliards de F CFA (Ly, 2009).

Cette situation qui interpelle les institutions gouvernementales, de recherches et ainsi que tous les acteurs du développement reste toujours un défi. La différence qui existe entre la demande et la production de riz locale est liée à certaines contraintes biotiques mais aussi abiotiques. Parmi ces facteurs abiotiques limitant la production figurent les basses températures. En effet, la plupart des variétés cultivées sont très sensibles aux basses températures à la phase végétative et reproductive. Cette situation expose sévèrement la production locale de riz à des pertes énormes de rendements mais aussi limite la double culture. Face à cette situation, il urge la nécessité de trouver des variétés tolérantes au froid, avec de bonnes caractéristiques agronomiques mais également culinaire par le biais de la sélection conventionnelle et plus récemment par la Sélection Assistée par Marqueurs (SAM). C'est dans cette optique qu'un travail intitulé «*Introgression of cold tolerance QTL/gene into populars African rice varieties* » a été conduit au centre du riz pour l'Afrique, à la station régionale du Sahel, Saint Louis. Il entre dans le cadre d'un Master II en Biotechnologie Végétale et Microbienne de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar.

L'objectif de ce travail est de transférer des gènes /QTLs de tolérance au stress lié au froid dans le fond génétique de variétés de riz cultivés en Afrique. Il s'agira plus spécifiquement de faire l'étude du polymorphisme chez les parents et d'identifier l'introgression de QTLs dans le génome des populations BC₁F₁ en utilisant des marqueurs microsatellites sélectionnés pour l'analyse de matériel génétique de froid.

La première partie de ce document consiste en une revue de la littérature sur le riz et la sélection assistée par marqueurs. La méthodologie utilisée sera détaillée dans la seconde partie. Les résultats obtenus sont présentés et discutés dans le troisième chapitre. Dans la dernière partie, une conclusion et des recommandations sont formulées en guise de perspectives de recherches.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Plant de riz

1.1. Position taxonomique, origine et répartition

Le riz est une plante monocotylédone appartenant à la famille des *Poaceae* ou *Gramineae* à la Tribu *Oryzaceae* et au genre *Oryza*. Le riz désigne l'ensemble des plantes du genre *Oryza*, il comprend une vingtaine d'espèces parmi les quelles deux seulement sont cultivées : *Oryza sativa* originaire d'Asie et *Oryza glaberima* originaire d'Afrique de l'ouest. Il est cultivé dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées chaudes pour son fruit, ou caryopse, riche en amidon. Le riz *sativa* cultivé est représenté par des milliers de variétés réparties historiquement en trois groupes : le riz *japonica* à épillet court, le riz *indica* à épillet très long et un groupe intermédiaire (*javanica*).

La sous espèce *indica* est cultivée largement dans les régions chaudes et humides d'Asie, d'Afrique et d'Amérique Latine. Elle représente 80% de la production mondiale de riz (Jena *et al.*, 2010). La sous espèce *japonica* est cultivée dans les régions tempérées subtropicales et les hautes latitudes d'Asie, d'Europe d'Amérique latine, d'Amérique du nord et d'Océanie (Mackill et Lei, 1997). Dans les hautes latitudes des régions de la chine du Japon et de la Corée, le riz *japonica* est l'aliment de base et la production par hectare est comparativement supérieure à celle du riz *indica* (Jena *et al.*, 2011).

1.2. Caractéristiques génétiques

Le riz est une plante annuelle, diploïde ($2n=2X=24$) et autogame. La taille du génome du riz est de 389 millions de bases avec 37 544 gènes répartis dans 12 chromosomes (Raghuvanshi *et al.*, 2009). La diversité génétique du riz est considérable avec plus de 150 000 variétés cultivées dans le monde et 107 000 accessions environ dans les banques de gènes de l'IRRI (Courtois, 2007). Les deux sous espèces *indica* et *japonica* sont génétiquement très éloignés, elles sont facilement distinguées sur la base de caractéristiques agronomiques et morphologiques.

1.3. Morphologie du plant de riz

Le riz est une herbacée à tige ronde recouverte, des feuilles sessiles et plates en forme de lame et une panicule terminale. La hauteur de la plante à maturité varie de 0,6 m à 2 m selon les variétés et peut aller jusqu'à 5 m pour les variétés flottantes (Fig. 1).

Le plant de riz est constitué par : un système racinaire développé avec des racines fibreuses dans le sol. La racine principale émerge de la semence au moment de la germination. Les racines secondaires vont se développer à partir de la racine principale et elles présentent des radicules et des poils absorbants. Au cours du développement, elles apparaissent à partir des nœuds des racines adventives au-dessus du sol (Source : cours de morphologie et physiologie du riz, Traoré, modifié).

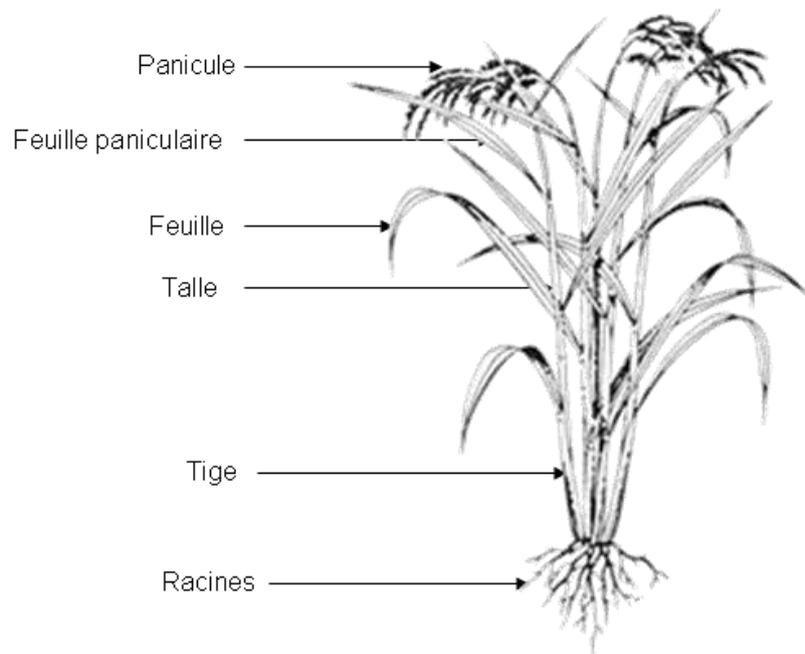


Figure 1: Schéma d'un Plant de Riz

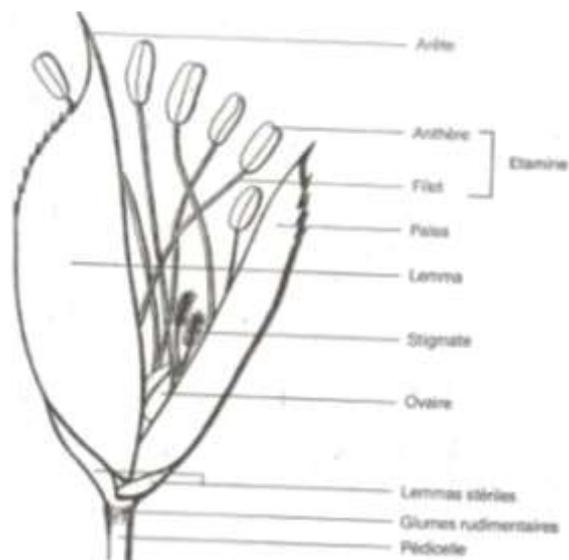


Figure 2: Schémas d'un épillet (modifié source cours morphologie et physiologie du riz, Traoré)

La tige est dressée, ronde, creuse et articulée. Elle est formée d'une série de nœuds et d'entrenœuds. Le nœud porte une feuille et un bourgeon qui deviendra plus tard une talle. Le tallage forme des bouquets de tiges, il est très variable selon les variétés, l'espacement, la saison et la richesse du sol en azote. C'est l'ensemble des talles qui forme la touffe du riz.

Les feuilles sont alternes, sessiles et à base engainante. Elles prennent naissance sur la talle au niveau d'un nœud. Elle est constituée de deux parties : la gaine foliaire et le limbe foliaire. La première feuille rudimentaire à la base de la talle est le prophyllum et la dernière feuille sous la panicule est la feuille paniculaire. Son orientation permet de distinguer les variétés. L'épillet est l'unité basale de l'inflorescence. Ils sont groupés en panicules dressées ou pendantes. La panicule prend naissance à partir du dernier nœud de la tige et l'épillet comporte la glume externe et le fleuron. La branche primaire de la panicule est divisée en branches secondaire et parfois en branches tertiaires. La fleur porte 6 étamines et un pistil. L'étamine est constituée de deux anthères, le pistil est constitué de l'ovaire du style et du stigmate. Le fruit ou caryopse est enveloppé dans les glumelles et l'ensemble forme le paddy (Source : cours de morphologie et physiologie du riz, Traoré, modifié) (Fig. 2).

1.4. La croissance et le développement

Le cycle de croissance du riz est divisé en trois grandes phases et chaque phase est divisée en plusieurs stades.

- **La phase végétative:** Elle comprend la germination de la semence, la levée et le tallage. Elle s'étend du semis à la différenciation paniculaire (Lacharme, 2001). La durée en nombre de jours de la phase végétative dépend des conditions climatiques, de la zone et de la variété.

- **La phase reproductive:** Elle est définie comme étant la période qui commence par la différenciation paniculaire et se termine quand 50% des épillets sont pollinisés. A cette période, la plante consomme d'énormes quantités d'énergie et est très sensible aux facteurs environnementaux tels que les basses températures, la sécheresse (Lacharme, 2001). La phase reproductrice comprend; l'initiation paniculaire, la montaison, l'épiaison et la fécondation.

- **La phase de remplissage des grains et de maturation:** Cette phase commence lorsque la moitié des florets ont été pollinisés. C'est le stade ultime du développement de la plante, qui va de la fécondation des grains jusqu'à la maturité. Durant cette phase, on observe un remplissage des grains par un mouvement des éléments nutritifs de la plante vers les grains (Lacharme, 2001). La maturation des grains passe par une phase de grain laiteux, grain pâteux et en fin grain mature (Fig. 3).

1.5. Ecologie du riz

Le riz est une plante adapté à un habitat aquatique. En Afrique de l'ouest les écosystèmes de riz sont conventionnellement classé ainsi: système irrigué, pluvial de bas-fond, pluvial de plateau, mangrove inondée et en eau profonde (NERICA, 2008).

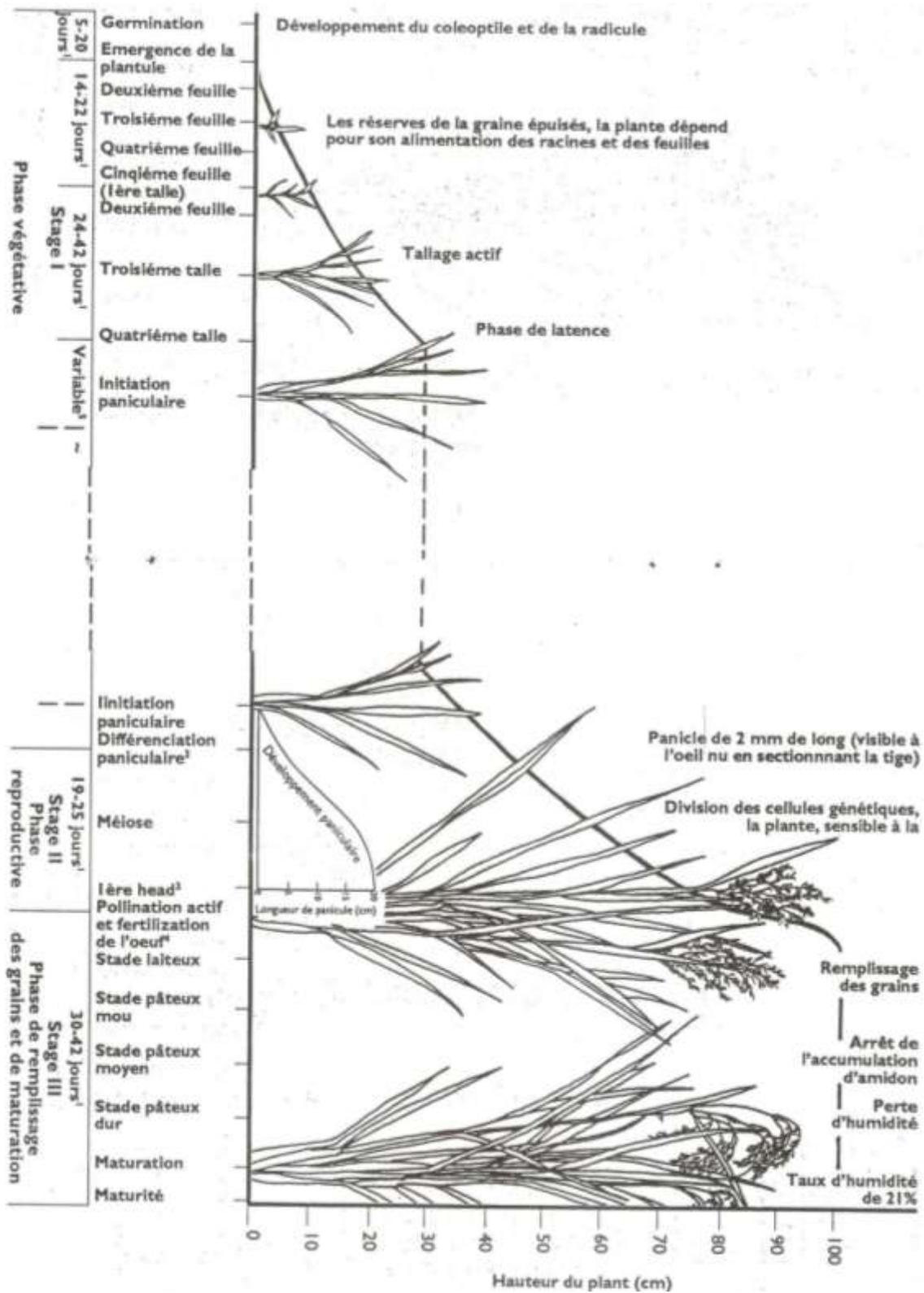


Figure 3: Schémas des différentes phases de développement du plant de riz modifié (source cours morphologie et physiologie du riz, Traoré)

- **Le système irrigué:** La présence et le niveau de l'eau sont contrôlés. Il est productif. Cependant, elle demande des surfaces planes et des canaux d'irrigations. La riziculture irriguée est moins pratiquée en Afrique Sub-saharienne. Seul 3% des terres cultivées sont irriguées, soit 5 Mha (AfricaRice, 2009).

- **Le système pluvial de plateau :** Il est principalement pratiqué dans les régions tropicales d'Afrique de l'Ouest. Il occupe plus de surfaces et génère moins de rendement. Des quelques 8,4 Mha de terres sous riz en Afrique Sub-saharienne en 2007, environ 40% se trouvent dans l'écologie de plateau ce qui représente 19% du total de la production de riz (AfricaRice, 2009). Les contraintes sont nombreuses : la compétition des mauvaises herbes, l'irrégularité des pluies, la sécheresse, la pauvreté des sols, les ravageurs et les maladies etc.

- **Le système pluvial de bas-fond :** il est pratiqué dans les zones naturellement inondées périodiquement par les eaux de pluies. Les conditions d'inondation favorisent un enrichissement du sol en éléments minéraux, favorable à la croissance des plants de riz. Le système pluvial de bas-fond permet une diversification des systèmes de cultures. Il est plus productif que le système pluvial de plateau. L'écologie de bas-fond occupe 37% des terres sous riz (représentant 40% du total de la production) en Afrique Sub-saharienne en 2007 (AfricaRice, 2009).

- **La riziculture de mangrove:** la mangrove se trouve dans la partie basse des estuaires, des fleuves ou sur les côtes envahies périodiquement par de l'eau salée. La mangrove présente un certain nombre de problèmes tels que la salinité et l'acidité des sols.

2. L'effet du froid sur le riz

Les basses températures ou le stress dû au froid est l'un des contraintes majeure pour la production et la productivité de riz dans les régions tempérées et aussi bien dans les hauts plateaux des régions tropicales du monde (Jena, 2010). L'effet du froid sur le riz se manifeste de plusieurs manières selon la phase de développement au cours de laquelle il est intervenu.

- Le froid retarde la croissance végétative et le tallage des jeunes plantes de riz. Il provoque aussi un allongement du cycle de développement des cultivars de riz. Cui *et al.* (2004) rapportent que le froid est l'un des sérieux stress environnementaux qui affecte la croissance des plantes de riz.

- Au stade montaison, épiaison et reproductif le froid a des conséquences sur la fertilité des épillets. Les basses températures au stade reproductif causent une grande stérilité des épillets et réduisent la production des cultivars élites de riz (Jena, 2010). Les températures dans l'ordre de 15 à 19°C au stade reproductif provoquent le développement de microspores impaires qui conduit à la production de grains de pollens stériles entraînant une grande stérilité des épillets (Satake, 1976).

- Au stade de maturation le froid provoque un défaut du remplissage des grains. C'est ainsi qu'il est rapporté par Suh *et al.* (2010) que les basses températures au stade reproductif se manifestent chez les cultivars de riz par un allongement de la phase végétative et de l'épiaison. Elles réduisent la fertilité des épillets et affectent la qualité des grains.

La saison froide est une période avec plusieurs effets défavorables à la riziculture et entraîne sans doute des pertes de rendement des récoltes. La faible température au stade reproductif réduit le rendement (Saito *et al.*, 2004).

Les basses températures provoquent un enroulement et un dessèchement des feuilles. Elles causent une stérilité mâle des fleurs. Cette stérilité est due à la dégradation et la mort des tissus des anthères au stade tri nucleus suivi de la rupture et d'une dispersion des pollens. Une approche protéomique montre que le froid réduit l'activité des molécules du milieu intra-intracellulaire. Les stress causent une réduction de l'eau et un changement osmotique du milieu cellulaire, une suppression de l'activité des molécules cellulaires et il peut résulter une réduction de la croissance et une grande perte de la production agricole. Les plantes vont développer un mécanisme complexe de perception de signaux externes et répondent aux stress environnementaux avec des changements physiologiques appropriés (Hashimoto et Komatsu, 2007).

3. L'utilisation des marqueurs moléculaires dans l'amélioration variétale

Les marqueurs moléculaires sont utilisés par exemple pour l'étude de la diversité génétique et l'identification des gènes utiles. Le développement des marqueurs moléculaires d'ADN a irrémédiablement changé la génétique et la sélection des plantes (Collard et Mackill; 2006). A cause de leur abondance, les marqueurs moléculaires sont très utilisés dans la sélection. Ils sont appliqués sur l'étude de la diversité génétique, la détection des gènes d'intérêt et la sélection assistée par marqueurs. Les marqueurs moléculaires d'ADN sont devenus un outil important pour l'analyse génétique et l'amélioration des cultivars (Akhtar *et al.*, 2010). Cette technologie a permis une meilleure connaissance du patrimoine génétique des céréales, et le développement de nouvelles sources à potentiel génétique favorable. Elle a permis l'amélioration de la stratégie de sélection de variétés pour la tolérance au stress.

Sur un gel d'électrophorèse les marqueurs polymorphiques peuvent montrer une différence de bande entre les génotypes. Les marqueurs qui ne révèlent pas la différence de taille des bandes sont dits monomorphiques. Les marqueurs polymorphiques sont distingués en marqueurs codominants qui montrent une différence de taille des bandes et en marqueurs dominants qui détectent la présence ou l'absence de bandes.

4. Les marqueurs microsatellites

Les marqueurs microsatellites ou Single Sequence Repeat (SSR) ont des motifs pouvant être mono-, di-, tri- ou tétra nucléotidiques. Les plus courants sont (A)_n, (TC)_n, (TAT)_n, (GATA)_n, n pouvant atteindre plusieurs dizaines. Ils ont été découverts en premier chez les eucaryotes (Hamada *et al.*, 1982). Les microsatellites ou SSR sont réputés être les plus performants pour des analyses de diversité dans de vastes collections de ressources génétiques. Ce sont des séquences de quelques nucléotides (1 à 6) répétées en tandem, abondamment dispersées à travers tout le génome, multi-alléliques, codominantes et facilement amplifiables par PCR. Les SSRs sont très variables et distribués régulièrement sur le génome. Le nombre d'unités de répétitions varie parmi les organismes allant jusqu'à 50

copies de l'unité de répétitions. Cette variation de taille du produit PCR est causée par les différences dans le nombre de répétitions du microsatellite.

L'un des principaux avantages des microsatellites par rapport à d'autres marqueurs est leur taux de polymorphisme élevé en raison de la variabilité du nombre de répétitions à un locus donné (Poulsen *et al.*, 1993).

5. La Sélection Assistée par Marqueurs (SAM)

Les connaissances en biotechnologie ont changé la stratégie de lutte contre les stress liés aux facteurs de l'environnement comme le froid. C'est ainsi que la Sélection assistée par marqueurs (SAM) est une nouvelle technique utilisée dans divers programmes de sélection comme l'amélioration de lignées pour la tolérance aux stress liés aux facteurs de l'environnement. La technique des marqueurs moléculaires a comblé le vide laissé par la sélection classique. C'est une méthode guidée par les marqueurs moléculaires d'ADN qui sont liés à des régions de génomes responsables ou impliquées dans la présence de caractères à effet quantitatif chez une espèce. Ces marqueurs vont permettre de suivre le transfert des QTLs. Ainsi, Victor Korzun, (2002) rapporte que la connaissance de la localisation des gènes/traits et des allèles spécifiques offre la possibilité d'appliquer la sélection assistée par marqueurs, parce que l'un des objectifs principale en sélection des plantes est l'introgession d'un ou de plusieurs gènes favorables du parent donneur dans le fond génétique de la variété élite.

Cette technique a de nombreux avantages, elle augmente l'efficacité de la sélection parce qu'elle réduit le temps de sélection, comparé à la méthode conventionnelle. Il est rapporté par Manneh *et al.* en 2007 que l'utilisation des marqueurs moléculaires d'ADN peut accélérer le développement de cultivars dans des milieux de culture variables, contrairement au phénotype.

Le phénotype peut être influencé par les conditions du milieu, ce qui fait que les études basées uniquement sur le phénotype sont souvent moins efficaces pour développer des variétés tolérantes aux stress dues à certains facteurs de l'environnement. La sélection conventionnelle des céréales est une consommation de temps et dépend des conditions environnementales. Le développement d'une nouvelle variété peut prendre 8 ou même 12 ans (Akhtar *et al.*, 2010). Les avantages fondamentaux de la sélection assistée par marqueur comparé à celle conventionnelle sont :

- Plus simple comparé au suivi phénotypique, la sélection peut être effectuée au stade végétatif, une seule plante peut-être sélectionné avec une grande fiabilité (Collard et Mackill, 2006).

- La sélection peut être réalisée au stade juvénile. L'analyse du matériel génétique peut être réalisée sur les jeunes plantes pour vérifier si l'introgession a été réussie. Ceci permet de réduire la durée et d'accélérer le processus de la sélection.

D'après Manneh *et al.* (2007) la sélection assistée par marqueurs peut aider le sélectionneur à surmonter les problèmes de faible efficacité de la sélection rencontre durant la sélection phénotypique pour le rendement en stress environnement.

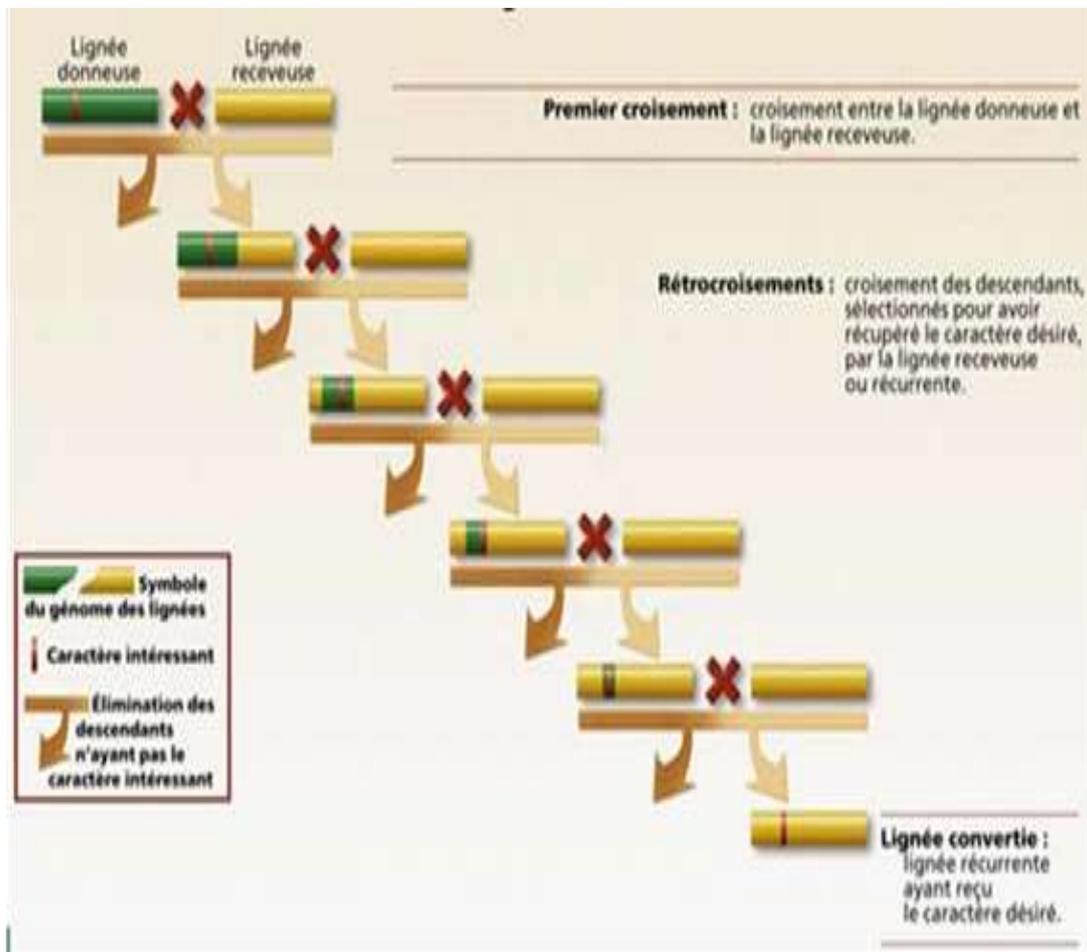


Figure 4: schéma de l'introgression d'un caractère d'intérêt dans une ligné

L'utilisation des marqueurs moléculaires d'ADN dans l'amélioration génétique de variétés se fait suivant plusieurs étapes. L'une de ces étapes est la cartographie des QTLs pour l'identification des gènes ciblés responsables ou impliqués dans la présence de caractères à effet quantitatif chez l'espèce et les marqueurs liés à ces QTLs. Pour Collard et Mackill (2006) la cartographie des QTLs est très importante pour la sélection assistée par marqueurs. Elle représente le fondement du développement des marqueurs pour la Sélection Assistée par Marqueurs. Elle représente donc une phase primordiale. La localisation des QTLs rencontre souvent des difficultés qui sont liées par exemple à la taille de la population, surtout pour les traits à caractère quantitatif complexe avec plusieurs QTLs chacun avec un effet relativement faible.

L'amélioration génétique de variétés pour la tolérance au stress par la méthode de la SAM fait intervenir le croisement entre une variété source de gènes cibles de la sélection et une variété élite qui donne une descendance hybride. Le croisement backcross entre les descendants et le parent élit (parent récurrent) permet de réduire au maximum l'introgession de génome du parent donneur dans la descendance (Fig. 4).

Dans la sélection backcross la région de QTL est introgressé dans le fond génétique des descendants, puis le nettoyage du fond génétique est effectué. Elle permet de développer des descendants avec l'introgession du gène d'intérêt et le minimum d'introgession de gènes du parent donneur au niveau de la région de QTL. Ce sont précisément les marqueurs flanquant qui vont permettre la sélection des individus ayant reçu le QTL. Les marqueurs peuvent être utilisés pour la sélection contre le génome du donneur ce qui peut accélérer la récupération du génome du parent récurrent. Avec le backcross conventionnel, il faut un minimum de 5 à 6 générations pour la récupération du parent récurrent (Collard et Mackill, 2006).

6. Le développement de souches tolérantes au froid à partir de Silewah

La variété indonésienne Japonica tropicale Silewah a des facteurs génétiques qui confèrent la tolérance au froid au stade montaison (IRRI, 1978 ; Satake et Toriyama, 1979). Elle est utilisée comme donneur pour la création de nouvelles variétés tolérantes au froid dans les programmes de sélection. Par contre ses caractères agronomiques ne sont pas appréciés par les sélectionneurs. Cependant, les facteurs génétiques qui confèrent une tolérance au froid de cette variété n'ont pas été analysés de manière approfondie (Mori et al., 2011). Il y en a plusieurs dans le génome de Silewah pouvant être utilisés dans plusieurs programmes de sélection. C'est ainsi que Norin-PL8 une variété tolérante au froid a été obtenue par croisement backcross entre Hokkai 241 et Silewah. Mori *et al.* (2011) rapportent qu'une souche tolérante au froid, Norin-PL8, a été développée à partir de Silewah par rétrocroisement avec une souche à Hokkaido comme le parent récurrent par Abe et al. (1989). Cette souche tolérante au froid a reçu des segments chromosomiques venant de la variété Silewah. Nous trouvons 5 segments chromosomiques au niveau du chromosome 1 (2 segments), 3,4 et 8 incorporés par Norin-PL8 à partir de Silewah (Saito *et al.*, 2003). Des études plus approfondies ont permis d'établir la relation entre les segments chromosomiques incorporés et la tolérance au froid au stade montaison chez Norin-PL8. Ils ont montré que la

tolérance au froid a été liée à la présence de QTLs donnant la tolérance au froid au stade montaison au niveau des chromosomes 3 et 4. Un segment *Qctb3* sur le bras court du chromosome 3 et des segments chromosomiques dénommés les *Ctb1* et *Ctb2* sur le bras long du chromosome 4 sont responsables de la tolérance au froid au stade montaison chez Norin-PL8.

D'autres souches tolérantes au froid ont été créées en utilisant Silewah comme donneur pour la tolérance au froid. Joukei-04501 et Joukei-04502 dérivent du croisement entre Silewah et les souches à Hokkaido par la méthode conventionnelle de la sélection phénotypique (Yoshimura *et al.*, 2006). Mori *et al.* (2011) rapportent que la souche Joukei-06214 a été développée par la sélection backcross entre Silewah et une variété à Hokkaido Hoshinoyum qui est le parent récurrent. Ils ont utilisé l'analyse par les marqueurs moléculaires pour détecter de nouveaux QTLs différents des QTLs précédemment identifiés par Saito *et al.* (1995) qu'ils ont appelé *qCTB3-Silewah*. Les régions génomiques introgressées à partir de Silewah par les souches Joukei-04501 et Joukei-04502 sont différentes des régions de QTLs de Norin-PL8 ; *qCTB3-Silewah* a été sélectionné par la méthode phénotypique et introduit dans Joukei-06214 durant les programmes de Sélection (Mori *et al.*, 2011).

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel végétal et conditions d'expérimentation au champ

Le matériel végétal utilisé est constitué de :

- NERICA-L19 et Sahel108, qui sont deux variétés populaires en Afrique et sensibles au froid.
- Silewah utilisé comme parent donneur pour la tolérance au froid.
- Les populations BC₁F₁ de NERICA-L19/Silewah (33 individus) et Sahel108/Silewah (65 individus).

La levée de dormance a été réalisée pendant 4 jours dans l'étuve à 50°C. A la sortie de l'étuve les semences des populations BC₁F₁ ont été décortiqués avant d'être rincés avec de l'eau de javel puis avec de l'eau.

Les grains ont été pré-germés dans des boîtes de Petrie. Après pré-germination, les jeunes plantes ont été transférées dans des bacs puis dans une serre. Le semi est réalisé de sorte que les jeunes plantes ne soient pas serrées ou trop espacées. Pour ce fait, une distance de 5 cm est laissée entre les plants et entre les lignes. Pendant une durée de 18 jours avant de les transférer au champ.

Pour le repiquage au champ, le dispositif expérimental utilisé était un Augmented Design, Avec 5 blocs pour la population de BC₁F₁ Sahel 108/Silewah et 4 blocs pour la population de BC₁F₁ NERICA L 19/Silewah. Les parents de chaque croisement était utilise comme des témoins et ils étaient répétés dans chaque bloc et chaque plant représente un individu. Vingt jours après le repiquage, un prélèvement des feuilles a été réalisé pour l'extraction d'ADN au Laboratoire (Fig. 5a et b).

2. Analyse moléculaire

2.1. Extraction d'ADN

L'ADN a été extrait selon la méthode CTAB (bromure de céthylméthyl ammonium) Miniprep selon Murray et Thompson, (1980) modifié. De jeunes feuilles (2 ou 3) ont été prélevées puis mises dans des tubes Eppendorf de 2 ml et broyées en présence de deux billes d'acier à l'aide d'un GenoGrinder. Après broyage, 800 µl de tampon de 2 X CTAB préchauffé à 65°C ont été ajoutés.

Les échantillons ont ensuite été incubés dans un bain marie à 65°C pendant 30 min à 1 h. Après, 800 µl d'un mélange chloroforme-iso-amyl alcool (24-1) a été ajouté puis l'ensemble homogénéisé pendant 20 min à température ambiante et centrifugé à 12 000 rpm pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a été prélevé puis transféré dans un nouveau tube et 600 µl isopropanol froid y été ajoutés puis incubé à -20°C ou -80°C pendant 30 min-1 h pour faire précipiter l'ADN. Ensuite le mélange a été centrifuge a 14 000 rpm pendant 10 min à 4°C et après, l'ADN au est lavé avec de l'éthanol 70% puis centrifuger à nouveau à 14 000 rpm pendant 10 min à 4°C. Après séchage à température ambiante environ 1 h le culot d'ADN était suspendu dans 100-200 µl de TE 1 X.

1	26	30	100	80	95	10	74	38	62	9	85	60	18	27	37	41	-1	-2	40	36	47	67	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2	81	5	28	-2	98	39	54	16	77	-1	68	45	34	3	99	14	59	50	31	97	22	86	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
3	49	71	24	55	53	19	-1	13	58	35	72	29	-2	8	63	66	96	70	46	61	90	56	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4	92	-1	88	43	17	73	65	-2	94	23	93	69	57	91	76	21	1	20	4	78	84	25	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
5	6	51	82	-2	83	15	87	42	-1	79	2	33	75	64	89	11	32	12	52	48	7	44	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Figure 5a : Plan de randomisation de la population BC₁F₁ Sahel 108/Silewah

1	36	-1	15	13	35	27	18	9	47	5	57	-2	23	24	53	51	59
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2	1	17	34	46	56	55	-1	28	29	21	48	-2	40	44	31	33	8
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
3	7	43	-2	37	32	16	38	20	6	39	26	50	49	30	45	-1	22
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4	10	-2	25	41	11	14	58	54	19	60	-1	42	2	4	3	12	52

Figure 2b : Plan de randomisation de la population BC₁F₁ NERICA L 19/Silewah

L'ADN prêt était conservé à -20°C ou bien des dilutions d'une proportion de 1/3 avec de l'eau ultra pure sont réalisées pour obtenir des solutions de travail pour les différentes réactions PCR.

2.2. Amplification de l'ADN

L'amplification de l'ADN a été réalisé dans des tubes Eppendorf contenant un volume final de 10 μl contenant 2 μl d'ADN à 100 ng/ μl , de 1 μl de dNTP à 1 mM, 0,5 μM d'amorces à 10 Mm, 4,2 μl de l'eau ultra pure (ddH₂O), 1 μl de tampon 10X, de 0,3 μl MgCl₂ à 25 mM et 0,5 μl de Taq polymérase locale. Les tubes ont ensuite été transférés dans un thermocycleur programmé à 94°C pendant 5 min pour une prédénaturation suivie de 34 cycles comprenant chacun une dénaturation à 94°C pendant 1 min, une Hybridation à 55°C pendant 1 min et une élongation de l'ADN à 72°C pendant 2 min. Enfin une élongation finale à 72°C pendant 5 min a été réalisée.

2.3. Electrophorèse sur gel et Visualisation

Avant l'électrophorèse, 2 μl d'ADN ont été mélangés avec 4 μl de bleu de bromophenol 1X puis ont été faits migré dans le gel de acrylamide (7%) ou agarose (3%) disposé dans une cuve à électrophorèse contenant un tampon de migration TAE ou TBE 1 X à 100 V pendant 2 h à 2 h 30 min. Apres migration le gel a été coloré par immersion pendant 5 à 10 min dans une solution contenant du bromure d'éthidium 5% sous rayons UV à 320 nm puis photographié par une camera Gel Doc.

3. L'analyse des données moléculaires

Les gels on été scores selon le mode suivant : (A) pour le parent récurrent (B) pour le parent donneur et (H) est pour un descendant hybride et (C) pour l'absence de bandes. Afin de construire un fichet excel. Sur ce fichet on voit dans la première colonne les chromes (group) et les marqueurs. Dans la première ligne il y a les génotypes sur la deuxième colonne se trouve les positons des marqueurs sur le chromosome. La position des marqueurs utilisé pour le foreground selection a été retrouvée dans le site Gramen par Cornell SSR 2001(<http://www.Gramen.>). Ce fichet a été analyse par le logiciel GGT (Graphical GenoTypes) version 2007. C'est un logiciel de représentation graphique des données de marqueurs moléculaires. Cet outil a permis d'évaluer la fréquence allélique au sein de la population BC₁F₁ pour identifier les marqueurs microsatellites liés aux QTLs de tolérance au froid au stade montaison chez Silewah qui sont favorables à la sélection des individus avec introgression. Egalement elle a permis de voir parmi les descendants avec introgression ceux qui sont intéressants pour l'avancement de la population en BC₂.

RESULTATS

1. Etude de polymorphisme

Parmi les 141 marqueurs SSRs utilisés 82 étaient polymorphes entre les parents. Après la révélation les variétés ont été comparées les unes des autres par rapport à la position des différentes bandes (allèles) un exemple a été représenté dans le (Tableau 2). La Figure 6 illustre le polymorphisme génétique des variétés avec quelques marqueurs SSRs. Ces résultats ont permis de distinguer un polymorphisme génétique entre les variétés. Le pourcentage de marqueurs polymorphes étaient obtenu par la formule : $100 \times n/N$; N = nombre de marqueurs utilisés sur un chromosome et n= nombre de marqueurs polymorphes sur un chromosome. Elle est 58% entre Sahel 108 et Silewah et 58% entre NERICA-L19 et Silewah.

2. Le foreground selection : Identification des individus avec introgression

Les individus de la population ont été comparés avec les deux parents au niveau des régions de QTLs en amplifiant les régions de microsatellites de ces QTLs par les amorces des marqueurs microsatellites (RM523, RM231). L'allèle de Silewah était noté (B) l'allèle de NERICA-L19 était noté (A), celui d'un descendant hétérozygote est (H) et l'allèle manquant était attribué (C). La première piste de migration correspond au marqueur de taille, la deuxième et la troisième piste de migration correspondent respectivement aux parents P_1 (Silewah) et P_2 (NERICA-L19) et en suite les descendants. Un exemple des résultats observés après amplification avec une des deux microsatellites liés au QTL (*Qctb3*) sur le chromosome 3 est présenté dans la Figure 7.

Ces analyses ont permis d'identifier au sein de la population BC_1F_1 de NERICA-L19/Silewah les descendants qui ont à la fois l'allèle du parent donneur Silewah et du parent récurrent NERICA-L19 dans la zone de QTL (*Qctb3*) localisé sur le bras court du chromosome 3. Ils ont permis également de voir les individus homozygotes du parent donneur au niveau de cette région.

La Figure 8 représente le résultat observé après amplification avec l'un des trois microsatellites flanquant des régions de QTLs sur le chromosome 4.

Les profils obtenus montrent la présence au sein de la population BC_1F_1 NERICA-L19 / Silewah des descendants hétérozygotes. On observe des hétérozygotes constants, qui ont reçu l'allèle des deux parents au niveau de la région de microsatellite amplifiées par les amorces des trois marqueurs. Les individus homozygotes du parent donneurs ont été aussi observés.

La Figure 9 représente le résultat obtenu avec la population BC_1F_1 Sahel108/Silewah après amplification avec les microsatellites liés au QTL du froid sur le chromosome 3.

Ce profil représentant quelques individus de la population BC_1F_1 Sahel108/ Silewah, comparé aux deux parents après amplification par le microsatellite RM523.

Ainsi la première piste de migration est le marqueur de taille, la deuxième et la troisième correspondent respectivement à P_1 (Silewah) et P_2 (Sahel108) et ensuite les descendants.

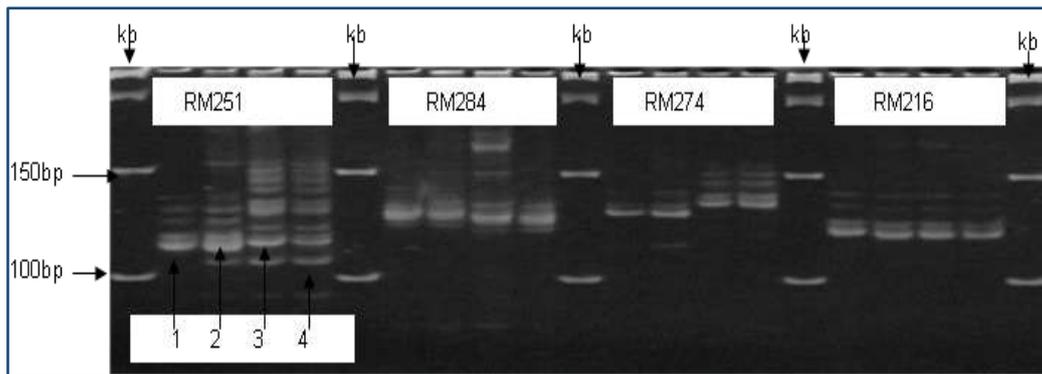


Figure 6 : Profil électrophorétique de l'étude de polymorphisme génétique des parents

Tableau 2 : Polymorphisme génétique des variétés par quelques marqueurs SSRs

Génotypes	RM251	RM284	RM274	RM216
1	A	A	A	A
2	B	A	A	A
3	C	B	B	A
4	C	A	B	A

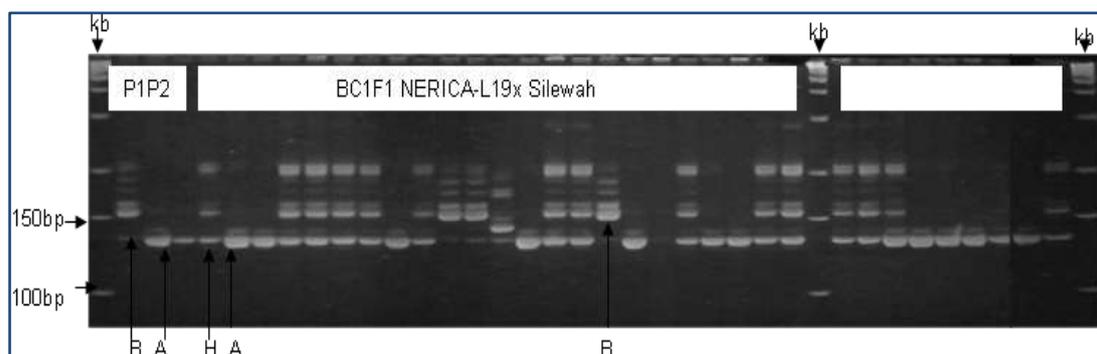


Figure 7: Profil électrophorétique de la population BC_1F_1 de NERICA-L19 / Silewah obtenu par amplification avec RM523

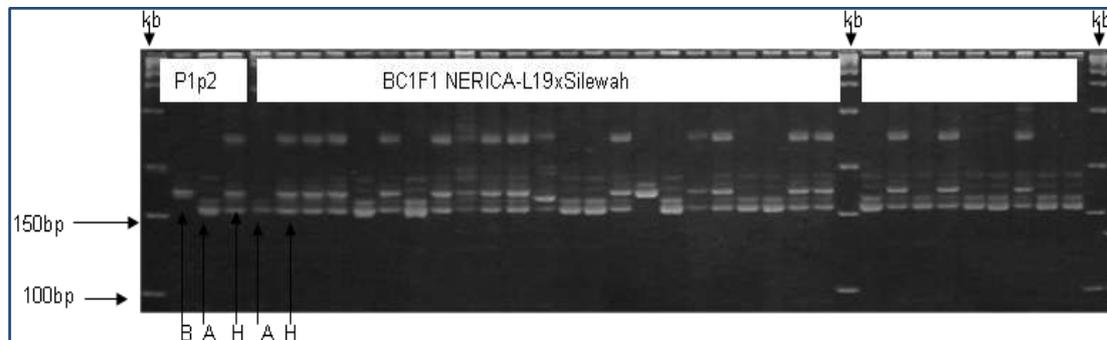


Figure 8: Profil électrophorétique de la population BC₁F₁ de NERICA-L19/Silewah, obtenu après amplification avec le microsatellite RM280

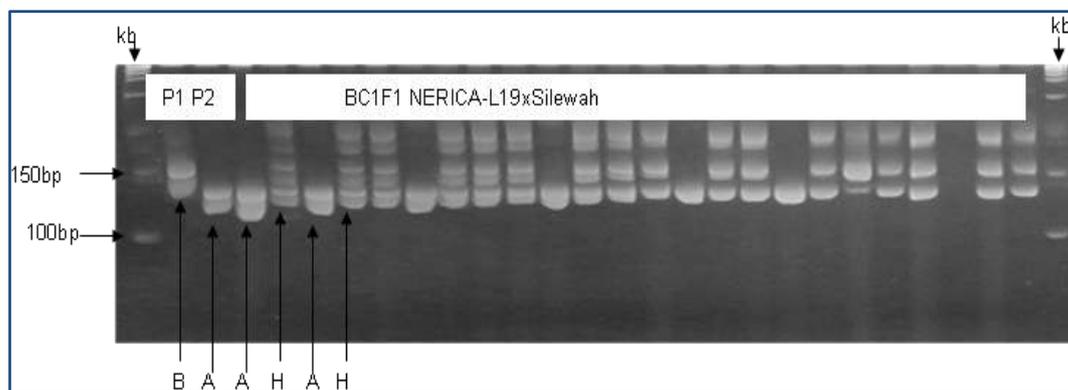


Figure 9 : profile électrophorétique de quelques individus de la population BC₁F₁ Sahel108 / Silewah, obtenu par amplification avec RM523

L'allèle de Silewah est noté (*B*) l'allèle de Sahel108 est noté (*A*), celui d'un descendant hétérozygote est (*H*) et l'allèle manquant est (*C*).

La Figure 10 est le résultat obtenue après amplification avec le microsatellite RM255 qui se localise dans la zone de QTL (*Ctb1* et *Ctb2*) sur le chromosome 4.

Sur cette figure 24 descendants de la population BC₁F₁ Sahel108/ Silewah sont représentés. Les descendants sont comparés aux deux parents sur une région de microsatellite du chromosome 4 amplifiée par les amorces de RM255. C'est ainsi la première piste de migration correspond au marqueur de taille, puis viennent les parents *P*₁(Silewah) et *P*₂ (Sahel108) dans cet ordre, et les descendants.

Ces résultats ont permis de déterminer des descendants hétérozygotes de la population BC₁F₁ Sahel108 / Silewah au niveau des régions sur bras court du chromosome 3 et sur le bras long du chromosome 4.

Sur le chromosome 3 le microsatellite RM523 se trouve sur la même position que RM569 (11cM). Le microsatellite RM569 et RM231 sont liés au QTL sur le bras court du chromosome 3. Le microsatellite RM231 se localise à 15,7 cM donc positionné vers le bas du QTL sur le chromosome 3. Ces microsatellites encadrent la région du QTL qui se trouve sur le bras court du chromosome 3. Sur le chromosome 4 se localisent les *Ctb1* et *Ctb2* qui sont deux QTLs de tolérance au froid chez Silewah au stade montaison. L'identification des individus avec introgression de gène de Silewah au niveau de la région de QTLs sur le bras long du chromosome 4 a été réalisée en utilisant les microsatellites RM255, RM348 et RM280. Le microsatellite RM255 se trouve dans la zone de QTL, de même RM349 et RM303. Le microsatellite RM349 est proche de RM348 ce qui permet de remplacer RM349 qui n'a pas donné un bon polymorphisme par RM348. Le microsatellite RM280 se situe dans une région plus en bas. Ce dernier a un taux d'hétérozygotes de 17/33, d'homozygotes parent récurrent 14/33 et d'homozygotes parent donneur 1/33. Il se trouvant à 152,3 cM, donc tout à fait en bas du *Ctb1*, mais aussi par son polymorphisme.

3. Le Background selection: Identification des individus avec le moins d'introgession de parent donneur

A partir de l'analyse du foreground selection, 20 individus avec introgression au niveau de région de QTL ont été sélectionnés parmi les 33 descendants de la population BC₁F₁ de NERICA-L19/ Silewah.

Le Tableau 3 représente les individus qui ont reçu les gènes de Silewah au niveau de la région de QTL sur le chromosome 3. Ce résultat est obtenu par amplification avec les deux marqueurs microsatellites RM523 et RM231.

Le Tableau 4 représente les quelques descendants de la population BC₁F₁ NERICA-L19/ Silewah qui ont l'introgession les gènes de Silewah au niveau des régions de QTLs localise sur le chromosome 4. On voit que certains individus ont reçu les allèles du parent donneur pour tous les 3 microsatellites.

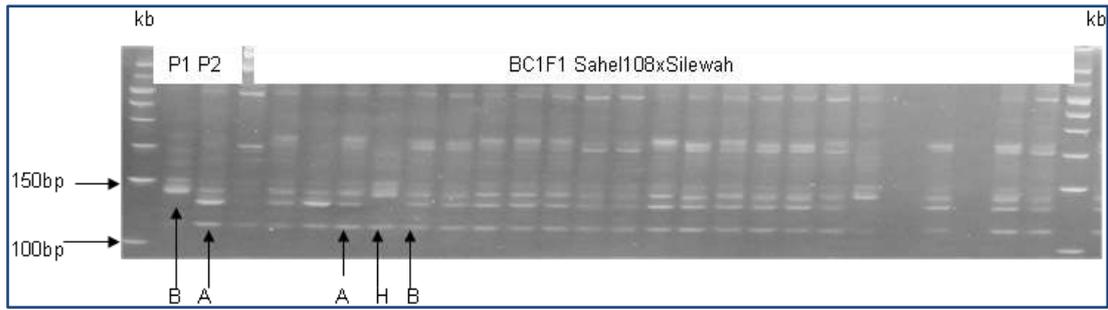


Figure 10: Profil électrophorétique de quelques individus de la population BC₁F₁ Sahel108/Silewah amplification avec RM255

Tableau 3: Individus avec introgression des gènes de Silewah au niveau de la région de QTL (*Qctb3*) lié à la tolérance au froid sur le chromosome 3

Chromosome 3		
Individus	RM523	RM231
Silewah	B	B
NERICA-L19	A	A
2	H	H
12	H	H
19	H	H
21	H	H
22	B	C
32	H	H
33	H	H
43	H	H

Tableau 4 : Individus avec introgression d'allèles de Silewah au niveau de la région des QTLs (*Ctb1* et *Ctb2*) liés à la tolérance au froid sur le chromosome 4

Chromosome 4			
Individus	RM255	RM348	RM280
Silewah	B	B	B
NERICA-L19	A	A	A
1	H	C	H
3	H	A	H
4	H	H	H
8	C	H	H
11	H	H	H
13	C	H	H
14	H	A	H
16	H	H	H
21	C	H	H
30	H	H	H
34	H	B	H
37	H	H	H
40	H	C	H

4. Représentation graphique des génotypes

Sur la Figure 11 obtenue par la représentation graphique des génotypes par GGT montrent la proportion de génome des parents dans chaque descendant. Elle permet de distinguer au sein des individus avec introgression un groupe d'hétérozygotes ou l'allèle du parent donneur est présent en condition d'hétérozygotes seulement et un autre groupe des homozygotes ou l'allèle du parent donneur est aussi en condition d'homozygotes.

Elle a permis également de les séparer en deux groupes : le premier groupe est formé par les individus hétérozygotes au niveau de toutes les régions avec introgression de parent donneur. Ce sont les BC_1F_1 , et il y avait 4 individus. La Figure 12 est la représentation graphique des 4 individus BC_1F_1 .

Le Tableau 5 montre la répartition des allèles des parents au sein des 4 descendants hétérozygotes avec introgression de Silewah. L'allèle de NERICA-L19 est plus présent dans cette descendance.

De l'autre part la représentation graphique des génotypes a montré la présence de 16 individus homozygotes du parent donneur Silewah au niveau des introgressions. Ce sont de génération F_2 .

Sur la Figure 13 on voit clair que la plus part des génotypes ont reçu l'allèle de Silewah au niveau de la région de QTL sur le chromosome 4 et aussi sur le chromosome 3. Quelques 3 individus n'ont pas introgressé les gènes au niveau de la zone de QTL du chromosome 3 (4, 37, 40). Ils n'ont que les gènes du parent récurrent au niveau de cette région. Cependant ils ont reçu l'allèle de Silewah au niveau de la région de QTL sur le chromosome 4. Il ya trois individus homozygotes parent donneur au niveau de la région de QTL sur le chromosome 3 (13, 14, 22) et deux sur le chromosome 4 (2, 7). Les homozygotes parent donneur sont intéressants lorsque l'introgression se déroule dans la zone des QTL. De ce fait on suppose que les gènes de tolérance au froid sont déjà en condition d'homozygotes dans la descendance. Parce que la technique de sélection a comme objectif, réduire au maximum les gènes de Silewah dans le génome des individus avec introgression.

Sur le Tableau 6 on voit la répartition des allèles des parents au sein des descendants avec introgression. L'allèle de NERICA-L19 est plus représenté que celui de Silewah qui est présent chez tous les descendants à des proportions non négligeables. Le tableau montre que le pourcentage d'hétérozygotie est important se trouvant entre 50 à 70% chez les génotypes (1, 2, 3, 8, 12, 13, 19, 21, 22, 43).

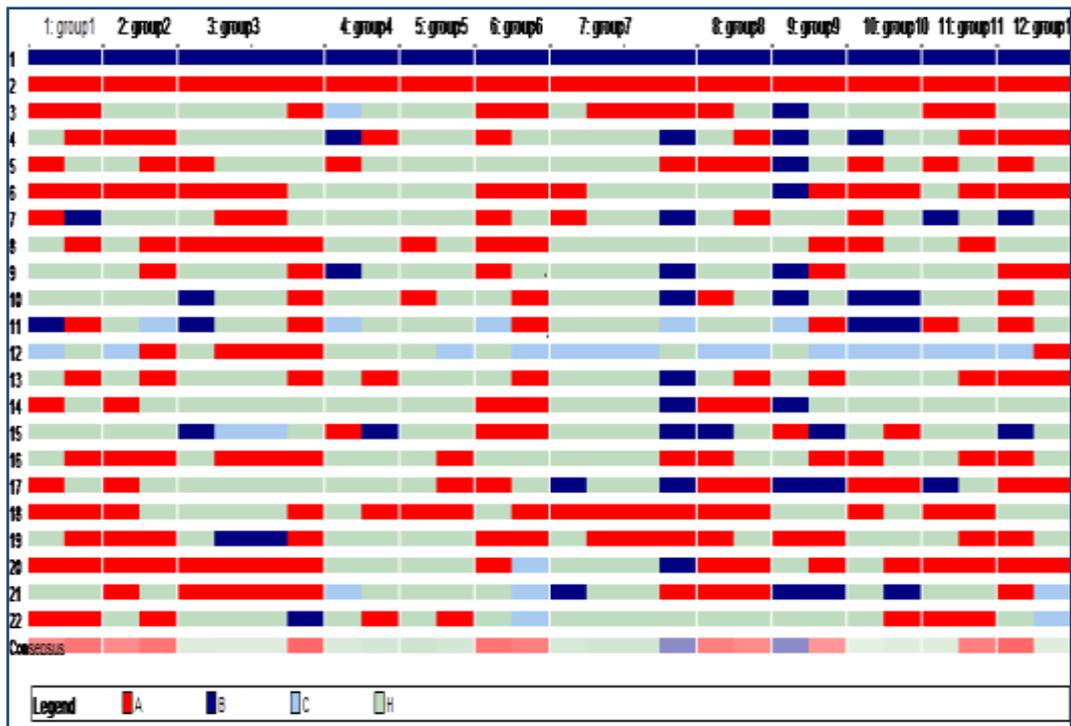


Figure11: Représentation graphique des génotypes de tous les individus avec introgression

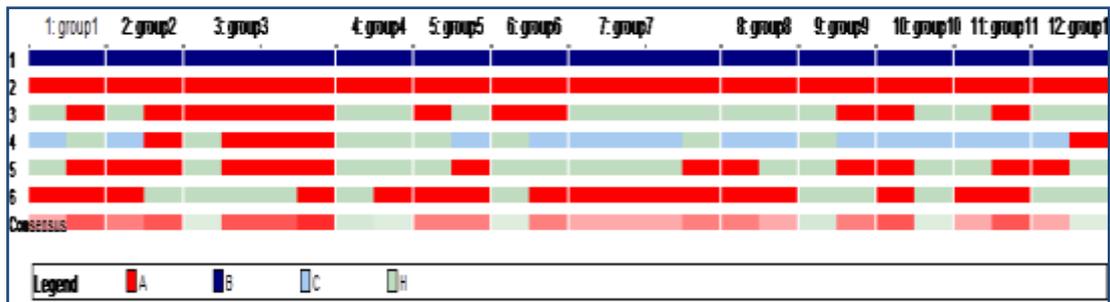


Figure 12: Représentation graphique des BC₁F₁ avec introgression de Silewah en condition d'hétérozygote

Tableau 5: Fréquence allélique des individus hétérozygotes

Individus	A%	B%	C%	H%
11	42,9	0	0	57,1
16	17,9	0	53,6	28,6
30	46,4	0	0	53,6
33	60,7	0	0	39,3

A= allèle NERICA-L19, B= allèle Silewah, C= allèle manquant et H= allèle hétérozygote.

11=3	16=4	30=5	33=6
------	------	------	------

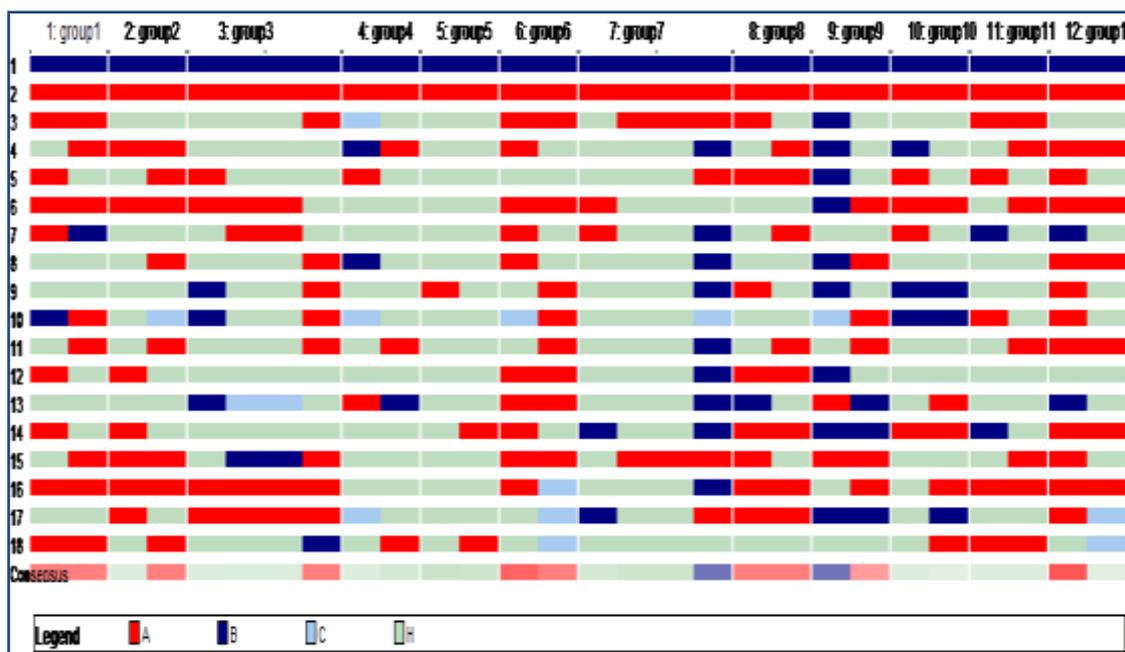


Figure 13: Représentation graphique des descendants de NERICA-L19/ Silewah avec introgression et homozygote de parent donneur

Tableau 6: Fréquence allélique des génotypes avec introgression homozygotes parent donneur

Individus	A%	B%	C%	H%	QTL chrom3	QTL chrom4
1	39,3	3,6	3,6	53,6	H-H-	C-H
2	32,1	14,3		53,6	H	B-A
3	35,7	3,6		60,7	A-H-	A-H
4	57,1	3,6		39,3		H
8	25	14,3		60,7	H-A-	H
12	21,14	10,7		67,9	H	B-H
13	17,9	17,9		64,3	B-H-	H
14	21,4	14,3	17,9	46,4	B-H-	H
19	35,7	3,6		60,7	H	H
21	21,4	7,1		71,4	H	H
22	17,9	21,4	7,1	53,6	B-C-	A-B
32	35,7	17,9		46,4	H	H
34	50	7,1		42,9	H-B-	H
37	60,7	3,6	3,6	32,1		H
40	32,1	14,3	10,7	42,9		H-C-H
43	28,6	3,6	7,1	60,7	H-H	H

A= allèle NERICA-L19, B= allèle Silewah, C= allèle manquant et H= allèle hétérozygote.

1=3	2=4	3=5	4=6	8=7	12=8	13=9	14=10
19=11	21=12	22=13	32=14	34=15	37=16	40=17	43=18

DISCUSSION

1. Sur l'étude de polymorphisme

En comparant le polymorphisme entre les variétés tolérantes et les variétés sensibles, la proportion de marqueurs microsatellites polymorphique est élevée. Sur les 141 marqueurs microsatellites utilisés 82 microsatellites révèlent un polymorphisme génétique entre Sahel108 et Silewah et aussi entre NERICA-L19 et Silewah. En comparant les variétés sensibles et les variétés tolérantes sur chaque chromosome, on voit que sur certains chromosomes tels que les chromosomes 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9 et 12 le pourcentage de marqueurs polymorphiques était très élevé (environ 60%).

Ces résultats montrent que les 82 marqueurs polymorphes sont bien adaptés pour la sélection assistée par marqueurs. On retient de Akhtar *et al.* (2010) il y a cinq conditions qui caractérisent un marqueur moléculaire approprié parmi les quelles il y a polymorphisme. Idéalement les marqueurs doivent être hautement polymorphes dans le matériel en sélection c.i.e ils doivent être discriminant entre les différents génotypes. Les résultats obtenus de la comparaison sur chaque chromosome entre tolérantes et sensibles, montrent que les variétés tolérantes sont très différentes du point de vue génétique des variétés sensibles au niveau de certains chromosomes. Cela suggère que sur certains chromosomes il peut y avoir des sources à potentiel génétique favorable pour la tolérance au froid. On retient de Satake et Toriyama, (1979) que Silewah est l'une des variétés avec une haute tolérance au froid au stade montaison. Des QTLs de la tolérance au froid ont été cartographiés sur les chromosomes 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9 et 12 dans plusieurs croisements entre les variétés *Japonica/Indica* (Andaya et Mackill, 2003). Saito *et al.* (1995) ont montré que des segments sur les chromosomes 3 et 4 qui ont été introgressés à partir d'une variété *Japonica tropicale* (Silewah) dans Norin-PL8 sont associés à la tolérance au froid. Mori *et al.*, (2011) ont identifié dans des croisements le *qCTB₃* sur le chromosome 3 introgressé à partir de Silewah. Ces résultats issus de cette comparaison pourraient aussi être importants pour faire un choix attentif des descendance avec introgression.

2. L'identification des descendants avec introgression : Foreground selection

Vingt individus hétérozygotes ayant reçu les gamètes des deux parents en un locus donné au niveau des zones de QTL ont été sélectionnés de la population BC₁F₁ NERICA-L19 / Silewah. Huit individus étaient hétérozygotes au niveau de la région de QTL sur le chromosome 3. Treize individus ont reçu l'allèle des parents au niveau des zones au environ des *Ctb1* et *Ctb2* sur chromosome 4. Le choix des marqueurs microsatellites pour la détermination de la descendance avec introgression au niveau de la région de QTL a été décrit précédemment. Ils encadrent les régions des QTLs associés à la tolérance au froid au stade montaison sur les chromosomes 3 et 4 chez la variété Silewah. D'après Welz et Geiger, (1999) pour le foreground selection ce sont les marqueurs flanquant au tour des gènes cibles qui sont utilisés. Le succès de la sélection assistée par marqueur est influencé par la relation

qui existe entre les marqueurs et les gènes cibles. Pour examiner les régions génomiques de la tolérance au froid introgressées qui dérivent de Silewah, les marqueurs polymorphiques ont été sélectionnés sur une base de marqueurs SSRs reporté <http://www.gramene.org> (Mori *et al.*, 2011).

Les microsatellites RM523 et RM231 permettent la sélection de sept individus hétérozygotes constants, et un homozygote de parent donneur. Donc ces huit individus ont introgressé une partie de la région de QTL sur le chromosome 3. Un individu avait une introgression au niveau de cette même région les allèles de Silewah en condition d'homozygotes. Akhtar *et al.* (2010) les marqueurs flanquant ou intra génique peuvent augmenter largement la fiabilité des marqueurs à la prédiction du phénotype. La fréquence de recombinaison entre les gènes cibles et marqueurs flanquant est approximativement estimé à 5% (5 cM) (Tanksley, 1983).

Ces microsatellites ont permis la sélection de 14 individus avec introgression au niveau de la région des *Ctb1* et *Ctb2* sur le bras long du chromosome 4. Ces individus ont donc hérité sur au moins 2 locus l'allèle du parent donneur Silewah et du parent récurrent NERICA-L19. Un individu a hérité sur un locus l'allèle du parent donneur en condition d'homozygote. Pour détecter les QTLs responsable de la tolérance au froid nous recherchons les régions génomiques introgressées à partir de Silewah en utilisant les marqueurs moléculaires, la souche Joukei 501 reçoit des segments chromosomique au niveau des chromosomes 1, 2, 3, 4, 5, 10 et 11 et la souche Joukei 502 au niveau des chromosomes 3, 4, 7, 8 et 11 (Mori *et al.*, 2011).

Dans ce croisement BC_1F_1 , on devait avoir 50% hétérozygotes et 50% homozygotes parent récurrent, d'après les lois de l'hérédité de Mendel. Mais ici il y a souvent la présence de l'allèle du parent donneur en condition d'homozygote sur certains locus. Ce qui suggère qu'au cours du croisement il s'est produit une autofécondation. Ce qui fait qu'il ya la présence des individus de génération F_2 dans la descendance.

3. Identification des individus avec le moins d'introgression: Background selection

Il y avait 4 individus (11, 16, 30, 33) hétérozygotes dans la population BC_1F_1 de NERICA L-19/Silewah et pour ces individus la partie de génome hérité de NERICA-L19 est importante. Ces 4 individus sont tous hétérozygotes au niveau de la région des QTLs sur le chromosome 4. Sur le chromosome 3 les individus (16, 30, 33) étaient hétérozygotes et 11 était homozygote pour le parent récurrent. A partir des représentations graphiques avons pu sélectionner les génotypes plus intéressant avancement en BC_2 . Par exemple l'individu 33 qui a 60,7% de génomes de NERICA-L19 et 39,3% de génomes issu des deux parents. On peut estimer que l'individu 33 a 75% de génomes de NERICA-L19 et seulement 25% de génomes de Silewah. En plus de cela il a eu introgression des QTLs pour le froid sur les chromosomes 3 et 4. On retient que pour la génération BC_1 la proportion du génome du parent receveur doit être distribué normalement au tour d'une moyenne de 75%. L'individu 33 est important pour la sélection, de même que les individus 30 et 11. Mais ces derniers sont indiqués parce que le taux de gènes de Silewah est assez élevé dans leur génome. Pour les avancer il sera nécessaire

de faire le nettoyage du fond génétique par plusieurs backcross. Donc le temps de sélection peut s'allonger, c'est-à-dire il faut plus de temps pour éliminer les gènes indésirables venant de Silewah. Les souches Joukei ont des traits agronomiques inférieurs. Cependant une souche Joukei 214 a été développée à partir de Joukei 501 par backcross résultant du développement de souche avec haute tolérance au froid et un phénotype supérieur (Mori *et al.*, 2011).

Il y avait seize individus avec des introgressions homozygotes de parent donneur sur leur génome.

On constate (Tableau 6) que le pourcentage d'hétérozygotes est élevé souvent supérieur à 40%. Mais les valeurs des pourcentages d'homozygotes de parent récurrent et de parent donneur ne sont pas très éloignées et se rapprochent de 25% pour certains cas. Par contre dans d'autres cas ces valeurs sont très différentes. Mais il faut surtout noter que le pourcentage d'homozygotes parent récurrent est toujours proche de 20%.

Le choix des individus avec le moins d'introgression était basé sur : la présence des allèles de Silewah au niveau des zones de QTLs (*Qctb3*) sur le chromosome 3 et les (*Ctb1* et *Ctb2*) du chromosome 4. La valeur du pourcentage de génomes de Silewah était souvent élevée parce que les individus sont homozygotes de génération F_2 . Pour le croisement BC_1F_1 normalement on devait avoir 50% A et 50% H, B ne devait pas apparaître en condition d'homozygotes. S'il y a autofécondation, dans ce cas l'allèle de Silewah apparaît en condition d'homozygote. C'est-à-dire l'allèle de Silewah en condition d'homozygotes vient d'une autofécondation, et on aura 25% B, 25% A, et 50% H. Qui signifie que ces 16 individus étaient des F_2 s et pas des BC_1F_1 s.

Les individus 4, 1, 19, 37 étaient hétérozygotes au niveau d'un QTL au moins (Tableau 6, Figure 13) alors que l'individu 34 et 32 étaient hétérozygotes à la fois au niveau du *Qctb3* sur le chromosome 3 et au niveau des *Ctb1* et *Ctb2* du chromosome 4. Les individus 13 et 22 étaient homozygotes pour le parent donneur au niveau du *Qctb3* sur le chromosome 3 et l'individu 12 sur le chromosome 4 (Fig. 13).

Parmi les F_2 s le taux de génome du parent donneur étant important au sein du génome des individus avec introgression, il est nécessaire de faire plusieurs backcross pour éliminer les gènes indésirables venant du parent donneur. Pour Welz et Geiger, (1999) l'intention de la sélection assistée par marqueurs est d'accélérer la conversion de lignés. Les individus avec introgression héritant du parent donneur des gènes de tolérance au froid en condition homozygote sont très intéressants. Mais pour ce cas il faut évaluer leur comportement en les comparant avec la variété élite et après faire le nettoyage du fond génétique si nécessaire, pour confirmer si les introgressions homozygotes de parent donneur dans les autres régions de génomes ne sont pas liées aux caractères indésirables de Silewah.

Joukei 501 et Joukei 502 ont été développées par la sélection intensive à la dernière décennie, qui est possible d'éliminer les gènes indésirables et tester la valeur agronomique des gènes de tolérance au froid dérivés de Silewah sous les conditions environnementales en Hokkaido. (Mori *et al.*, 2011).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les marqueurs microsatellites utilisés dans cette étude sont bien adaptés pour la sélection assistée par marqueurs tenant compte du nombre d'allèles qui était polymorphique entre les parents.

Cependant malgré le taux de polymorphisme élevé, il existait un certain nombre de marqueurs SSRs qui n'avaient pas donné de résultats au cours de l'analyse de polymorphisme génétique. De même que pour la sélection assistée par marqueurs avec quelques marqueurs flanquant et intra génique. L'ADN étant de bonne qualité, cela pourrait être lié à des problèmes de la technique expérimentale ou à un défaut du matériel utilisé.

Par ailleurs il faut bien noter que le croisement backcross n'a pas bien marché. Parce que 16 sur 20 individus ont introgressé des allèles de Silewah en condition d'homozygote sur quelque parties de leur génome. Ce qui fait que la contribution du génome de Silewah dans la descendance avec introgression était élevée. Au lieu de BC₁F₁, il y a eu une F₂ par autofécondation et certaines valeurs de la fréquence allélique l'ont montré.

De ce fait il faut évaluer le comportement des individus qui ont reçu au niveau des zones de QTLs les gènes de Silewah déjà en condition d'homozygote pour avancer la sélection en effectuant d'autres croisements backcross.

La sélection assistée par marqueurs doit être faite pour la deuxième population aussi, c'est-à-dire Sahel 108/Silewah pour accélérer l'introgression des gènes de tolérance au froid dans cette variété qui est la plus cultivée au Sénégal.

Il est envisageable d'augmenter le nombre de marqueurs SSRs flanquant des régions de QTLs de la tolérance au froid utilisés dans cette étude pour la sélection assistée par marqueurs. Afin de détecter avec précision les descendants avec introgression de la population Sahel108/Silewah. Par ailleurs selon les travaux de Mori *et al.* (2011) des marqueurs SSRs ont été colocalisés dans des zones plus proches des QTLs.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abe N., Kotaka S., Toriyama k. and Kobayashi M. (1989). Development of the “Rice Norin-PL8” with high tolerance to cool temperature at the booting stage. Res. Bull. Hokkaido. Agric. Exp. Stn. **152**: 9-17.

Centre du riz pour l’Afrique (Africa Rice) Rapport annuel (2009). Cotonou, Bénin. Pp. 72.

Akhtar S., Bhat M. A., Wani S. A., Bhat K. A., Chalkoo S., Mir M.R. and Wani S. A. (2010). Marker assisted selection in rice. Journal of phytology. **2 (10)**: 66-81.

Andaya V. C. and Mackill D. J. (2003). QTLs conferring cold tolerance at the booting stage of rice using recombinant inbred lines from a *japonica* × *indica* cross. Theor. Appl. Genet. **106**: 1084-1090.

Berloo R. V. GGT graphical genotyping software manual 2007 edition, Laboratory of plant breeding Wageningen University the Netherlands.

Collard B. and Mackill D. (2006). Marker assisted breeding for rice improvement. Based on an invited review paper submitted to Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B. 8 pages.

Courtois B. (2007). Une brève histoire du riz et de son amélioration génétique. Cirad, France, 13 pages.

Cui S., Huang S., Wang J., Ma X., Cheng Y. and Liu J. (2005). A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. Proteomics. **5**: 3162-3172.

Hamada H., Petrino M. G., Kakunaga T. (1982). A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **79**: 6465-6469.

Hashimoto M. and Komatsu S. (2007). Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress. Proteomics. **7**: 1293-1302.

International Rice Research Institute. (1978). IRRI annual report for 1977, International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines, pp. 142.

Jena K. K., Kim S. M., Suh J. P. and Kim Y. G. (2010). Development of cold-tolerant breeding lines using QTL analysis in rice. Second Africa Rice Congress, Bamako, Mali, 22–26 March 2010: Innovation and Partnerships to Realize Africa’s Rice Potential. 9 pages.

Jena K. K., Kim S. M., Suh J. P., Yang C. I. and Kim Y. G. (2011). Identification of Cold-Tolerant Breeding Lines by Quantitative Trait Loci Associated With Cold Tolerance in Rice. *Crop. Sci.* **51**: 1-7.

Korzun V. (2002). Molecular markers and their applications in cereals breeding. Session I: MAS in plant. Pp. 18-22.

Lacharme M. (2001). La mise en place des cultures. "Mémento Technique de Riziculture". 22 pages.

Ly I. (2009). Problématique de la commercialisation du riz de la Vallée du Fleuve Sénégal : pistes de solutions durables? Rapport de la région Saint Louis. 43 pages.

Mackill D. J. and Lei X. (1997). Genetic variation for traits related to temperate adaptation of rice cultivars. *Crop. Science* **37**: 1340-1346.

Manneh B., Stam P., Struik P. C., Oliver S. B. and Eeuwijk F. A. (2007). QTL-based analysis of genotype-by-environment interaction for grain yield of rice in stress and non-stress environments. *Euphytica*. **156**: 213-226.

Mori M., Onishi K., Tokizono Y., Shinada H., Yoshimura T., Numao Y., Miura H., Sato T. (2011). Detection of a novel quantitative trait locus for cold tolerance at the booting stage derived from a tropical japonica rice variety Silewah. *Breeding Sciences*. **61**: 61-68.

Murray H. G. and Thompson W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids. Res.* **8**:4321-4325.

Poulsen G. B., Kahl G., Weising K. (1993). Abundance and polymorphism of simple repetitive DNA sequence in *Brassica napus* L. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 994-1000.

Raghuvanshi S., Kapoor M., Tyagi S., Kapoor S., Khurana P., Khurana J., Tyagi A. (2010). Rice genomics moves ahead. *Mol. Breeding*. **26**: 257-273.

Saito K., Hayano-Saito Y., Maruyama-Funatsuki W., Sato Y., Kato A. (2004). Physical mapping and putative candidate gene identification of a quantitative trait locus Ctb1 for cold tolerance at the booting stage of rice. *Theor. Appl. Genet.* **109**: 515-522.

Saito K., Miura K., Hayano-Saito Y. and Kato A. (2003). Analysis of Quantitative Trait Loci for Cold Tolerance at the Booting Stage of Rice. *Jarq.* **37** (1): 1-5.

Saito K., Miura K., Nagano K., Hayano-Saito Y., Araki H., Kato H. (2001). Identification of two closely linked quantitative trait loci for cold tolerance on chromosome 4 of rice and their association with anther length. *Theor. Appl. Genet.* **103**: 862-868.

Saito K., Miura K., Nagano K., Hayano-Saito Y., Saito A., Araki H., Kato A. (1995). Chromosomal location of quantitative trait loci for cool tolerance at the booting stage in rice variety 'Norin-PL8'. *Breed. Sci.* **45**: 337-340.

Satake T. (1976) Sterility-type cools injury in paddy rice plants. In: International Rice Research Institute (eds.) *Climate and Rice*. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines, pp. 281-298.

Satake T. and Toriyama K. (1979). Two extremely cool tolerant varieties. *Int. Rice Res. Newsl.* **4** (2): 9-10.

Suh J. P., Jeung J. U., Lee J. I., Choi Y. H., Yea J.D., Virk P. S., Mackill D. J. and Jena K.K. (2010). Identification and analysis of QTLs controlling cold tolerance at the reproductive stage and validation of effective QTLs in cold tolerant genotypes of rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **120**(5): 985-995.

Somado E. A., Guei R. G. and Keya S. O. (2008). *Nerica: the New Rice for Africa a Compendium*. Pp. 195.

Traoré K. (2012). *Reconnaissance du riz : morphologie et physiologie du riz*. AfricaRice, Saint Louis. 62 pages.

Tanksley S. D. (1983). Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**: 3-8.

Welz H. G. and Geiger H. H. (1999). Principles of marker-assisted selection. A training manual for a seminar held at IITA, Ibadan, Nigeria, from 16-17 August 1999. 7 pages.

Yoshimura T., Shinada H. and Sato T. (2006). Paddy rice lines Joukei-04501 and Joukei 04502, possessing extremely cool temperature tolerance at the booting stage. *Res. Bull. Rep. Hokkaido Pref. Agr. Exp. Stn.* **90**: 77-81.

ANNEXE1

Liste des marqueurs SSRs utilisés pour l'analyse de la diversité génétique

SSRs MARKERS SELECTED FOR COLD MATERIAL ANALYSIS								
N°	CHROM1	Distance	N°	CHROM2	distance	N°	CHROM3	distance
1	RM220	22,6	12	RM485	0	24	RM523	5,5
2	RM259	38,8	13	RM211	14,4	25	RM231	11,5
3	RM579	43,5	14	RM423	28,7	26	RM545	35,3
4	RM250	54,2	15	RM555	34,7	27	RM251	79,1
5	RM295	73,1	16	RM521	60	28	RM563	89
6	RM306	96,6	17	RM290	66	29	RM347	134,1
7	RM488	102,3	18	RM341	82,7	30	RM416	140,1
8	RM246	115,2	19	RM526	110,6	31	RM203	158,6
9	RM443	112,7	20	RM525	118,1	32	RM293	193,4
10	RM297	130,1	21	RM263	127,5	33	RM586	215,5
11	RM265	155,9	22	RM318	141	34	RM442	224,2
			23	RM406	188			

N°	CHROM4	distance	N°	CHROM5	distance	N°	CHROM6	distance
35	RM537	3,1	50	RM413	26,7	61	RM225	13,5
36	RM401	8,5	51	RM267	31,6	62	RM510	20,8
37	RM551	18	52	RM574	41	63	RM253	37
38	RM261	35,4	53	RM169	48,3	64	RM538	45
39	RM185	41,5	54	RM289	56,7	65	RM5141	75,3
40	RM417	56,2	55	RM509	60,7	66	RM454	99
41	RM142	68,5	56	RM249	65	67	RM340	113,1
42	RM119	76,1	57	RM430	78,7	68	RM528	121,6
43	RM470	87,1	58	RM440	92,7	69	RM30	125,4
44	RM252	99	59	RM274	126,6	70	RM400	134,5
45	RM241	106,2	60	RM334	141,8	71	RM412	139,9
46	RM303	116,9				72	RM345	145,2
47	RM348	137,9						
48	RM349	146,8						
49	RM280	152,3						

ANNEXE1 (suite)

N°	CHROM7	distance	N°	CHROM8	distance	N°	CHROM9	distance
73	RM436	11	84	RM506	0	96	RM444	3,3
74	RM500	36,1	85	RM407	5,7	97	RM219	11,7
75	RM418	42,1	86	RM52	24,8	98	RM296	20,4
76	RM560	54,2	87	RM547	42,9	99	RM105	32,1
77	RM336	61	88	RM25	52,2	100	RM524	42,5
78	RM351	73,31	89	RM310	57	101	RM566	50,7
79	RM505	78,6	90	RM339	72,2	102	RM434	57,7
80	RM351	83,3	91	RM284	83,7	103	RM410	64,4
81	RM234	88,2	92	RM556	90,3	104	RM160	82,4
82	RM429	96,9	93	RM419	95,2	105	RM215	99,4
83	RM420	115,3	94	RM256	101,5	106	RM245	112,3
			95	RM264	128,6			

N°	CHROM10	distance	N°	CHROM11	distance	N°	CHROM11	distance
107	RM330A	2,4	117	RM558B	8	131	RM20A	3,2
108	RM222	11,2	118	RM332	27,9	132	RM19	20,9
109	RM216	17,6	119	RM441	32,1	133	RM453	28,2
110	RM311	25,2	120	RM479	50,8	134	RM491	34,3
111	RM271	59,4	121	RM536	55,1	135	RM512	43,2
112	RM269	69,6	122	RM260	61,7	136	RM101	49,5
113	RM304	73	123	RM287	68,6	137	RM277	57,2
114	RM228	93	124	RM209	73,9	138	RM313	65,5
115	RM333	110,4	125	RM229	77,4	139	RM309	74,5
116	RM591	118,3	126	RM457	83	140	RM270	91,3
			127	RM473E	95,6	141	RM17	109,1
			128	RM206	102,9			
			129	RM254	110			
			130	RM456C	117			

ANNEXE 2

Marqueurs SSRs polymorphiques entre Sahel108/Silewah

chrom1		chrom2		chrom3		chrom4	
marqueurs	position	marqueurs	position	marqueurs	position	marqueurs	position
RM220	22,6	RM555	34,7	RM523	5,5	RM551	18
RM259	38,8	RM290	66	RM231	11,5	RM261	35,4
RM250	54,2	RM341	82,7	RM251	79,1	RM241	106,2
RM488	102,3	RM318	151	RM563	89	RM303	116,9
RM246	115,2	RM406	188	RM347	134,1	RM348	137,9
RM443	122,7			RM416	140,1	RM349	146,8
RM297	130,1			RM586	215,5	RM280	152,3
				RM442	224,2		

chrom5		chrom6		chrom7		chrom8	
marqueurs	position	marqueurs	position	marqueurs	position	marqueurs	position
RM413	26,7	RM225	13,5	RM418	42,1	RM506	0
RM289	56,7	RM510	20,8	RM560	54,2	RM52	24,8
RM509	60,7	RM253	37	RM336	61	RM25	52,2
RM249	65	RM538	45,1	RM505	78,6	RM310	57
RM440	92,7	RM541	75,3	RM234	88,2	RM339	72,2
RM274	126,6	RM340	113,1	RM429	96,9	RM556	90,3
RM334	141,8	RM400	134,5	RM420	115,3	RM264	128,6
		RM345	145,2				

chrom9		chrom10		chrom11		chrom12	
marqueurs	position	marqueurs	position	marqueurs	position	marqueurs	position
RM444	3,3	RM330A	2,4	RM332	27,9	RM491	34,3
RM296	20,4	RM222	11,2	RM536	55,1	RM101	49,5
RM524	42,5	RM311	25,2	RM287	68,6	RM277	57,2
RM566	50,7	RM304	73	RM209	73,9	R%313	65,5
RM434	57,7	RM591	118,3	RM229	77,4	RM17	109,1
RM410	64,4			RM473E	95,6		
RM215	99,4						
RM245	112,3						
RM219	11,7						

ANNEXE 3

Marqueurs SSRs polymorphiques entre NERICA-L19/Silewah

chrom1		chrom2		chrom3		chrom4	
marqueurs	position	marqueurs	position	marqueurs	position	marqueurs	position
RM220	22,6	RM555	34,7	RM523	5,5	RM551	18
RM259	38,8	RM211	14,4	RM231	11,5	RM261	35,4
RM250	54,2	RM290	66	RM251	79,1	RM417	56,2
RM488	102,3	RM341	82,7	RM563	89	RM252	99
RM246	115,2	RM318	151	RM347	134,1	RM241	106,2
RM443	122,7	RM406	188	RM416	140,1	RM303	116,9
RM297	130,1			RM586	215,5	RM348	137,9
				RM442	224,2	RM280	152,3

chrom5		chrom6		chrom7		chrom8	
marqueurs	position	marqueurs	position	marqueurs	position	marqueurs	position
RM413	26,7			RM436	11	RM506	0
RM289	56,7	RM510	20,8	RM560	54,2	RM52	24,8
RM509	60,7	RM253	37	RM336	61	RM25	52,2
RM249	65			RM505	78,6	RM310	57
RM430	92,7	RM541	75,3	RM234	88,2	RM339	72,2
RM274	126,6	RM340	113,1	RM429	96,9	RM284	83,7
RM334	141,8	RM400	134,5	RM420	115,3	RM556	90,3
		RM345	145,2			RM264	128,6

chrom9		chrom10		chrom11		chrom12	
marqueurs	position	marqueurs	position	marqueurs	position	marqueurs	position
RM444	3,3	RM330A	2,4	RM332	27,9	RM491	34,3
RM219	11,7	RM222	11,2	RM536	55,1	RM101	49,5
RM524	42,5	RM271	59,4	RM287	68,6	RM277	57,2
RM566	50,7	RM304	73	RM209	73,9	RM313	65,5
RM434	57,7	RM591	118,3	RM229	77,4	RM270	91,3
RM410	64,4			RM473E	95,6	RM17	109,1
RM215	99,4						
RM245	112,3						

ANNEXE 4

Marqueurs microsatellites polymorphiques utilisé pour la sélection de fond génétique.

Chrom1	position	Chrom2	position	Chrom3	Position	Chrom4	position	Chrom5	position	Chrom6	position
RM220	22,6	RM341	82,7	RM523	5,5	RM348	137,9	RM289	56,7	RM541	75,3
RM246	115,2	RM318	151	RM416	140,1	RM280	152,3	RM334	141,8	RM345	145,2

Chrom7	position	Chrom8	position	Chrom9	Position	Chrom10	position	Chrom11	position	Chrom12	position
RM336	61	RM506	0	RM434	57,7	RM330A	8	RM287	68,6	RM453	28,2
RM234	88,2	RM264	128,6	RM215	99,4	RM304	73	RM209	73,9	RM270	91,3
RM429	96,9							RM473E	95,6		