

Année du SP : 2008

Projet N° 0800-001 Achevé

Titre : Comparaison des génomes de trois Arécaceae d'importance, coévolution du sorgho et du striga et étude de l'association chez le sorgho

Unité responsable du projet : AGAP (Amélioration génétique et adaptation des Plantes) (CIRAD, INRA, SupAgro)

Porteur de projet : Angélique D'Hont (angelique.dhont(a)cirad.fr)

Pays associés au projet : USA

Unités de recherche du réseau scientifique d'Agropolis Fondation associés : DIADE, LGDP

Sous-axes thématiques : BIP-1 : Génétique et génomique, amélioration des plantes, écophysiologie

Objectifs, actions menées et résultats obtenus :

1 - Comparaison des génomes de trois Arécaceae: le palmier à huile (*Elaeis guineensis*), le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) et le cocotier (*Cocos nucifera*)

L'objectif du projet est de comparer cinq régions génomiques orthologues chez 3 espèces d'arécacées: le palmier à huile (*Elaeis guineensis*), le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) et le cocotier (*Cocos nucifera*) et également de les comparer avec le riz. Pour cela le Cirad dispose d'une banque de clones BACs pour le palmier à huile et une pour le cocotier et l'équipe de J. Bennetzen possède une banque de fosmidés de Palmier dattier. Le séquençage des clones avait été obtenu sur un appel d'offre Génoscope.

Pour sélectionner les clones BACs, nous avons hybridé les filtres haute-densité contenant les clones BACs de chacune des banques avec des sondes correspondant à différents gènes:

- Le gène ADH (alcool déshydrogénase), ce locus a déjà été largement étudié dans d'autres études comparatives chez les poacées (Ilic et al, 2003 ; Jannoo et al, 2007). Une sonde a été dérivée de la séquence ADH de canne à sucre et des amorces spécifiques ADH1 et ADH2 ont été définies à partir de l'alignement multiple de différentes séquences d'ADH (Brian et al, 1996).

- Les gènes EgDEF1 (MADS-box sous-famille deficiens) et EgGLO2 (MADS-box sous-famille Globosa) ont été sélectionnés car ils ont un intérêt particulier chez le palmier à huile. En effet, ces gènes interviennent dans les mécanismes de variation somaclonale "mantled", qui se traduit par une conversion des pièces florales mâles en pièces femelles ayant un impact sur la production en huile de palme (Adams et al 2007). Des sondes spécifiques ont été dérivées à partir de la séquence des cDNA des gènes EgDEF1 et EgGLO2.

- Les autres régions ont été sélectionnées à partir de l'assemblage partiel (scaffolds) de la séquence du palmier dattier disponible sur le web à l'adresse suivante : <http://qatar-weill.cornell.edu/research/datepalmGenome/download.html>. L'ensemble des scaffolds de palmier dattier ont été annotés automatiquement avec Fgenesh et Eugene. L'annotation automatique a permis d'identifier les scaffolds riches en gènes versus riches en éléments répétés. Deux scaffolds correspondant aux locus PEPC et FBP (phosphoenolpyruvate carboxylase et Fructose-bi-phosphate) ont été sélectionnés car ils correspondent à 2 régions riches en gènes. Des sondes ont été dérivées à partir de la séquence des différents gènes présents sur ces 2 scaffolds et des amorces PCR ont été définies pour les étapes de validation des clones BACs.

L'hybridation de la sonde ADH a permis de révéler 18 BACs palmier à huile et 13 Bacs cocotier. La comparaison des profils finger-print et l'analyse PCR des BACs a permis de distinguer les clones appartenant aux locus ADH1 et ADH2. Les BACs Eg033E10 (ADH1) et Eg060113 (ADH2) de palmier

à huile ont été sélectionnés pour séquençage. L'analyse PCR des BACs cocotier a permis de démontrer que le BAC Cn090M15 contient les deux gènes ADH1 et ADH2. Ce BAC a été sélectionné pour séquençage.

L'hybridation de la sonde correspondant au gène EgDEF1 a permis d'identifier 4 BACs palmier à huile et la sonde EgGLO2 a permis de révéler 2 BACs palmiers à huile. Aucune des 2 sondes n'a révélé de BAC cocotier. Les gènes EgDEF1 et EgGLO2 appartenant à la famille multigénique des MADS-box, les sondes ayant servi au criblage ont été définies de manière très spécifique. Il est fort probable que cette spécificité explique l'absence d'hybridation de clones cocotier. Les BAC Eg133H20 (EgDEF1) et Eg033E06 (EgGLO2) de palmier à huile ont été sélectionnés pour séquençage.

L'hybridation des sondes correspondantes aux différents gènes présents au locus PEPC a permis d'identifier 4 BACs palmier à huile et 5 BACs cocotier. L'analyse PCR et la comparaison des profils finger print des BACs ont permis de sélectionner les BACs Eg132P05 de palmier à huile et Cn227M10 de cocotier pour séquençage.

L'hybridation des sondes correspondantes à la région FBP a permis de révéler 5 BACs palmier à huile et 3 BACs cocotier. L'analyse des BACs a permis de sélectionner les BACs Eg172L05 de palmier à huile et Cn142B10 de cocotier.

Le criblage de la banque de fosmidés palmier dattier a été réalisé à l'université de Georgia (USA) par l'équipe de J. Bennetzen. Huit fosmidés ont été sélectionnés pour séquençage. Pd007D03_D6 et Pd009A12 pour le locus ADH ; Pd005B81_4D2 et Pd005B81_5H2 pour le locus EgGLO2 ; Pd009B12_D2 et Pd009H8_H8 pour le locus FBP ; Pd003C11_1C9 et Pd006A61_G9 pour le locus PEPC.

Nous avons rencontré d'importants problèmes de délais dans le séquençage des BACs par le Génoscope, ce qui a considérablement retardé l'avancée du projet. D'autre part, des problèmes de cross-contamination rencontrés au laboratoire de J. Bennetzen pour 4 fosmidés palmier dattier (Pd007D03_D6, Pd005B81_4D2, Pd005B81_5H2 et Pd003C11_1C9) ont pu être mis en évidence lors du séquençage. La séquence de ces 4 fosmidés c'est avérée être identique.

Au total 6 BACs palmier à huile, 3 BACs cocotier et 8 fosmidés palmier dattier ont finalement été séquencés.

2. co-évolution du sorgho and du striga

J. Bennetzen était intéressé par démarrer un projet pour étudier la coévolution sorgho/millet/striga. Le striga est une plante parasite très préjudiciable en Afrique. Nous lui avons donné nos contacts au Mali pour sa mission de collecte de matériel.

3. Analyse d'association chez le sorgho/millet

K. Devos était intéressée par analyser les gènes impliqués dans la variation de taille chez le sorgho ou le millet par étude d'associations.

Elle était intéressée par l'utilisation des panels de variétés établis pour ce type d'analyse par le Cirad sur le sorgho et par l'IRD sur le millet. Finalement elle a choisi de travailler sur le panel du millet auquel elle a rajouté des variétés des USA. Trois gènes potentiellement impliqués dans la hauteur avaient été préalablement identifiés dans son laboratoire. En premier lieu il s'agissait d'isoler les orthologues chez le millet. Par comparaison entre différentes Graminées des primers ont été définis dans les parties conservées des gènes candidats. Ensuite les amplifications ont été réalisées sur les variétés du panel puis clonées et séquencées. Malheureusement, les produits clonés se sont pour la plupart avérés être des rétro-éléments et donc les résultats d'amplifications non spécifiques.

4. Caractérisation de point de translocations chez le blé

K. Devos a travaillé sur les Triticées depuis de nombreuses années et récemment s'est intéressée aux translocations. Son objectif était d'utiliser notre expertise en cytogénétique pour se former aux nouvelles techniques de cytogénétique moléculaire et de les utiliser pour l'analyse des translocations chez le blé.

L'objectif de l'étude était de déterminer la taille physique d'une région comprenant la translocation 4L/5L chez le blé. Ceci constituait un challenge très important vu la taille des sondes dont elle disposait. En comparant avec le riz, quatre marqueurs (deux pour le groupe quatre et deux pour le groupe cinq) entourant le point de translocation avaient été identifiés. Un contig partiel de la région avait indiqué que la région recouvrait probablement quelques centaines de kilobase et était constituée surtout d'éléments répétés.

Pour déterminer la taille physique de la région, l'hybridation in situ a été réalisée avec des marqueurs flanquant le point de recombinaison sur les deux chromosomes 4 et 5. La visualisation des signaux en hybridation in situ nécessite des longueurs de sonde de minimum 2 à 3 kb. Les sondes disponibles étaient de moins de 500 pb. Pour générer des sondes supplémentaires pour les quatre loci, les amorces ont été construits en utilisant les gènes du riz comme modèle. Les fragments amplifiés ont été clonés et séquencés pour confirmer leur identité. Cela a porté la longueur totale de la sonde disponible à 2 à 3,8 kb pour chacun des quatre loci. Une série de procédures d'étiquetage et d'hybridation ont été testés afin d'améliorer la sensibilité avec laquelle les signaux d'hybridation peuvent être détectés. Mais la conclusion était que la longueur de sonde doit encore être augmentée pour être en mesure d'obtenir une hybridation réussie et une détection de deux loci qui encadrent un point d'arrêt.

Perspectives:

1 Comparaison des génomes de trois *Arécaceae* : l'annotation de l'ensemble des séquences palmier à huile, cocotier et palmier dattier est en cours, les comparaisons seront ensuite réalisées entre les trois espèces et avec le riz.

L'ensemble des résultats sera publié en associant les deux équipes de recherche.

Financement total par Agropolis Fondation : € 93,706 (Bench fees, Sequencing, 2 CDD)

Catégorie(s) de soutien : Accueillir un scientifique senior pour un séjour de courte durée (moins de 12 mois)

Durée du projet : 01 mai 2008 - 31 juillet 2010

Mots clés : Etude d'association, *Arécaceae*, coévolution, sorgho, striga