

MEMOIRE

*présenté devant*

**L'UNIVERSITE DENIS DIDEROT – PARIS VII**

*par*

**Elisabeth MORIN**

*pour obtenir*

Le Diplôme d'Etude Supérieure Spécialisée en Productivité Végétale

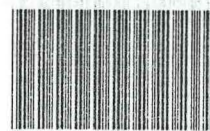
**ETUDE DE LA STABILITE DES LIAISONS MARQUEURS-  
QTL A PARTIR D'UN FACTORIEL 4X4  
*EUCALYPTUS UROPHYLLA* x *EUCALYPTUS GRANDIS***

Travail effectué au Laboratoire de Génétique, Programme Arbres et Plantations,  
CIRAD Forêt. Montpellier.

Responsable de stage : D. Verhaegen

Novembre 1999

**CIRAD-Dist**  
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE  
Baillarguet



\* 000001133 \*

MEMOIRE

*présenté devant*

**L'UNIVERSITE DENIS DIDEROT – PARIS VII**

*par*

**Elisabeth MORIN**

*pour obtenir*

Le Diplôme d'Etude Supérieure Spécialisée en Productivité Végétale

**ETUDE DE LA STABILITE DES LIAISONS MARQUEURS-  
QTL A PARTIR D'UN FACTORIEL 4X4  
*EUCALYPTUS UROPHYLLA* x *EUCALYPTUS GRANDIS***

Travail effectué au Laboratoire de Génétique, Programme Arbres et Plantations,  
CIRAD Forêt. Montpellier.

Responsable de stage : D. Verhaegen

Novembre 1999



## Remerciements

*Ce travail a été réalisé au laboratoire de Génétique, sous la tutelle du Dr. Daniel Verhaegen, au sein du Programme Arbres et Plantations du Cirad-Forêt de Montpellier.*

*Je remercie tout d'abord Daniel Verhaegen pour m'avoir proposé ce sujet de stage. Je le remercie pour ses conseils avisés, sa disponibilité et ses explications, notamment pour toute la partie Cartographie.*

*Je remercie également Philippe Vigneron pour son implication dans ce travail, les discussions et la réflexion qu'il m'a fait partager sur la partie Génétique.*

*Je remercie Marie-Hélène Chevallier pour m'avoir accueillie dans le laboratoire de Génétique.*

*Je remercie aussi tous les membres du laboratoire, qui ont participé à une ambiance vraiment sympathique. Monsieur Monteuis (Mr. Monteuis...), et ses pensées existentielles, sa distinction et ses blagues vaseuses... Mireille, d'une rigueur exemplaire pour tout ce qui relève de la paillasse et d'une gentillesse à toute épreuve. Alex, toujours zen,...Sophie, toujours très sage...*

*Je n'oublie pas Hélène Joly, Philippe Deleporte et les stagiaires qui ont été en stage en même temps que moi (Sylvie, Khady, Frank, Isabelle, Diallo et Mars)...*

*Pour régler tous les petits problèmes de tous les jours, merci aussi à Roselyne et Anne, les secrétaires du Programme.*

*Pour m'avoir facilité l'utilisation de SAS plus d'une fois, je remercie Guillaume Cornu, qui a toujours été disponible quand j'en ai eu besoin.*

*J'ai également une pensée pour Michèle Audinet.*

*Le meilleur pour la fin : merci à Jean-Marc Gion, qui a partagé son bureau avec moi pendant ces huit mois de stage. Pour tous les fou-rires et les durs accrochages que l'on a eus, pour son exemple de charisme et ses nombreuses explications, le souvenir restera fort.*

*Et comme ce rapport marque la fin de mes études, je remercie aussi Papa et Maman de m'avoir soutenue jusqu'ici...*



# SOMMAIRE

Présentation du CIRAD	
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Revue Bibliographique</b>	
I. Les aspects botaniques de l' <i>Eucalyptus</i> .....	2
II. <i>Eucalyptus spp.</i> : des espèces d'importance économique .....	2
1. Les particularités des <i>Eucalyptus spp.</i> en reboisement.....	2
2. Les plantations d' <i>Eucalyptus</i> dans le monde.....	2
III. Les plantations d' <i>Eucalyptus</i> au Congo .....	3
IV. Le schéma de Sélection Récurrente Réciproque (SRR) .....	4
1. Les avantages d'un tel schéma de sélection.....	4
2. Choix de deux espèces pour ce schéma SSR.....	4
3. Démarche de la SSR.....	4
4. Inconvénients généraux de l'amélioration génétique des arbres forestiers.....	5
V. La recherche de QTL et la sélection.....	5
1. Définition du QTL (Quantitative Trait Loci).....	5
2. Cartographie génétique.....	6
3. Détection de QTL.....	7
4. La Sélection Assistée par Marqueur.....	8
<b>Matériels et méthodes</b>	
I. Le matériel végétal.....	9
1. Espèces utilisées et provenances.....	9
2. Extraction de l'ADN total.....	9
II. Le marquage moléculaire par la méthode RAPD.....	9
1. Choix des amorces.....	9
2. Conditions d'amplification et révélation du polymorphisme.....	10
3. Acquisition des données.....	10
III. Analyses préliminaires à l'analyse QTL.....	10
1. Description du dispositif de terrain.....	10
2. Caractères mesurés.....	11
3. Traitement des données agronomiques.....	11
IV. Détection de QTL.....	12
1. L'analyse de variance marqueur par marqueur.....	12
a. Détection de QTL dans l'ensemble du factoriel.....	12
b. Détection de QTL pour chaque géniteur.....	13
2. Interval Mapping.....	13
a. Cartographie génétique.....	13
b. Détection de QTL.....	13
<b>Résultats</b>	
I. Le marquage moléculaire par RAPD.....	15
II. Détection de QTL marqueur par marqueur.....	15
1. Le test de Bartlett.....	15
2. Analyse des effets marqueur dans le plan factoriel (modèle A).....	16
3. Analyse des effets marqueur pour chaque parent (modèle B).....	16
a. Géniteurs <i>E. urophylla</i> .....	16
b. Géniteurs <i>E. grandis</i> .....	17
III. La détection de QTL par « Interval Mapping ».....	18
1. Cartographie génétique.....	18
a. Chez les mères <i>E. urophylla</i> 14-144 et 14-128.....	18
b. Chez les pères <i>E. grandis</i> 9-37, 9-40, 9-41 et 9-42.....	18
2. Détection de QTL par Interval Mapping.....	20
a. Chez la mère 14-144.....	20
b. Chez la mère 14-128.....	21
<b>Discussion</b>	
I. La technique RAPD : des avantages et des inconvénients.....	22
II. La détection de QTL.....	23
1. Comparaison des deux méthodes de détection.....	23
2. La stabilité des QTL.....	24
a. Stabilité des QTL détectés chez un géniteur pour différentes descendance.....	24
b. Stabilité des QTL entre les différents géniteurs d' <i>Eucalyptus</i> .....	24
<b>Conclusion et Perspectives</b> .....	<b>26</b>
Références	
Annexes	



## PRESENTATION DU CIRAD

Le **CIRAD** (Centre de Coopération International de Recherche en Agronomie et de Développement) est un organisme français, spécialisé en recherche agronomique. Il a pour mission de contribuer au développement rural des pays tropicaux et sub-tropicaux par des recherches, des réalisations expérimentales, des actions de formation.

Cette coopération internationale s'exerce avec plus de 90 pays d'Afrique, d'Asie, du Pacifique, d'Amérique latine et d'Europe, et concerne divers domaines. Il existe trois axes : les filières agricoles, le développement régional, les thématiques scientifiques.

Cinq départements composent l'axe filières : cultures pérennes, cultures annuelles, productions horticoles et fruitières, élevage et médecine vétérinaire, et forêts.

Le **département Forêts** élabore des méthodes de création et de restauration des peuplements forestiers. Il tend également à améliorer les procédés de transformation et de valorisation des bois pour optimiser la matière première en fonction des conditions locales. Ceci, avec le souci permanent d'une gestion viable des forêts tropicales.

Il regroupe 100 agents localisés à Montpellier et une soixantaine d'agents expatriés dans les pays du Sud.

Les principaux objectifs de ce département s'agencent en trois programmes :

- le programme Forêts Naturelles pour une gestion durable et intégrée des forêts naturelles,
- le programme Arbres et Plantations pour une pérennisation des ressources procurées par les plantations villageoises et industrielles,
- le programme Bois pour une valorisation et une rationalisation des utilisations des bois tropicaux.

Le **programme Arbres et Plantations** a pour but d'optimiser la production de quelques espèces stratégiques. Au Congo, le choix s'est porté sur l'Eucalyptus...





## INTRODUCTION

L'eucalyptus est un arbre à usages multiples, qui sert principalement à la fourniture de bois d'énergie, mais aussi de bois de trituration, de bois de service, bois de construction, ainsi qu'à l'obtention d'huiles essentielles. Ses propriétés sylvicoles permettent une bonne optimisation des cultures en plantations, et ses particularités biologiques font de cet arbre un bon modèle d'étude pour la recherche sur les espèces forestières.

Dans les années soixante dix, le CIRAD-Forêt a engagé au Congo un programme d'amélioration génétique de l'*Eucalyptus* afin d'obtenir des variétés à forte production. Depuis 1992, des recherches sur l'architecture génétique des caractères quantitatifs de l'*Eucalyptus* sont menées pour mieux comprendre l'organisation et le fonctionnement du génome et, à terme, pour utiliser ces informations moléculaires dans le programme de sélection. Ces études ont abouti à ce jour à la construction des cartes génétiques pour deux parents d'un croisement élite *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, et à la localisation de QTL (Quantitative Trait Loci) pour différents types de caractère agronomiques (vigueur, forme du tronc, et densité du bois).

Les résultats obtenus jusqu'à présent orientent les travaux actuels vers une meilleure compréhension du fonctionnement de ces QTL. En effet, les régions chromosomiques impliquées dans le contrôle d'un caractère sont-elles conservées au cours du développement de l'arbre? Existe-t-il toujours un effet de ces régions chromosomiques dans différentes provenances d'*Eucalyptus*?

L'objectif de mon travail a donc été d'étudier les liaisons marqueur-QTL mises en évidence dans un croisement élite, avec l'espoir de les remettre en évidence à partir d'autres croisements. Cette étude s'est basée sur les descendances d'un plan factoriel de quatre géniteurs *E. urophylla* et quatre géniteurs *E. grandis*, et a consisté en une détection de QTL par deux méthodes (analyse de variance et Interval Mapping). Une reconstruction partielle des cartes jalons a également été réalisée à l'aide de marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA).

Afin de resituer cette étude dans un contexte plus large, une description du genre *Eucalyptus* et du dispositif d'étude du CIRAD fera l'objet d'une première partie bibliographique et exposera les résultats et les recherches en cours, concernant le programme d'amélioration des *Eucalyptus* au Congo et les nouveaux enjeux. Je m'attacherai dans le reste du rapport à exposer les résultats de l'étude.



## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### I. Les aspects botaniques de l'*Eucalyptus*

L'*Eucalyptus* est un arbre angiosperme. Il appartient à la famille des Myrtacées. Plus de 700 espèces sont décrites (Williams *et al.*, 1997). Son aire géographique naturelle est l'Australie. Quelques espèces sont endémiques aux îles de la Sonde et à la Papouasie Nouvelle Guinée. L'évolution de ce genre ayant suivi celle du continent, qui fût longue et marquée par divers changements tectoniques et climatiques, les espèces ont pour la plupart des gènes d'adaptation assez remarquables, qui leur permettent de pousser dans des conditions pédoclimatiques très diverses (Eldridge *et al.*, 1993).

Morphologiquement, la plupart des espèces sont des arbres à feuillage persistant. Les feuilles sont pendantes, alternes, pétiolées-lancéolées. La taille des arbres peut atteindre plus d'une centaine de mètres.

Le régime de reproduction est préférentiellement allogame, comme chez la plupart des arbres forestiers, favorisé par des mécanismes d'auto-incompatibilité ou de protandrie des fleurs hermaphrodites, ce qui rend les populations assez hétérogènes, du fait de l'important brassage génétique (Pryor, 1976). Les espèces d'*Eucalyptus* ont un petit génome de 11 chromosomes ( $2n=22$ ). Pourvue de surcroît de bonnes capacités à la propagation végétative et à la fois culture *in vitro* (Teulières *et al.*, 1994), cette essence constitue un bon candidat modèle pour les recherches sur la génomique des arbres forestiers.

### II. *Eucalyptus spp.*: des espèces d'importance économique

#### 1. Les particularités des *Eucalyptus spp.* en reboisement

Les espèces d'*Eucalyptus* possèdent des propriétés sylvicoles intéressantes en plantations. Leur forte croissance dans le jeune âge permet une exploitation rapide du bois. *E. urophylla* et *E. pellita*, par exemple, ont une bonne croissance et leur âge d'exploitation au Congo se situe vers la septième année. A titre de comparaison, chez le Pin maritime, il faut attendre plus d'une trentaine d'années, 10 à 20 ans chez le peuplier, 65 ans chez le Merisier (Gallais, 1989). Les volumes de bois moyens obtenus sont nettement supérieurs à ceux obtenus pour le Pin ou le Peuplier aux mêmes âges : 10 à 15 m<sup>3</sup>/ha/an pour le Pin, 12 à 16 m<sup>3</sup>/ha/an pour le Peuplier et 15 à 20 m<sup>3</sup>/ha/an pour l'*Eucalyptus*. Par ailleurs, l'*Eucalyptus* présente une bonne aptitude au bouturage herbacé. Cette propriété permet de propager sous forme de clones les meilleurs individus. Enfin, la possibilité de conduite en taillis représente également un avantage pour la foresterie, notamment rurale. Une souche de 50 ans coupée une dizaine de fois continue à produire de façon convenable (Andrianirina *et al.*, 1991). Ces différentes caractéristiques justifient le choix de l'*Eucalyptus* dans différentes procédures de reboisement.

#### 2. Les plantations d'*Eucalyptus* dans le monde

Au cours de ces 20 dernières années, l'*Eucalyptus* a été le genre forestier le plus utilisé en

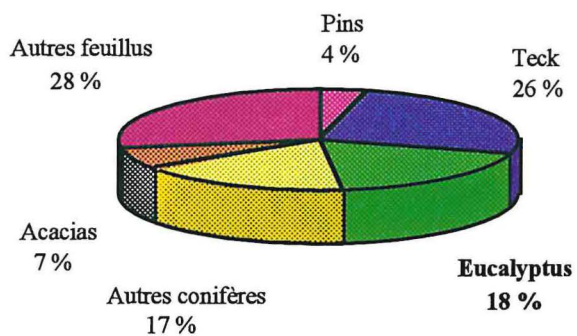


Figure 1: Proportion des surfaces plantées en eucalyptus, en zone tropicale par rapport aux autres feuillus et conifères (Pandey, 1997).

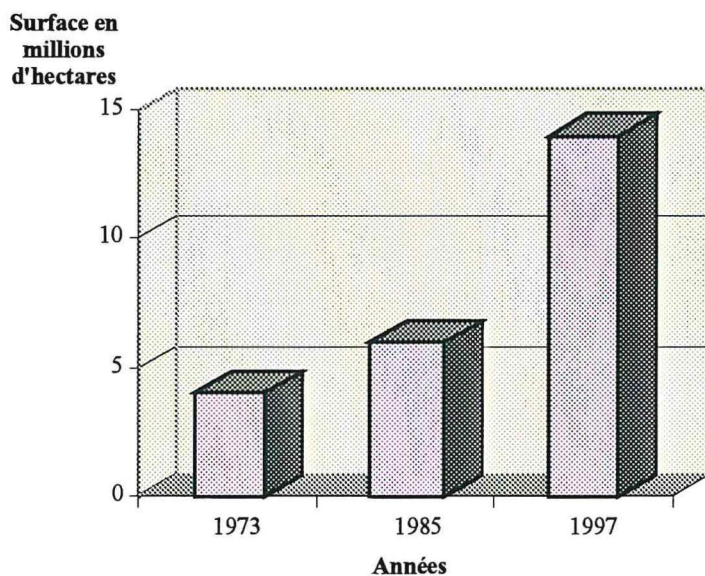


Figure 2 : Evolution des plantations d'eucalyptus des zones tropicales, sub-tropicales et tempérées pour les années 1973, 1985 et 1997 (Bouvet, 1998).

reboisement, dans les zones tropicales, sub-tropicales et certaines zones tempérées, que ce soit en reboisement rural ou intensif, à vocation industriel (cf. figure 1).

Le choix d'une espèce forestière pour le reboisement ne dépend pas uniquement des propriétés biologiques et sylvicoles de l'espèce, mais également du contexte politico-économique.

L'évolution des surfaces entre 1973 et 1997 montre un accroissement notable des plantations d'*Eucalyptus* (cf. figure 2), dû principalement aux plantations d'Amérique du Sud et d'Asie. Cet essor, facilité par des mesures politiques, est intimement lié à l'évolution de la consommation mondiale de bois, qui a considérablement augmenté entre 1970 et 1994. D'une part, l'augmentation de la population et celle des revenus moyens a fait évoluer l'utilisation du bois, servant comme principale source d'énergie domestique. D'autre part, les industries papetières ont accru la demande en bois de trituration. Enfin, la demande en bois de construction a augmenté (Bouvet, 1998).

Pour toutes ces raisons, l'*Eucalyptus* s'est avéré être un genre très intéressant car, outre sa croissance rapide, il fournit des produits homogènes et calibrés pour les industries papetières, et possède une forme et une résistance valorisée pour la fabrication de poteaux et de charpentes.

A présent, ce sont environ 15 millions d'hectares, qui sont consacrés à la culture de l'*Eucalyptus* (Vignerot et Bouvet, 1997). Le potentiel de production mondiale se situe aux alentours de 150 millions de mètres cube de bois par an et représente 0.2% de la masse monétaire mondiale échangée (0.3% pour le palmier à huile).

### **III. Les plantations d'Eucalyptus au Congo**

Dans les années 1955, plusieurs espèces d'*Eucalyptus* originaires d'Australie et des Îles de la Sonde ont été introduites au Congo, sous l'impulsion du Centre Techniques des Forêts Tropicales (CTFT, ancien CIRAD-Forêt) et des politiques locales. Cette introduction d'espèces avait pour objectif la comparaison de leurs performances afin de repérer les meilleures espèces pour la production de bois. Certaines espèces introduites se sont montrées assez bien adaptées à la côte congolaise, bien que celle-ci ait un sol pauvre (sol sableux) et reçoive des précipitations irrégulières. Une des premières constatations fût l'apparition d'hybrides interspécifiques naturels, dont les capacités productrices étaient supérieures à celles des espèces introduites.

Une première étape du programme d'amélioration a donc consisté en la multiplication de ces hybrides très productifs par multiplication végétative. La technique de bouturage herbacé développée à partir des rejets de souches d'*Eucalyptus spp.* dans les années soixante-dix (Martin et Quillet, 1974) a permis d'aboutir à des plantations de clones, dans lesquelles des gains génétiques élevés ont pu être obtenus (Bouvet, 1998).

Ensuite, entre 1978 et 1982, la maîtrise du processus de pollinisation contrôlée a rendu possible la création et la plantation de certains de ces hybrides.

Aujourd'hui, les plantations congolaises couvrent une surface de 46000 ha et produisent 500 000 m<sup>3</sup>/an, dont la majeure partie est exportée vers les usines de pâte à papier de l'Europe et de l'Afrique du Nord.

Tableau 1: Comparaisons des performances d'*Eucalyptus urophylla*, d'*E. grandis* et de l'hybride *E. urophylla* x *E. grandis* pour la hauteur totale en mètres, à 4 ans (d'après Vigneron, 1992).

<i>Eucalyptus urophylla</i>	17 m	Meilleure famille demi-frères
<i>E. grandis</i>	15 m	Meilleures provenances
<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	21 m	Famille plein frères issue de parents tout venants

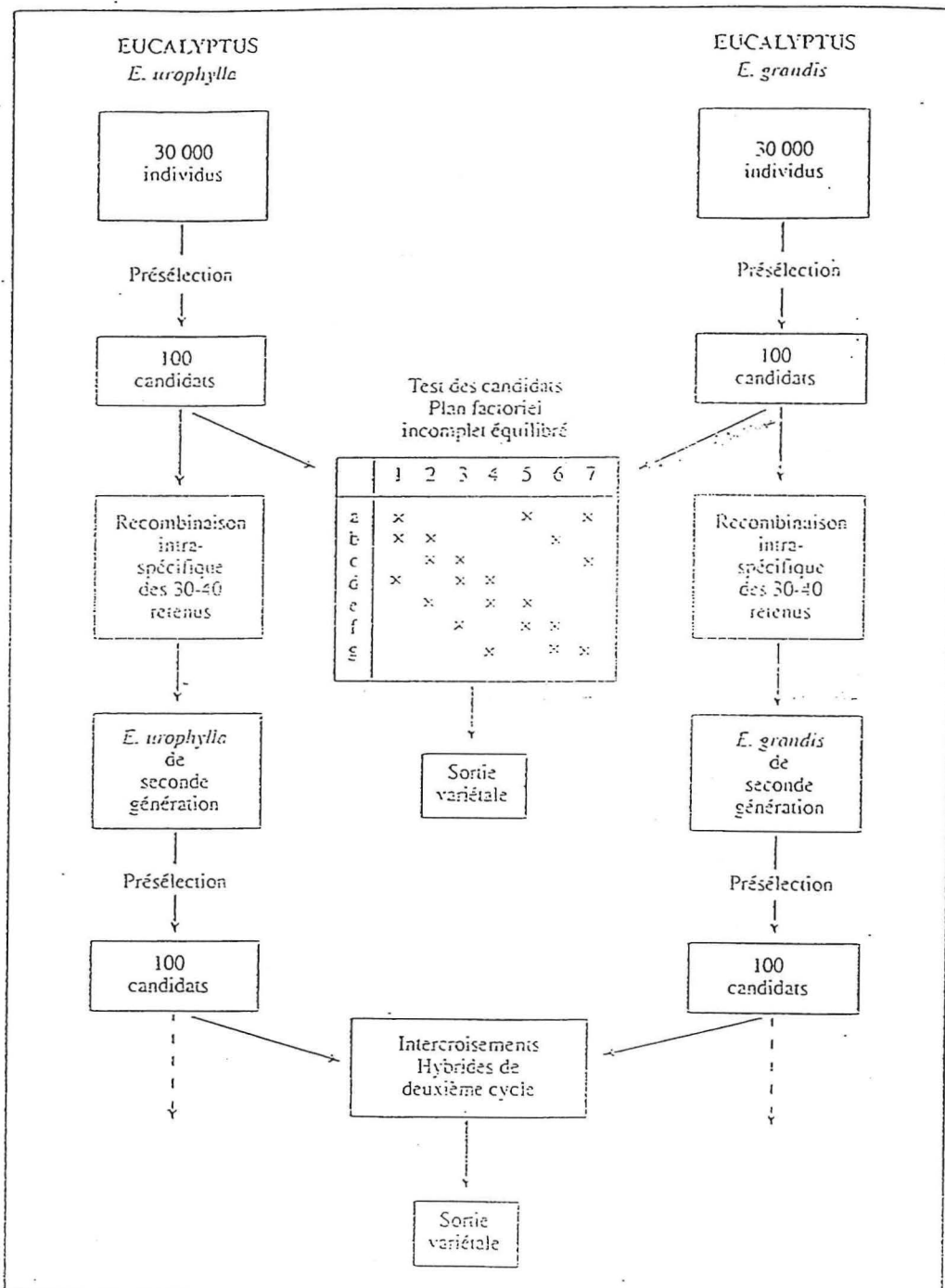


Figure 3 : Sélection Récurrente Réciproque pour *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, schéma général des deux premiers cycles (Vigneron, 1991).

## **IV. Le schéma de Sélection Récurrente Réciproque (SRR)**

### **1. Les avantages d'un tel schéma de sélection**

Afin d'obtenir un matériel végétal capable de dépasser la production de bois atteinte par les hybrides naturels, le CIRAD a mis en place depuis 1989 un schéma de Sélection Récurrente Réciproque de l'*Eucalyptus*.

Selon Gallais (1989), la Sélection Récurrente Réciproque a été conçue pour améliorer la valeur en combinaison de deux populations en vue de la création de variétés hybrides. Chez l'*Eucalyptus*, comme chez de nombreuses espèces allogames, l'hétérosis peut être très fort mais difficilement fixable sous forme de lignées du fait du nombre probablement important de gènes contrôlant les caractères de croissance et du fardeau génétique très lourd (chez le Pin maritime, le coefficient de consanguinité avoisine les 50%, ce qui diminue la croissance de 10 à 20%, d'après Gallais, 1989). La création de variétés hybrides de première génération entre deux populations d'*Eucalyptus* génétiquement éloignées et complémentaires par rapport aux caractères étudiés est apparue comme la meilleure solution pour obtenir un fort hétérosis (Vigneron, 1991).

### **2. Choix de deux espèces pour ce schéma SRR**

La mise au point des techniques de pollinisation contrôlée pour les travaux prospectifs au Congo a permis de mettre en évidence les meilleures formules hybrides : *E. urophylla* x *E. grandis* et *E. urophylla* x *E. pellita* (Vigneron, 1988). La combinaison *E. urophylla* x *E. grandis* a généré une famille élite, dont les performances sont de 25% supérieures à celles des meilleures descendances naturelles sauvages (cf. Tableau 1).

Les caractéristiques de ces deux espèces sont complémentaires et chacune présente une variabilité importante, qui laisse présager de bonnes potentialités d'amélioration à court, moyen et long terme. *E. urophylla* présente une bonne adaptation, une bonne forme et une assez bonne production. *E. grandis* présente une assez bonne forme et une très bonne production potentielle (mal adapté au sol pauvre de Pointe Noire). Ces deux espèces ont donc été retenues pour ce schéma SRR (Vigneron, 1991).

### **3. Démarches de la SRR**

L'amélioration des deux populations parentales est conjointe et orientée vers la création des meilleurs hybrides interspécifiques (cf. figure 3).

Pour chaque population parentale, 100 individus sont sélectionnés. La valeur en croisement de chaque géniteur (Aptitude Générale à la Combinaison, AGC) est évaluée grâce à un plan factoriel incomplet et équilibré. Les meilleurs géniteurs sont sélectionnés sur la base de leur AGC pour un premier cycle de recombinaison intra-spécifique afin d'améliorer la valeur moyenne des populations parents. Parmi les familles d'hybrides interspécifiques, les meilleurs individus sont sélectionnés pour un test clonal en vue d'une sortie variétale.

De nouveau, 100 individus sont choisis dans chaque population de seconde génération et sont croisés selon un plan factoriel. Parmi les hybrides de seconde génération, certains donneront lieu à une sortie variétale sous forme de famille d'hybrides interspécifiques, de





mélange de clones ou de clones purs. Le schéma de SRR permet une sortie variétale à chaque cycle, ce qui rentabilise cette procédure mais il n'en demeure pas moins un processus long et coûteux.

#### **4. Inconvénients généraux de l'amélioration génétique des arbres forestiers**

Les programmes d'amélioration des arbres forestiers se heurtent principalement à deux contraintes, inhérentes à leurs particularités biologiques. Premièrement, la pérennité des cycles chez les arbres forestiers engendre une évaluation tardive des caractères de croissance, vers 3 à 4 ans chez l'*Eucalyptus* (Bouvet, 1991), 10 à 15 ans chez le Pin Maritime (Danjon, 1994) et 6 à 8 ans chez le Pin *taeda* (Mc Keand, 1988). Ceci a pour conséquence un allongement des cycles de sélection.

Deuxièmement, l'héritabilité *sensus stricto* des caractères d'intérêt est en général faible à moyenne (Kremer, 1994), variant de 0,1 à 0,4, ce qui dénote une forte influence du milieu sur l'expression des ces caractères.

Pour optimiser chaque cycle, une meilleure connaissance du génome et de son organisation est nécessaire.

### **V. La recherche de QTL et la Sélection**

#### **1. Définition du QTL (Quantitative Trait Loci)**

Les caractères économiquement importants en sélection chez les espèces forestières sont en général des caractères quantitatifs, présentant une distribution continue dans les populations. Ceci implique que les caractères sont sous la dépendance d'un grand nombre de gènes (caractères multigéniques) et de facteurs environnementaux. C'est le cas pour les caractères de hauteur, de circonférence et de densité de bois.

La modélisation mathématique de la transmission génétique de caractères quantitatifs s'est développée à travers la théorie de la génétique quantitative. Elle vise à caractériser de façon globale les effets des facteurs génétiques impliqués dans l'expression des caractères complexes grâce à des modèles biométriques efficaces.

Cependant, un certain nombre d'informations reste inaccessible au sélectionneur : nombre de gènes intervenant dans l'expression du caractère, la localisation des gènes sur les chromosomes, l'effet et la contribution relative des différents facteurs sur la variation du caractère (Charcosset, 1996). La détection et la localisation des zones chromosomiques expliquant une partie de la variation du caractère quantitatif devraient aboutir à une meilleure connaissance du génome et de son fonctionnement et ainsi de mieux comprendre et maîtriser certains phénomènes de sélection comme l'hétérosis.

Les premières études mettant en évidence l'existence de locus contrôlant des caractères complexes ont été réalisées à l'aide de marqueurs morphologiques comme dans le cas de l'expérience de Sax (1923) qui a montré une liaison physique entre la couleur de la graine de poids (caractère qualitatif) et la masse de la graine (caractère quantitatif). Par la suite des associations entre marqueurs isozymiques et caractères quantitatifs ont été mis en évidence (Edwards *et al.*, 1987). Mais c'est finalement le développement des marqueurs de l'ADN qui a donné une toute autre dimension à l'étude du déterminisme génétique des caractères

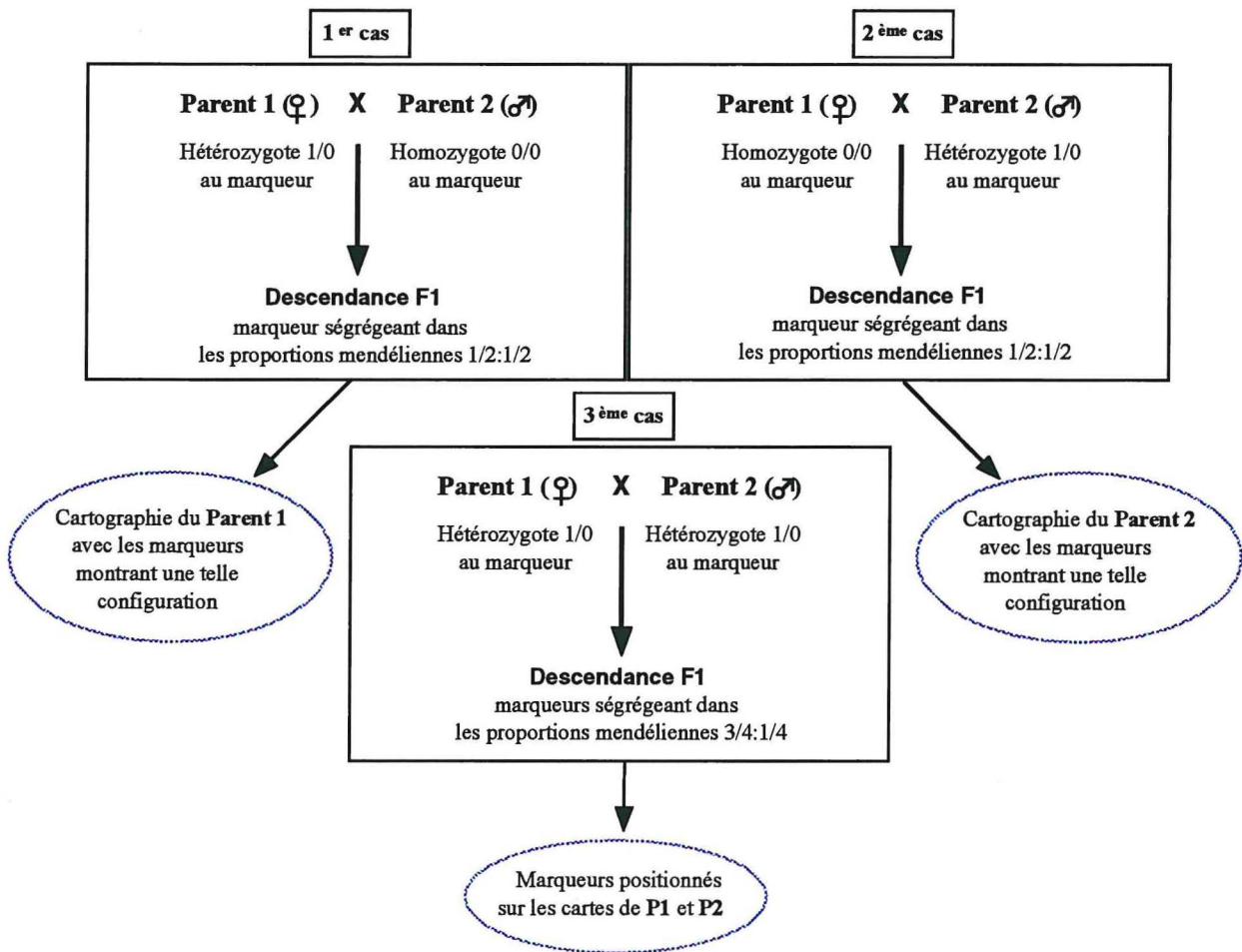


Figure 4: Stratégie de cartographie en “double pseudo-testcross” à l’aide de marqueurs RAPD.

- 0 : allèle caractérisé par l’absence de la bande RAPD
- 1 : allèle caractérisé par la présence de la bande RAPD

complexes. Ils ont permis la recherche systématique des QTL sur la totalité du génome (Paterson *et al.*, 1988 ; Tanksley, 1993).

## **2. Cartographie génétique**

Une étape préliminaire à la détection de QTL est la cartographie du génome à l'aide de marqueurs moléculaires. Elle permet de localiser de façon précise les QTL sur une carte génétique, en vue d'un clonage par exemple.

L'analyse consiste à étudier la transmission de marqueurs moléculaires des parents à la descendance, sachant que les marqueurs transmis ensemble sont liés. La distance entre marqueurs liés est exprimée en centimorgans, unité qui traduit les fréquences de recombinaisons survenues à la méiose. Des outils statistiques et des méthodes de calculs permettent d'estimer les distances entre marqueurs d'un même groupe de liaison, puis de les ordonner à l'intérieur de chaque groupe de liaison. Une carte génétique est dite saturée lorsque le nombre de marqueurs est suffisant pour obtenir un nombre de groupe de liaison égal au nombre de chromosomes.

Les croisements à partir desquels sont générées les descendances en ségrégation sont de nature particulière chez les arbres forestiers. Compte tenu de la longueur de leur cycle, il peut s'agir de population issue de fécondation libre : chez le Pin Maritime, une carte génétique partielle a été réalisée par marqueurs protéiques à partir d'une descendance « open » (Barhman *et al.*, 1989). Il peut également s'agir d'hybrides simples interspécifiques, comme chez le Peuplier par exemple, où une carte partielle par marqueur RFLP (Restriction Fragments Length Polymorphism) et RAPD a été construite (Bradshaw *et al.*, 1994).

Obtenir une descendance en ségrégation à partir de marqueurs dominants, tels que les RAPD, relève d'une stratégie du « double pseudo-testcross », représentée sur la figure 4 (Grattapaglia et Sederoff, 1994, Verhaegen et Plomion., 1996). Chez l'*Eucalyptus*, les cartes génétiques de *E. urophylla* et *E. grandis* ont été ébauchées par Grattapaglia et Sederoff (1994), à partir d'une descendance F1 et en utilisant des marqueurs RAPD. Des cartes génétiques saturées ont été obtenues par Verhaegen et Plomion (1996). Elles sont jalonnées par 269 et 236, respectivement pour *E. urophylla* et *E. grandis*, répartis sur 11 groupes de liaison et couvrent au total 1331 et 1415 cM. La densité moyenne de ces marqueurs est de 14 cM. Des marqueurs RFLP ont aussi été utilisés pour la construction de cartes génétiques chez l'*Eucalyptus* (Byrne *et al.*, 1995). Plus récemment différents travaux révèlent la construction de cartes génétiques pour d'autres espèces d'*Eucalyptus* avec d'autres types de marqueurs comme les AFLP (Marques *et al.*, 1998), SSRs (Brondani *et al.*, 1998)

Il faut noter que la notion de distance génétique sur les cartes obtenues est toute relative, dans la mesure où l'estimation de la distance est fonction des recombinaisons. Les distances génétiques évaluées pour des régions réduites et recombinant fortement sont largement surestimées, il n'y a donc pas de correspondance entre la carte physique et la carte



génétique d'une espèce (Plomion, 1995).

### **3. Détection de QTL**

La mise en évidence des QTL repose sur l'étude de la relation entre le polymorphisme observé au niveau de locus marqueurs (ségrégation des marqueurs) et la variation du caractère étudié (distribution du caractère) (Charcosset, 1996).

Différentes méthodes permettent de mettre en évidence ces liaisons, par analyse de variance (ANOVA), qui procède marqueur par marqueur ou par la fonction du maximum de vraisemblance (Interval Mapping) plus précise car elle tient compte du pourcentage de recombinaison entre marqueurs. Chaque fois qu'une liaison statistique est trouvée entre un marqueur et un caractère, on conclura qu'un QTL ségrège au voisinage du marqueur considéré (Lander et Botstein, 1989). Il y a d'autant moins de recombinaison entre un marqueur et un QTL qu'ils sont proches sur le génome (Gelderman, 1975).

Le déséquilibre de liaison (transmission non au hasard de deux *loci*). est très faible dans les populations forestières car leur régime de reproduction allogame provoque un brassage génétique important. Les descendances utilisées pour la réalisation de cartes génétiques et la détection de QTL sont, dans ce cas, des descendances de pleins frères ou de demi-frères interspécifiques, issues de pollinisation contrôlée. Elles sont capables de générer un déséquilibre de liaison faible, mais plus important que dans des croisements intraspécifiques. Ce déséquilibre de liaison est la condition *sine qua none* pour détecter des QTL. Les croisements interspécifiques ont pour avantage de fournir des marqueurs facilement hétérozygotes et spécifiques.

Les analyses de QTL sont encore peu développées chez les arbres forestiers. La première étude fût réalisée chez le Pin *taeda* (Groover *et al.*, 1994), où cinq QTL liés à la densité de bois ont été détectés dans une famille d'hybrides. La densité du bois est donc apparu comme un caractère à déterminisme multigénique, où chaque gène contribue à la variation de celui-ci avec une magnitude plus ou moins importante. Un de ces cinq QTL s'est révélé multiallèlique, avec des interactions intra locus.

Bradshaw *et al.* (1995) ont mis en évidence des QTL à partir d'une famille d'hybrides interspécifiques de Peuplier. Ils ont montré que le volume du tronc à 2 ans semblait être contrôlé par deux QTL, qui expliquent environ 30% de la variance phénotypique et 44% de la variance génétique. Ces deux QTL ont été colocalisés avec des QTL liés à la surface foliaire, qui ont non seulement la même position sur le génome, mais également le même mode d'action, ce qui a laissé penser à un effet pléiotropique des deux QTL liés au volume du tronc sur la surface foliaire. Le même type de résultats a été obtenu par Byrne *et al.* (1997) chez *E. nitens*, entre QTL impliqués dans le contrôle de la hauteur et la surface des feuilles.

Des caractères liés à la productivité de l'*Eucalyptus* ont été cartographiés à partir d'une famille "open" obtenue à partir de *E. grandis* (Grattapaglia *et al.*, 1996). Trois QTL potentiellement impliqués dans le contrôle de la croissance en volume ont été détectés,



expliquant 14% de la variation phénotypique et 43.7% de la variation génétique. Cinq QTL ont été identifiés dans le contrôle de la densité de bois, en expliquant 24.7% de la variation phénotypique et 49% de la variation génétique. Des interactions épistatiques ont pu être mises en évidence entre des QTL liés au volume.

Des études de QTL ont également été réalisées pour étudier leur dans le temps. La dissection génétique du caractère de la hauteur chez une famille hybride de Pin maritime a mis en évidence plusieurs QTL à différents stades de développement de l'arbre (Plomion *et al.*, 1996). Il a été montré qu'un premier type de QTL s'exprimerait de façon progressive pendant la croissance des arbres, tandis que le second type de QTL regroupait ceux dont l'expression très forte apparaissait ponctuelle et associée à un stade de développement particulier.

Des QTL de vigueur (hauteur, circonférence) et de densité de bois ont été détectés sur une famille interspécifique *E. urophylla x E. grandis* par Verhaegen *et al.* (1997) à trois âges différents (18, 26 et 38 mois). Ces QTL expliquent entre 5 et 30% de la variation phénotypique. Une étude complémentaire a permis de conclure que certains QTL étaient spécifiques à l'état de juvénilité et que d'autres étaient stables dans le temps et donc indépendants du stade de développement (Gion, communication personnelle), ce qui irait dans le sens des résultats précédents.

#### **4. La Sélection Assistée par Marqueur**

La cartographie génétique et la détection de QTL peuvent être utilisées en sélection. Une stratégie envisageable pour l'utilisation des marqueurs moléculaires chez les arbres forestiers est d'utiliser l'étiquetage marqueur-QTL pour le repérage précoce des individus candidats à la sélection. Cela réduirait l'intervalle de temps nécessaire entre chaque génération et augmenterait le gain génétique à chaque génération (Dale *et al.*, 1996).

Les études QTL réalisées jusqu'à lors sont spécifiques d'un croisement. La stabilité des QTL dans différents fonds génétiques n'a pas été étudiée.



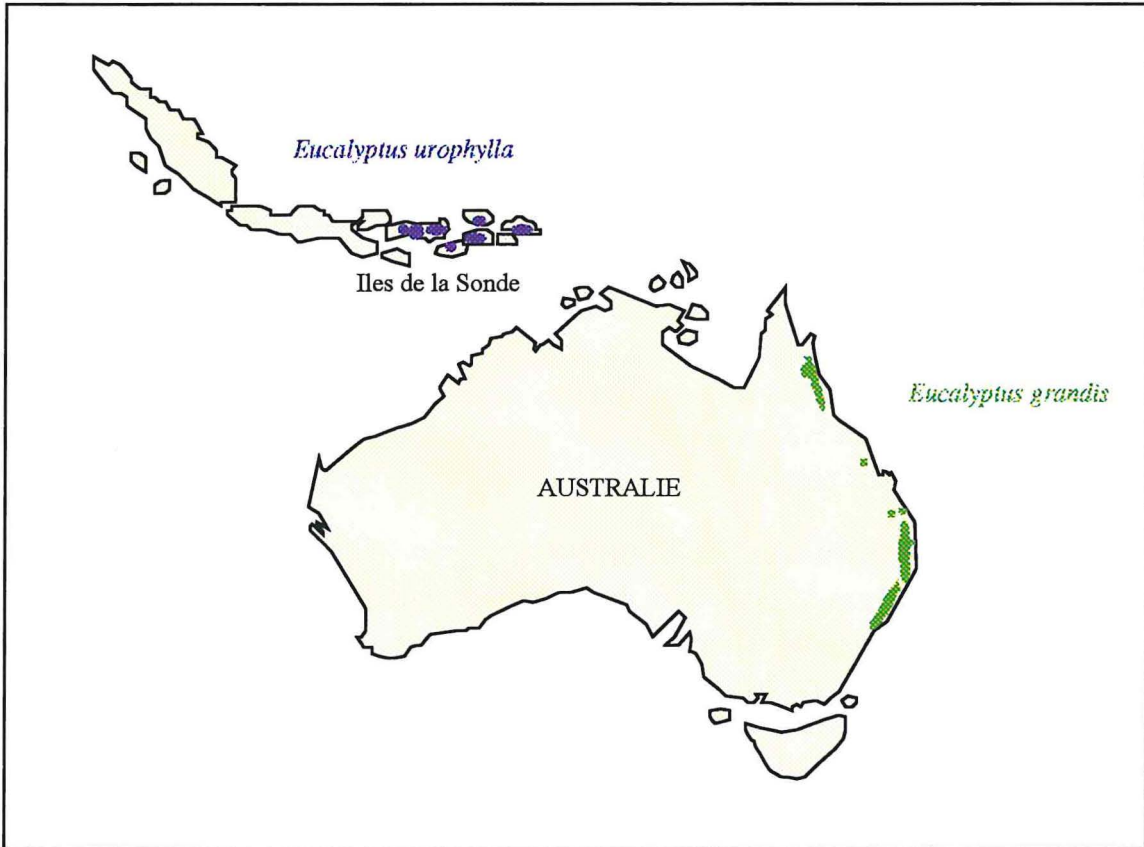


Figure 5 : Aires naturelles d'*Eucalyptus urophylla* et d'*E. grandis*.

## **MATERIELS ET METHODES**

### **I. Le matériel végétal**

#### **1. Espèces utilisées et provenances**

Les descendances interspécifiques de cette étude sont issues du croisement de deux espèces : *Eucalyptus urophylla* et *E. grandis*. Les aires naturelles d'*E. urophylla* et *E. grandis* sont représentées sur la figure 5. Les quatre géniteurs femelles (*E. urophylla*) sont notées par les codes 14-128, 14-133, 14-136 et 14-144. Elles proviennent du Monte Lewotobi pour 14-128, 14-133 et 14-144 et du Monte Egon pour le géniteur 14-136. Les géniteurs mâles (*E. grandis*) sont notés par les codes 9-37, 9-40, 9-41 et 9-42. Ils proviennent respectivement de Tinaroo Falls Down, Heberton SF 194, State Forest 700 et Mount Putt (Australie). Le géniteur *E. grandis* 9-21, père du croisement élite, provenait d'Atherton.

#### **2. Extraction de l'ADN total**

L'ADN d'*Eucalyptus* est extrait à partir des feuilles, prélevées à un stade de maturation particulier. Pour garantir une bonne qualité de l'ADN extrait, celles-ci ne doivent être ni trop jeunes (tendre ou rougeâtre, contenant donc beaucoup de pigments) ni trop âgées (coriaces et chargées en pigments). Les feuilles prélevées sont choisies vertes et tendres, à proximité des feuilles juvéniles. (Verhaegen, 1996). Elles sont séchées à l'air libre, pressées contre du papier buvard.

L'extraction de l'ADN est réalisée à partir du protocole adapté de Doyle and Doyle (1990) (annexe 1). Les tubes d'ADN stock sont dosés avec un fluorimètre (TD 700 Fluorometer). Les solutions d'ADN stock sont diluées à une concentration de 3 ng/ $\mu$ l, et constituent les solutions de travail, conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **II. Le marquage moléculaire par la méthode RAPD**

La technique RAPD est exposée dans l'annexe 2. Elle est basée sur la PCR (Polymerase Chain Reaction) et consiste à l'amplification exponentielle de certaines régions du génome, « ciblée » par des amorces oligonucléotidiques aléatoires.

#### **1. Choix des amorces**

Les amorces aléatoires ont été choisies par rapport aux cartes génétiques d'*E. urophylla* et d'*E. grandis* du croisement élite. Celles qui ont généré des marqueurs liés à des QTL ou proches de QTL ont été sélectionnées.

Tableau 2 : Plan factoriel 4\*4 pour quatre géniteurs *E. urophylla* et 4 géniteurs *E. grandis*.

<i>E. grandis</i>	9-37	9-40	9-41	9-42
<i>E. urophylla</i>				
14-128	37 ****	27 ****	2 ****	3 ****
14-133	75 **	20 ****	64 ***	24 ****
14-136	21 ****	34 ****	38 ****	36 ****
14-144	45 ****	1 ****	42 ****	16 ****

Les numéros dans les cases correspondent aux n° famille,  
 (\*) est le nombre de répétition pour la famille considérée.  
 La famille 75 n'est pas disponible pour notre étude

## **2. Conditions d'amplification et révélation du polymorphisme**

5 µl d'ADN à 3 ng/µl est mis en présence de 20 µl de mélange réactionnel, pour chaque échantillon et chaque amorce. Pour chaque réaction PCR le mélange réactionnel est composé de :

Tampon de réaction 2X	12,5µl
Amorce (2 µM)	7 µl
Taq (5u. µl)	0,2 µl
H2O dd	0,2 µl

La composition du tampon 2X est reportée dans l'annexe 3.

La PCR est réalisée avec un thermocycleur Techne® Cyclogene Dri-Block7. Une première étape de dénaturation de l'ADN est réalisée à 94°C pendant 4 min. Puis 35 cycles d'amplification sont effectués, avec pour chacun des cycles :

92°C	pendant 45 sec.
40°C	pendant 45 sec.
72°C	pendant 1 min 45 sec.

Une étape finale d'élongation est réalisée pendant 10 min. à 72°C.

La révélation du polymorphisme est réalisée par addition de 5 µl de bleu de charge (composition reportée dans l'annexe 3), puis les produits PCR sont déposés sur gel d'agarose à 1.8%, en présence d'un marqueur de taille (Kb ladder de Gibco BRL®). La séparation des produits PCR est faite par électrophorèse à 3,4 V/cm pendant environ 4 heures, dans un tampon de migration TBE à 0,5X (voir fiche technique n°3). Les fragments amplifiés sont révélés au BET, sous lumière UV (312nm).

## **3. Acquisition des données**

Pour chaque individu, un profil de bandes est obtenu après migration. Celles qui ségrégent dans une ou plusieurs familles sont sélectionnées et leur ségrégation est répertoriée sous forme d'une matrice de 0 et de 1 (0 est une absence de bande et 1 est une présence de bande).

Pour chaque famille et chaque fragment RAPD, un test de  $\chi^2$  est réalisé au seuil de 1% afin de vérifier si les ségrégations observées sont conformes aux ségrégations mendéliennes attendues : 1/2:1/2 dans le cas où le marqueur est absent chez l'un des parents et présent à l'état hétérozygote chez l'autre et 1/4:3/4 dans le cas où le marqueur présent à l'état hétérozygote chez les deux parents).

## **III. Analyses préliminaires à l'analyse QTL**

### **1. Description du dispositif de terrain**

Quatre femelles *E. urophylla* et quatre mâles *E. grandis* sont croisés selon un plan factoriel 4\*4 complet et équilibré. Nous disposons de 15 familles d'hybrides interspécifiques (le matériel végétal de la seizième n'était pas disponible). Le plan factoriel réunit 15 familles de 64 individus, soit un total de 944 individus (cf. tableau 2).

Les familles sont répétées quatre fois sauf pour la famille 64 répétée trois fois. Chaque

Tableau 3 : Définition des variables utilisées. Trois variables ont été mesurées sur le terrain (hauteur totale, circonférence et pylodyn) à 4 âges différents (14, 27, 38 et 67 mois) et deux sont calculées à partir de la hauteur et de la circonférence (coefficient de décroissance métrique et volume).

Variables	Code	Définition des caractères
Hauteur totale (cm)	H(âge)	x1
Circonférence à 1,30m (cm)	C(âge)	x2
Coefficient de décroissance (cm/m)	DM(âge)	$x3=(100*x2)/(x1-130)$
Pénétration du pylodin (mm)	Pyl(âge)	x4
Volume du tronc (dm <sup>3</sup> )	V(âge)	$x5=(1/12\Pi*(x2)^2*(x1-130)+1/4\Pi*(x2)^2*130)/1000$

répétition est constitué d'un plateau de 16 arbres. Ces plateaux sont répartis aléatoirement à l'intérieur des 4 blocs.

## **2. Caractères mesurés**

Chaque individu a fait l'objet de mesures pour différents caractères, à différents âges et d'observations concernant son état sanitaire.

La hauteur de l'arbre et sa circonférence à 1,30m ont été mesurées à 14, 27, 38 et 67 mois. On dispose également d'une mesure à 1 mois pour le caractère de hauteur. Le pylodine, mesure qui rend compte de la densité basale du bois (degré de pénétration d'une aiguille dans le tronc, à hauteur d'homme), a été mesuré à 14 et à 38 mois. Le volume et la décroissance métrique, qui rend compte de la forme de l'arbre, ont été calculé selon les formules reportées dans le tableau 3. Pour le calcul du volume du tronc, l'arbre est assimilé à un cylindre du sol à 1,30m de hauteur et à un cône de 1,30m au sommet.

## **3. Traitement des données agronomiques**

Les familles de l'étude doivent répondre du mieux possible au postulat d'une distribution normale et à l'égalité des variances entre populations. Ces conditions sont nécessaires à l'application d'une analyse de variance. Dans un premier temps, les individus ayant des caractéristiques phénotypiques aberrantes sont éliminés pour ne pas biaiser l'estimation des statistiques descriptives des familles (moyenne de la population pour un caractère, variance et écart-type). Les plateaux possédant un effectif inférieur à 8 sont éliminés de l'étude. Pour vérifier que les statistiques répondent à l'hypothèse d'homogénéité des variances, nous avons effectué un test de Bartlett sur chaque caractère (logiciel SAS). Ce test compare un  $\chi^2$  observé ( $\chi^2$  obs.) à un  $\chi^2$  théorique ( $\chi^2$  th.), sachant que :

$$\chi^2 \text{ obs.} = (n-p) \log_e \sigma^2 - \sum [(n_i - 1) \log_e \sigma_i^2] / [1 + 1/3(p-1) \sum 1/(n_i - 1) - 1/(n-p)]$$

avec : n effectif total  
 n<sub>i</sub> effectif de la famille i  
 p nombre de familles  
 $\sigma^2$  variance estimée inter-famille  
 $\sigma_i^2$  variance intra-famille de la famille i

L'hypothèse d'homogénéité des variances est rejetée au seuil de 95% , lorsque le  $\chi^2$  observé est supérieur au  $\chi^2$  théorique à (p-1) degrés de liberté (ddl).

Dans un second temps, les données agronomiques individuelles sont ajustées aux effets contrôlés du milieu. Elles sont corrigées par les effets bloc et les effets plateau. L'amplitude de ces effets est estimée pour les 4 blocs et les 4 plateaux par la méthode des moindres carrés (option *lsmeans* de la procédure *glm* sur SAS) selon un modèle linéaire de décomposition des valeurs phénotypiques individuelles comme suit :

$$Y_{ijkl} = \mu + B_k + F_{ij} + \varepsilon$$



Avec :  $Y_{ijkl}$  valeur du caractère observée pour l'individu  $l$  de la famille  $ij$  dans le bloc  $k$   
 $\mu$  moyenne générale du plan  
 $B_k$  effet bloc moyen du bloc  $k$   
 $F_{ij}$  effet moyen de la famille  $ij$   
 $\varepsilon$  terme résiduel

Lorsqu'un effet bloc est significatif au seuil de 1%, alors les données individuelles sont corrigées par celui-ci. On dispose ainsi de nouvelles données agronomiques ( $Y'_{ijkl}$ ) :

$$Y'_{ijkl} = Y_{ijkl} - B_k$$

Un modèle identique peut s'écrire, prenant en compte les effets plateau :

$$Y'_{ijkl} = \mu + B_{k/ij} + F_{ij} + \varepsilon$$

Avec :  $B_{k/ij}$  effet moyen du plateau  $k$  hiérarchisé par rapport au facteur famille  
 $F_{ij}$  effet moyen de la famille  $ij$   
 $\varepsilon$  terme résiduel

L'effet plateau est estimé sur chaque caractère. Les valeurs phénotypiques corrigées sont :

$$P_{ijkl} = Y'_{ijkl} - B_{k/ij}$$

Nous n'avons pas pu estimer les effets bloc et plateau par un modèle statistique prenant en compte un effet bloc, un effet famille et une interaction bloc/famille (effet plateau). En effet, après le tri des données brutes le dispositif n'est plus équilibré. (les effectifs sont différents dans les familles et le nombre de répétitions varie d'une famille à l'autre).

#### **IV. Détection de QTL**

Deux méthodes de détection de QTL ont été employées : la première méthode a consisté en une analyse de variance (marqueur par marqueur), selon deux modèles de décomposition de variable, l'un considérant l'effet du marqueur dans l'ensemble du plan factoriel, l'autre considérant l'effet du marqueur pour chaque géniteur de façon individuelle. La seconde méthode de détection de QTL, dite d'« Interval Mapping » (cartographie d'intervalle), prend en compte le pourcentage de recombinaison entre marqueur. Cette méthode est utilisée pour chaque géniteur femelle.

##### **1. L'analyse de variance marqueur par marqueur**

###### **a. Détection de QTL dans l'ensemble du factoriel**

Pour chaque caractère, l'effet moyen du marqueur  $X$  sur les caractères d'intérêt a été analysé grâce à un modèle à deux facteurs hiérarchisés : un facteur « famille » et un facteur « génotype au marqueur », hiérarchisé par rapport à la famille.





$$Y_{jpl} = \mu + F_j + M_{p/j} + \varepsilon \quad (\text{modèle A})$$

Avec :	$Y_{jpl}$	variable phénotypique de l'individu l de la famille j ayant un phénotype p au marqueur, (p = 0 ou 1)
	$F_j$	moyenne de la famille j
	$M_{p/j}$	effet moyen du marqueur dans la famille j
	$\varepsilon$	terme résiduel

### **b. Détection de QTL pour chaque géniteur**

L'effet moyen du marqueur X dans les descendance d'un géniteur donné a été étudié suivant un modèle statistique à deux facteurs indépendants : (modèle B)

$$Y_{jpl} = \mu + F_j + M_p + F_j * M_p + \varepsilon$$

Avec :	$Y_{jpl}$	valeur individuelle de l'individu l, de la famille j, de phénotype p (0 ou 1) au marqueur
	$\mu$	moyenne du caractère pour le géniteur considéré
	$F_j$	effet moyen de la famille j
	$M_p$	effet moyen du marqueur p pour le géniteur
	$F_j * M_p$	effet moyen de l'interaction marqueur p et famille j
	$\varepsilon$	terme résiduel

Ce modèle considère le facteur « famille » et le facteur « marqueur » comme indépendants. Seuls des marqueurs hétérozygotes pour le géniteur considéré et homozygotes 0/0 pour les quatre géniteurs croisés avec ce dernier, peuvent être étudiés grâce au modèle B.

L'effet du marqueur étudié dans ces deux modèles est testé aux seuils de 5%, 0,5% et 0,05% par un test F, qui compare la valeur du rapport  $CM_M/CM_E$  (rapport des Carrés Moyens du facteur et du résidu) à la valeur seuil lue dans une table de F pour (g-1) et (N-g) ddl (avec g, nombre de génotype au locus marqueur et N, effectif total d'individus dans la descendance).

## **2. Interval Mapping**

### **a. Cartographie génétique**

La réalisation des cartes a été effectuée sur logiciel MAPMAKER version 3.0 (Lander *et al.*, 1987). Les marqueurs ont été soumis à un test d'indépendance, sous l'hypothèse nulle  $\vartheta = 0,5$ , sachant que  $\vartheta$  est le taux de recombinaison. Ce test est basé sur un rapport du maximum de la fonction de vraisemblance, en considérant la valeur de la fonction pour le  $\vartheta$  observé par rapport au  $\vartheta = 0,5$ . Dans un premier temps, les taux de recombinaison entre marqueurs deux à deux sont calculés. Ensuite, nous avons choisis un  $\vartheta = 0,4$  et LOD score de 3 comme valeurs seuils pour considérer une liaison entre marqueurs. Les taux de recombinaison sont transformés en distance génétique (Centimorgan, cM) grâce à la fonction Kosambi (Kosambi, 1944) disponible sur MAPMAKER.

### **b. Détection de QTL**

La seconde méthode de détection de QTL est basée sur la fonction du maximum de



vraisemblance, qui part de l'hypothèse qu'il y a un QTL dans l'intervalle de deux marqueurs liés.

Les valeurs phénotypiques des individus des quatre familles de demi-frères issues d'un géniteur sont corrigés par les effets familles. Pour un géniteur donné, les valeurs individuelles sont décomposées comme suit :

$$P_{jl} = \mu + F_j + E_{jl}$$

Avec	$P_{jl}$	valeur phénotypique de l'individu l de la famille j
	$\mu$	moyenne du caractère pour le géniteur considéré
	$F_j$	effet moyen de la famille j
	$E_{jl}$	terme résiduel

Les effets moyens des 4 familles ont été estimés par la méthode des moindres carrés (option *lsmeans* de la procédure *glm*, SAS), puis soustraits aux valeurs phénotypiques individuelles respectives :

$$P'_{jl} = P_{jl} - F_j$$

L'Interval Mapping est alors réalisé avec le logiciel MAPMAKER/QTL version 1.9 (Lincoln *et al.*, 1990), sur la carte génétique de chaque géniteur. Avec un LOD seuil de 1,6, le logarithme du rapport de vraisemblance est calculé en chaque point du chromosome :

$$\text{LOD} = \log_{10} (V_1/V_2)$$

Avec	$V_1$	valeur de la fonction de vraisemblance sous l'hypothèse de présence d'un QTL
	$V_2$	valeur de la fonction de vraisemblance sous l'hypothèse d'absence de QTL.



## **RESULTATS**

### **I. Le marquage moléculaire par la méthode RAPD**

Le marquage moléculaire a été réalisé pour 725 individus du plan factoriel 4\*4. Pour ma part, j'ai réalisé le génotypage de 392 d'entre eux, correspondant à huit familles d'hybrides issues du croisement entre deux mères *E. urophylla* (14-128 et 14-144), avec quatre pères *E. grandis* (9-37, 9-40, 9-41 et 9-42). Au total, 180 marqueurs RAPD ont été générés grâce aux 26 amorces choisies. Parmi ces 180 marqueurs, on retrouve 30 et 20 marqueurs, sélectionnés respectivement sur les cartes d'*E. urophylla* et *E. grandis*, établies à partir du croisement élite.

Les 30 marqueurs spécifiques du géniteur 14-144 ne sont pas systématiquement présents chez les autres mères du plan factoriel. En effet, seulement deux d'entre eux sont communs aux quatre géniteurs femelles, six sont communs à trois géniteurs, et treize sont communs à seulement deux géniteurs. Enfin, neuf marqueurs sont présents uniquement chez le géniteur 14-144. Par ailleurs, on remarque que six marqueurs sont à l'état homozygote 1/1 pour une des trois mères (14-128, 14-133 ou 14-136). Seulement 5 marqueurs sont présents également chez les pères *E. grandis*.

Parmi les 20 marqueurs spécifiques du géniteur 9-21, cinq d'entre eux sont communs aux quatre pères de cette étude. Trois marqueurs sont présents chez trois pères. Sept marqueurs sont présents chez deux géniteurs uniquement et cinq sont spécifiques d'un seul père. Six marqueurs sont présents à l'état homozygote 1/1 chez au moins un des pères. Sur les 20 marqueurs spécifiques du père 9-21, huit d'entre eux sont présents chez au moins une des quatre mères étudiées. Ces différents résultats sont présentés dans le tableau 4.

### **II. Détection de QTL marqueur par marqueur**

L'analyse de variance est utilisée pour la détection de QTL au niveau d'un marqueur à la fois. Cette méthode traditionnelle (Edwards *et al.*, 1987) consiste à comparer les moyennes phénotypiques des descendants ayant le même génotype au marqueur. Un test F permet de dire si les différences entre les moyennes du caractère mesuré sur les deux classes (présence ou absence du marqueur) est significative ou non, autrement dit, si un QTL est détecté. Cette analyse a été réalisée sur la totalité du plan factoriel (15 familles) avec les 50 marqueurs spécifiques aux deux parents du croisement élite.

#### **1. Test de Bartlett**

Le test de Bartlett a été réalisé sur les différentes familles afin de vérifier l'homogénéité des variances. Ce test, basé sur l'hypothèse nulle d'égalité des variances, s'est révélé

Tableau 5 : Résultats de l'analyse de variance à partir du modèle A, pour différents marqueurs liés à des QTL dans le croisement élite. Pour chaque caractère (Hauteur, Circonférence, Volume, Pylodin et Décroissance Métrique) et pour chaque âge (1, 14, 27, 38 et 67 mois) l'effet significatif des marqueurs est indiqué par une \*.

Marqueur	Croisement élite			Plan factoriel
	parent	Groupe	QTL lié	Caractère/Âge/seuil du test
A08-479	14-144	3	Pyl51 V38,51,59	H1* V38*, V67*
X19-709	14-144	3	C59 Pyl51 V38,51,59	H1* Pyl14*, Pyl38* V67*
M05-527	14-144	1	DM38 V38,51,59 C38,51,59	H14* V14* C14*
K12-701	14-144	5	V18 C18	H27**, H38**, H67** V27***, V38***, V67*** C27*** C38*** C67*** DM38**, DM67**
X12-383	14-144	9	-	H27*, H38* V14*, V27*, V38* C27*
N07-735	14-144	2	V38 C38,51,59 DM38,51,59	Pyl14*, Pyl38**
B08-365	14-144	7	H51	Pyl38*
M05-722	14-144	11	Pyl26,51,59 DM26	Pyl38*
L05-1068	14-144	6	-	V14*
L05-750	14-144	2	V38 C38,51,59 DM38,51,59	V38*
K10-474	14-144	1	-	V38*, V67*
N07-918	14-144	5	-	C14* DM67*
A09-1084	14-144	3	-	DM27*
K10-528	14-144	1	Pyl59	DM27**
A09-1368	9-21	11	-	H14* V14** C14**
A09-559	9-21	3	Pyl51	C14* DM27*
N12-346	9-21	6	Pyl26, 38 C38	H27**, H38* V27*, V38*, V67* C14*, C27* DM14*

(\*) significatif au seuil de 5%, (\*\*) au seuil de 0,5%, (\*\*\*) au seuil de 0,05%

QTL commun entre croisement élite et plan factoriel





Tableau 6 : Résultats de l'analyse de variance du modèle B pour des marqueurs liés à des QTL dans le croisement élite, chez les mères 14-128, 14-133, 14-136 et 14-144, pour les caractères de hauteur (H), volume (V), circonférence (C), pylodine (Pyl) et décroissance métrique (DM), à différents âges (1, 14, 27, 38 et 67 mois). Le génotype au marqueur de chaque parent est indiqué (1/0 ou 0/0).

Marqueur	Croisement élite		Plan Factoriel			
	Groupe	QTL lié	14-128	14-133	14-136	14-144
A09-586	1	-	0/0	0/0	1/0	1/0
		C38,51,59	-	-	H: 14* 27*	H: 14* 27*
		V38,51,59	-	-	-	-
		DM38,51,59	-	-	-	DM14*
B08-365	7	H51	0/0	1/0	0/0	1/0
		-	-	-	-	Py138*
R15-671	4	-	1/0	1/0	0/0	1/0
		V51,59	H67*	H1*	-	-
		Py151	-	-	-	-
		-	DM38*	DM27*	-	-
R15-892	7	-	1/0	1/0	1/0	1/0
		-	DM38*	-	-	DM27*
K10-474	1	-	0/0	0/0	0/0	1/0
		-	-	-	-	H38*
K10-528	1	-	1/0	0/0	0/0	1/0
		Py159	: 1* 14*** 27*** 38	-	-	-
		-	C14*	-	-	-
X12-383	9	-	0/0	0/0	0/0	1/0
		-	-	-	-	H: 14* 27** 38*** 67*
		-	-	-	-	V: 14* 27** 38**
		-	-	-	-	C: 14* 27** 38** 67*
X19-709	3	-	0/0	1/0	0/0	1/0
		Py151	-	H1*	-	H: 38* 67**
		V: 38,51,59	-	-	-	Py: 14** 38*
		C59	-	-	-	V: 38* 67**
		-	-	-	-	C: 38* 67**
		-	-	-	-	DM67*
N07-735	2	-	0/0	0/0	0/0	1/0
		V38	-	-	-	H67*
		C38,51,59	-	-	-	Py: 14** 38***
		DM38,51,59	-	-	-	-
		-	-	-	-	C67*
N07-918	5	-	1/1	0/0	1/0	1/0
		-	-	-	H14**	-
		-	-	-	V14*	V67*
		-	-	-	C14*	-
L05-1068	6	-	0/0	0/0	0/0	1/0
		-	-	-	-	C14*
N12-460	7	-	1/0	1/1	0/0	1/0
		-	-	-	-	Py138*
N12-1348	4	-	1/0	1/0	0/0	1/0
		-	H1*	-	-	-
		-	V14*	Py114*	-	-
		-	DM38*	-	-	-
K16-474	10	-	1/1	0/0	0/0	1/0
		-	-	-	-	Py138**
		-	-	-	-	V67**
		-	-	-	-	C67**
K12-701	5	-	0/0	0/0	1/0	1/0
		V18	-	-	H: 27* 38* 67*	H: 27** 38** 67*
		C18	-	-	V38*	V: 27*** 38*** 67**
		-	-	-	C: 38* 67*	: 14* 27*** 38*** 67*
		-	-	-	-	DM: 27* 38** 67*
M05-527	1	-	1/0	0/0	1/0	1/0
		V38,51,59	H: 14* 27* 38* 67*	-	-	-
		C38,51,59	V: 14* 27* 38*	-	-	-
		DM38	C27*	-	-	-
L05-750	2	V38	1/1	0/0	0/0	1/0
		C38,51,59	-	-	-	V27* 38*
		DM38,51,59	-	-	-	C38*
		-	-	-	-	DM 27*
N11-197	2	-	0/0	0/0	0/0	1/0
		-	-	-	-	Py114*
		-	-	-	-	V38*
X19-562	11	Py126,38,51,59	0/0	0/0	1/0	1/0
		DM26	-	-	-	Py138*
Z03-925	1	H38,51,59	1/0	1/0	1/0	1/0
		V38,51,59	H: 1* 14*** 27**	-	-	-
		DM38,51,59	V14*	-	-	-
		C38,51,59	DM: 14* 27*** 38*	-	-	-
		Py159	-	-	-	DM14*
E04-318	5	H14,26,38	1/0	0/0	0/0	1/0
		-	-	-	-	-
		C26	-	-	-	Py114*
		V26	-	-	-	-

(\*) Effet marqueur significatif au seuil de 5%, (\*\*) au seuil de 0,5%, (\*\*\*) au seuil de 0,05%.

QTL mis en évidence chez au moins deux mères pour un caractère donné

significatif pour la plupart des caractères étudiés. En représentant, pour chaque caractère, le nuage de point des variances intra-famille en fonction de la moyenne de chaque famille (cf. annexe 4), on note que la famille 37 se situe systématiquement en dehors du nuage de points. Nous avons penser que cette famille introduisait un biais dans l'étude. Pourtant, l'élimination de cette famille ne change pas la conclusion du test. La famille 37 n'est donc pas la seule famille responsable des différences entre variances intra-familles.

Aussi, partant du fait que l'analyse de variance réalisée par le logiciel SAS est robuste aux écarts à la normalité des populations et à l'hétérogénéité des variances, nous avons choisi de réaliser cette analyse sans transformation des données.

## **2. Analyse des effets marqueurs dans le plan factoriel (modèle A)**

Le premier modèle utilisé nous a permis d'étudier l'effet de chaque marqueur dans chaque famille en considérant l'ensemble du plan. On met en évidence 52 effets marqueurs significatifs, tout âge et tout caractère confondus : 31 au seuil de 5%, 12 au seuil de 0,5% et 9 au seuil de 0,05%. Au total, 18 marqueurs ont un effet significatif dans l'ensemble du plan factoriel : 15 marqueurs sont spécifiques à *E. urophylla* et 3 marqueurs sont spécifiques à *E. grandis* (cf. tableau 5).

Six marqueurs sont liés aux mêmes QTL que ceux cartographiés dans le croisement élite : A08-479 (lié à un QTL de volume), X19-709 (lié à des QTL de pilodyn et de volume), K12-701 (lié à des QTL de volume et de circonférence), M05-722 (lié à un QTL de pilodyn), L05-750 (lié à un QTL de volume) et N12-346 (lié à un QTL de circonférence). On remarque qu'un effet fort du marqueur dans seulement une ou deux familles suffisent pour déclarer l'effet du marqueur significatif.

## **3. Analyse des effets marqueurs pour chaque parent (modèle B)**

Ce modèle statistique a permis d'étudier l'effet des marqueurs pour un géniteur donné. Ce modèle étant basé sur l'indépendance des effets familles et des effets marqueurs, les marqueurs pris en compte dans cette analyse répondent à l'exigence 1/0 chez le géniteur étudié et 0/0 chez les géniteurs avec lesquels il est croisé.

### **a. Géniteurs *E. urophylla***

Chez les géniteurs *E. urophylla*, 26 marqueurs ont été analysés : 8 marqueurs ont été testés pour la mère 14-128, 7 pour la mère 14-133, 8 pour la mère 14-136 et 26 marqueurs pour la mère 14-144. Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau 6.

Pour la mère 14-128, 26 QTL sont mis en évidence (tout âge et tout caractère confondus) : 20 liaisons marqueur-QTL sont significatives à 5%, 3 à 0,5% et 3 à 0,05%. Pour le géniteur 14-133, 3 marqueurs permettent la mise en évidence de 4 QTL au seuil de 5%. Chez la mère 14-136, 3 marqueurs permettent la mise en évidence de 11 QTL : 10 au seuil de 5% et 1 au seuil de 0,5%. Enfin, pour la mère 14-144, 17 marqueurs permettent de mettre en évidence 62 QTL (tout âge et tout caractère confondus) : 37 au seuil de 5%, 19 à 0.5% et

Tableau 7 : Résultats de l'analyse de variance du modèle B pour des marqueurs liés à des QTL dans le croisement élite, chez les pères 9-37, 9-40, 9-41 et 9-42 pour les caractères de hauteur (H), volume (V), circonférence (C), pyrodine (Pyl) et décroissance métrique (DM) à différents âges (1, 14, 27, 38 et 67 mois). Le génotype au marqueur est indiqué (1/0 ou 0/0).

Marqueur	Croisement élite		Plan factoriel			
	Groupe	QTL lié	9-37	9-40	9-41	9-42
X12-633	1		1/0	1/0	0/0	0/0
		V38,51,59	-	-	-	-
		Pyl14,26	-	-	-	-
		DM26,38,59	-	38** 67*	-	-
Z12-614	6		1/1	0/0	1/0	1/0
		-	-	-	Pyl: 14*	Pyl: 14*
		-	-	-	DM:14**	DM: 67*
I14-797	11		0/0	1/0	1/0	1/0
		-	-	H: 14*	-	-
		Pyl14,18	-	-	-	-
M12-539			0/0	0/0	1/0	1/0
		-	-	-	DM: 27* 38*	-
N11-1405	2		1/0	1/0	1/1	1/0
		Pyl51	-	-	-	-
		-	DM: 27*	-	-	-
A09-1368	11		0/0	0/0	0/0	1/0
		-	-	-	-	H: 14* 27** 38* 67*
		-	-	-	-	V: 14** 27*
		-	-	-	-	C: 14** 27*
		-	-	-	-	DM: 67*

(\*) significatif au seuil de 5%, (\*\*) au seuil de 0,5%

QTL commun entre pères

6 à 0,05%.

Huit QTL de la mère 14-128 sont communs aux autres géniteurs : deux communs à la mère 14-133, deux QTL communs à la mère 14-144 et quatre QTL communs à la mère 14-144 du croisement élite. Chez la mère 14-133, un QTL de hauteur est commun à la mère 14-144. Chez la mère 14-136, cinq QTL sont communs à la mère 14-144 de l'étude. Pour la mère 14-144, 12 QTL sont communs avec ceux mis en évidence dans le croisement élite.

Le QTL de vigueur, détecté à 38, 51 et 59 mois dans le croisement élite, et lié au marqueur X19-709, est remis en évidence chez la mère 14-144. Il contrôle des caractères de vigueur à 38 et 67 mois (aux seuils respectifs de 5 et de 0,5%).

Le marqueur N12-1348, par exemple, est lié à un QTL chez la mère 14-128 et la mère 14-133. Dans le premier cas, il apparaît lié aux caractères de vigueur et de forme. Dans le second cas, il contrôle le caractère de pylodin.

Les marqueurs X19-709, R15-671, N07-918 et R15-892. X19-709, présents chez les mères 14-133 et 14-144, sont liés au caractère de la hauteur pour la première mère, à 38 et 67 mois pour la seconde mère. Le marqueur R15-892, présent chez les quatre mères, est lié à la décroissance métrique à 38 et 27 mois respectivement chez les mères 14-128 et 14-144. Le marqueur R15-671, présent chez trois mères, est lié aux caractères de la hauteur et de la décroissance métrique, à 38 mois pour la mère 14-128, et à 1 et 27 mois pour la mère 14-133. Aucun QTL n'a pu être mis en évidence chez la mère 14-144 au niveau de ce marqueur. Le marqueur N07-918, présent chez les mères 14-136 et 14-144 est lié au volume dans les deux cas, à 14 mois pour l'un, à 67 mois pour l'autre.

Le marqueur Z03-925 était intéressant pour ce modèle d'analyse de variance dans l'optique d'une étude de stabilité, car il est présent chez les quatre mères et absent chez les quatre pères du plan factoriel. Mais aucune liaison stable avec un QTL n'a pu être mise en évidence avec ce marqueur, mis à part un QTL de décroissance métrique à 14 mois stable chez les mères 14-128 et 14-144.

Le marqueur A09-586, lié à un QTL de hauteur à 14 et 27 mois chez la mère 14-144 est aussi détecté chez la mère 14-136. Dans le croisement élite (14-144 x 9-21), une liaison entre ce marqueur et un caractère de vigueur à 38 mois avait été mise en évidence.

### **b. Géniteurs *E. grandis***

Chez les géniteurs *E. grandis*, 12 marqueurs ont été analysés : 7 marqueurs ont été testés pour le père 9-37, 5 pour le père 9-40, 6 pour le père 9-41 et 6 pour le père 9-42. Les résultats sont reportés dans le tableau 7.

Pour le père 9-37, 1 marqueur est lié à un QTL au seuil de 5%. Pour le père 9-40, 2 marqueurs permettent la mise en évidence de 3 QTL (tout âge et tout caractère confondus), 2 au seuil de 5% et 1 au seuil de 0,5%. Pour le père 9-41, 2 marqueurs mettent en évidence 4 QTL, 2 au seuil de 5% et 2 au seuil de 0,5%. Enfin, pour le père 9-42, 2 marqueurs permettent la mise en évidence de 11 QTL, dont 8 au seuil de 5% et 3 au seuil de 0,5%.

Un QTL de décroissance métrique est commun aux pères 9-40 et 9-21 (X12-633). Deux QTL de pilodyn et de décroissance métrique sont communs aux pères 9-41 et 9-42 (Z12-614).

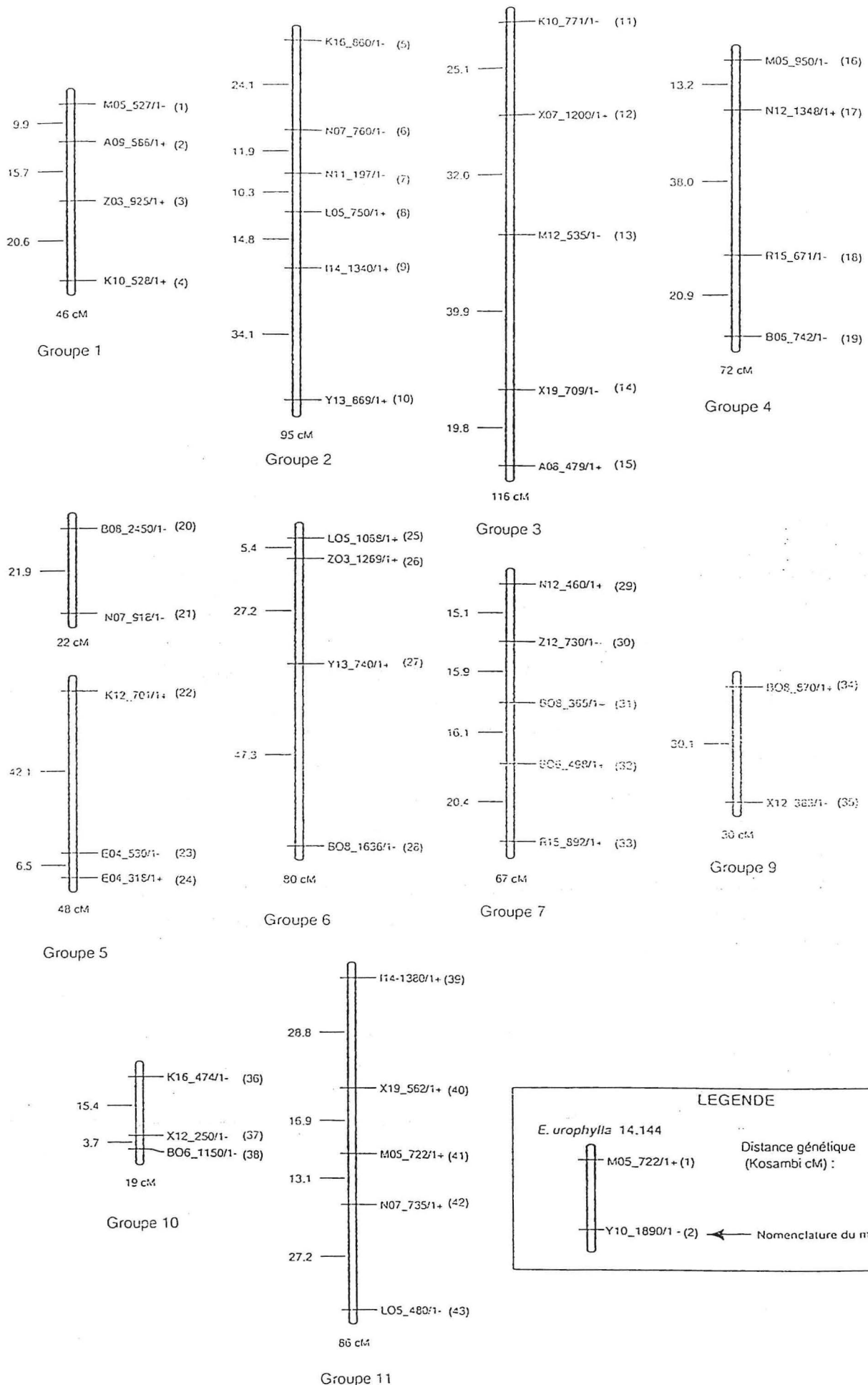


Figure 6 : Reconstruction des groupes de liaison d'*E. urophylla* 14-144, avec 43 marqueurs RAPD génotypés sur 4 familles du plan factoriel.



Tableau 8 : Caractéristiques des cartes génétiques des *Eucalyptus urophylla* et *Eucalyptus grandis* reconstruites à partir du plan factoriel en comparaison avec celles construites à partir du croisement élite.

	Croisement élite		Plan factoriel					
	14-144	9-21	14-128	14-144	9-37	9-40	9-41	9-42
Nombre de groupes de liaison	11	11	5	10	6	5	6	6
Taille totale observée (cM)	1331	1415	261	681	452	173	390	275
Taille moyenne d'un groupe (cM)	121	129	52	68	75	35	65	46
Nombre totale de marqueurs	105	99	25	43	39	23	30	26
Distance moyenne entre marqueur (cM)	13	14	10	16	12	8	13	11





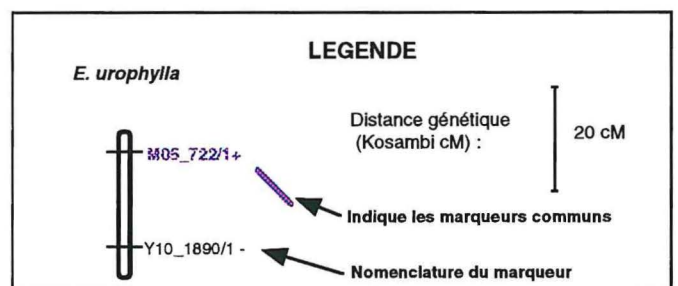
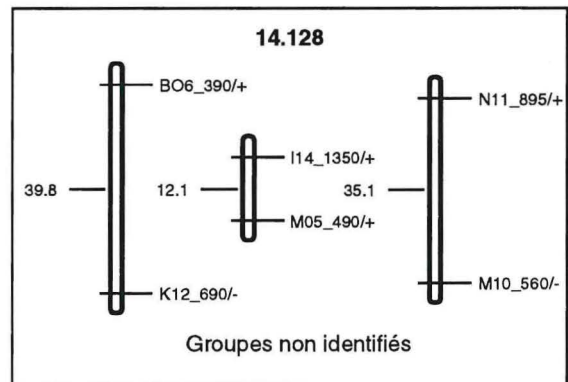
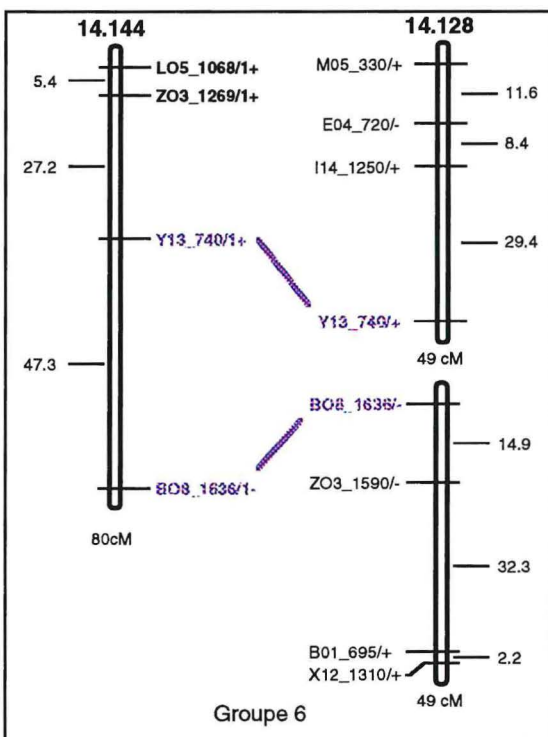
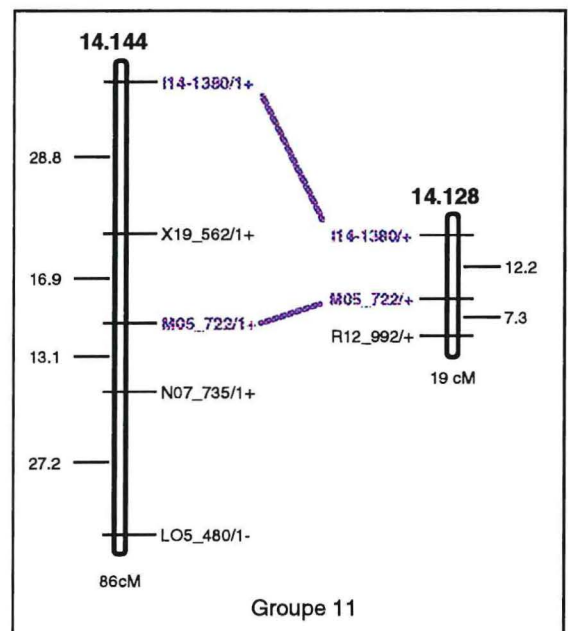
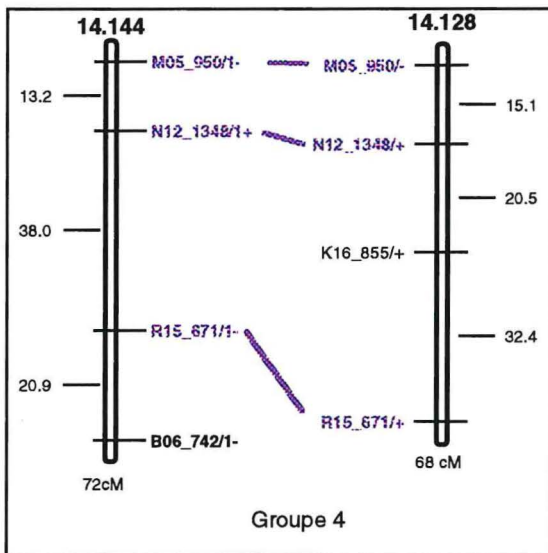
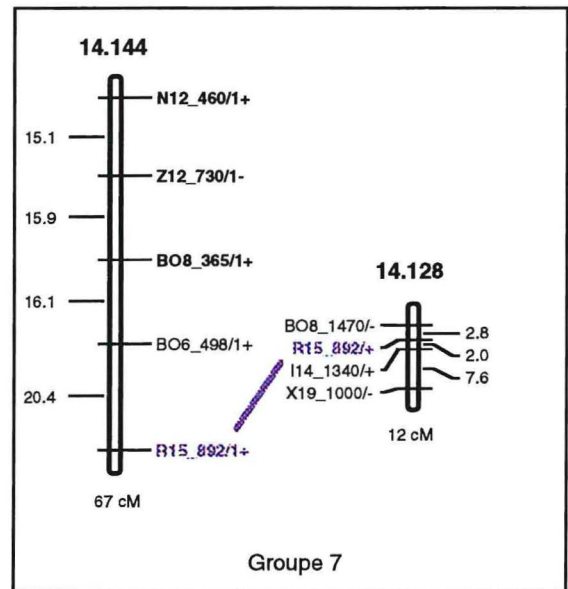
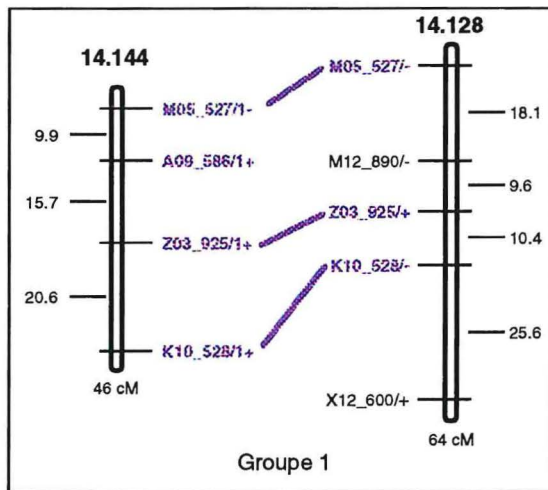


Figure 7 : Cartes partielles établies à l'aide de 42 et 26 marqueurs RAPD chez les géniteurs *E.urophylla* 14.144 (à gauche) et *E.urophylla* 14.128 (à droite).

### **III. Détection de QTL par « Interval Mapping »**

La méthode d'Interval Mapping présente l'avantage de tenir compte des recombinaisons entre marqueur et QTL. Elle nécessite au préalable la construction d'une carte génétique et permet une localisation plus précise des QTL.

#### **1. Cartographie génétique**

##### **a. Chez les mères *E. urophylla* 14-144 et 14-128**

Une reconstruction partielle des cartes génétiques a été réalisée à partir des 4 familles du plan factoriel issues de la femelle 14-144. Nous avons disposé au total de 229 individus (familles 45, 1, 42, 16). 60 marqueurs, répondant aux génotypes 1/0 chez la mère et 0/0 chez les pères, ont été utilisés. Lorsque, pour une famille, le marqueur ne ségrégeait pas dans les conditions Mendéliennes 1/2:1/2 au seuil de 1%, les données ont été considérées comme données manquantes pour la famille. Avec 42 marqueurs, les 11 groupes de liaison ont pu être partiellement reconstitués (cf. figure 6) et identifiés grâce à des marqueurs communs aux cartes d'*E. urophylla* (Verhaegen *et al.*, 1997). On peut noter que l'agencement entre marqueur à l'intérieur des groupes de liaison est relativement bien conservé par rapport aux cartes construites avec le croisement élite.

Au total, 25 marqueurs, sur les 42 cartographiés, sont communs aux groupes de liaisons établis à partir du croisement élite. 17 marqueurs sont nouveaux par rapport au croisement élite. La carte génétique de la mère 14-144 du croisement élite couvre 1331 cM environ, celle reconstruite dans notre étude 681 cM. Ceci montre que nous ne disposons pas de cartes saturées.

A partir des 3 familles du plan factoriel descendant de la mère 14-128 (familles 2, 3 et 37, soit 180 individus) et 43 marqueurs, 9 groupes de liaison ont été construits (26 marqueurs cartographiés). Les groupes de liaison 1, 4, 6, 7 et 11 ont été identifiés par confrontation avec les groupes de liaisons de la mère 14-144. Seulement 8 marqueurs sont communs aux cartes du croisement élite, mais 10 marqueurs sont communs aux nouveaux marqueurs du 14-144. La carte génétique partielle du 14-128 couvre 261 cM (cf. tableau 8). Les phases de liaisons entre marqueurs liés sont relativement bien conservé entre ces deux géniteurs. La figure 7 représente les groupes de liaison du géniteur 14-128 identifiés grâce aux groupes de liaison du 14-144.

##### **b. Chez les pères *E. grandis* 9-37, 9-40, 9-41 et 9-42**

La cartographie du père 9-37 a été réalisée sur 86 individus, issus de la réunion des familles 45 et 37, à l'aide de 53 marqueurs, dont 5 sont commun au géniteur 9-40, 8 au géniteur 9-41 et 9-42. Au total, 39 marqueurs sont cartographiés sur 6 groupes de liaison, dont 8 sont communs à la carte d'*E. grandis* 9-21. Parmi les groupes de liaison reconstruits, il a été possible d'identifier les groupes 1, 2, 3, 6, 7 et 11 par rapport aux cartes génétiques du 9-21

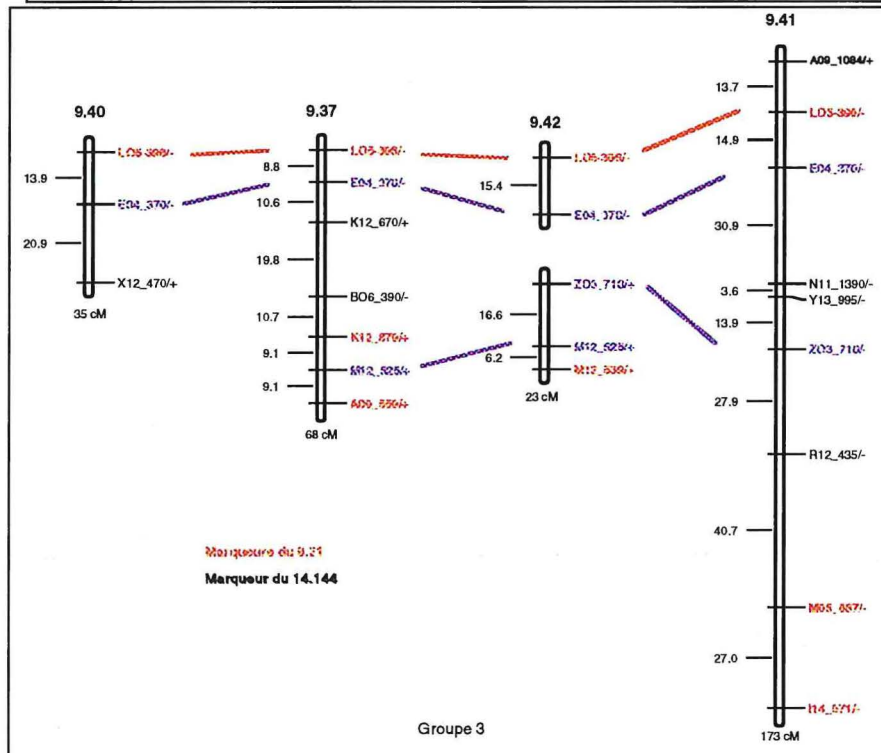
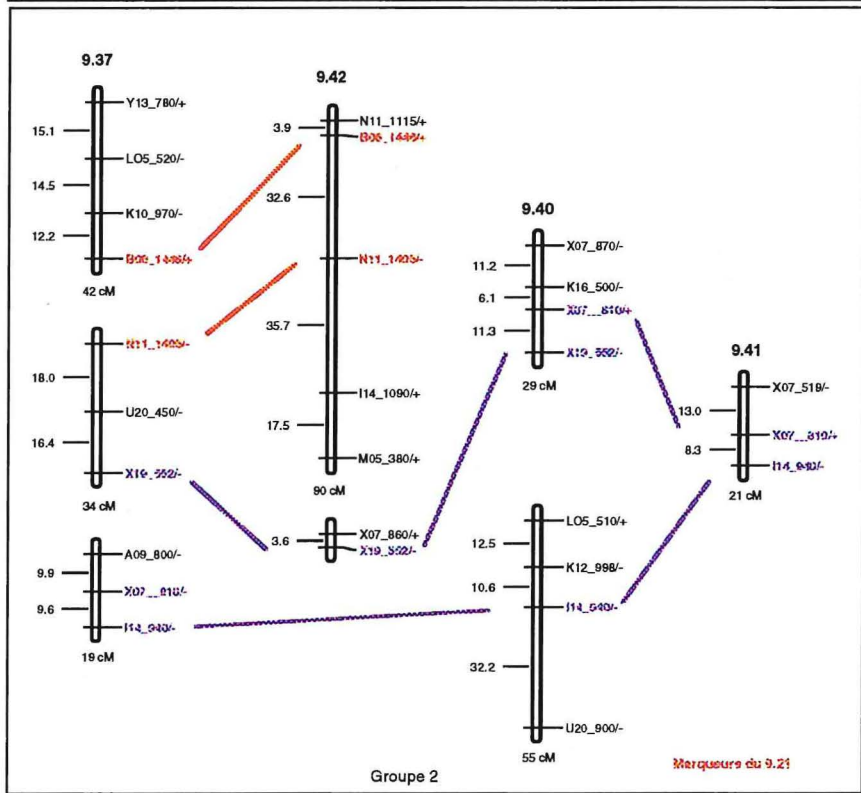
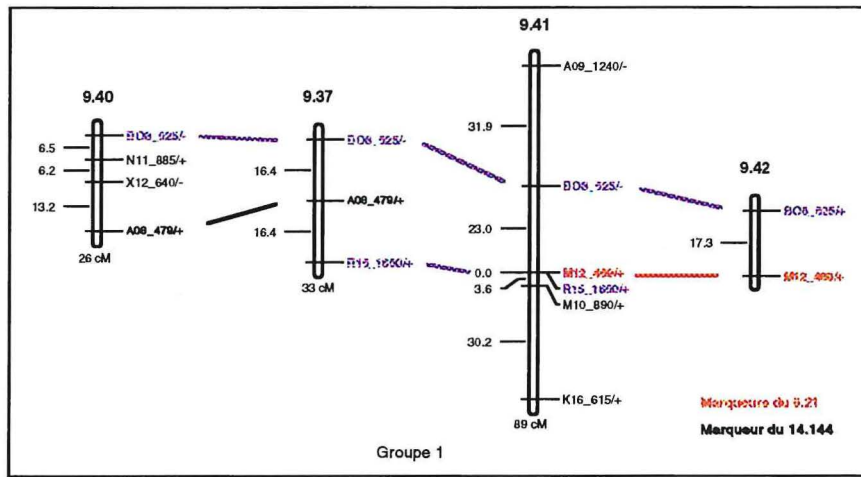


Figure 8 : Cartes partielles établies à l'aide de 39, 23, 30 et 26 marqueurs RAPD chez les géniteurs *E. grandis* 9-37, 9-40, 9-41 et 9-42.

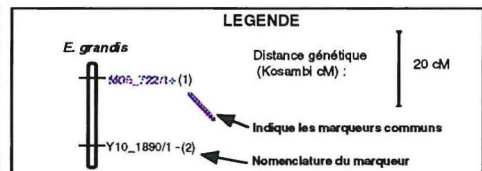
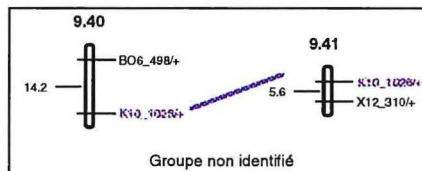
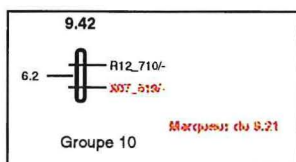
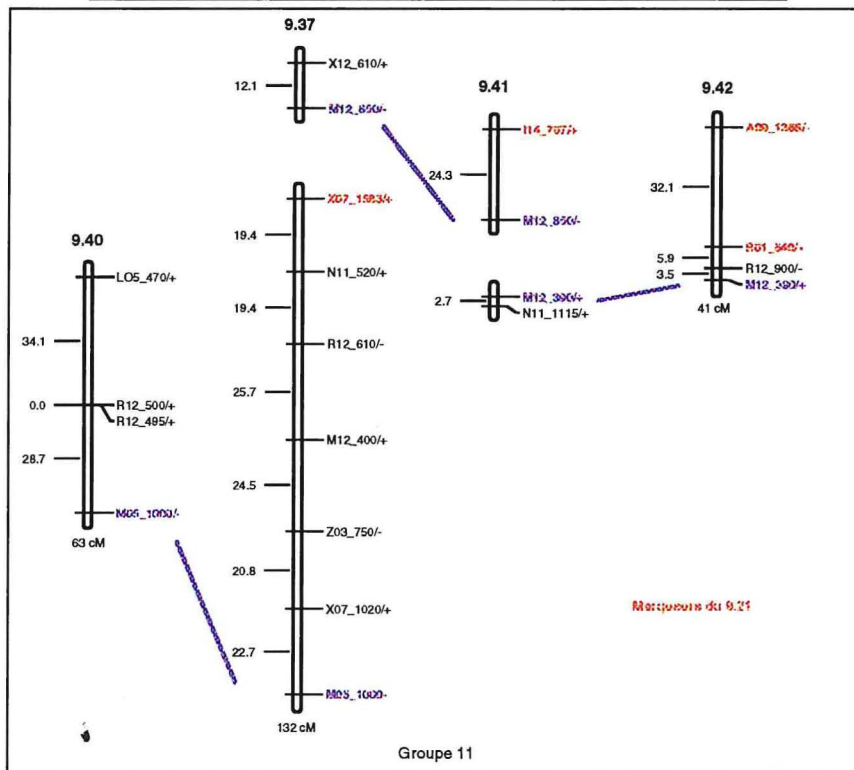
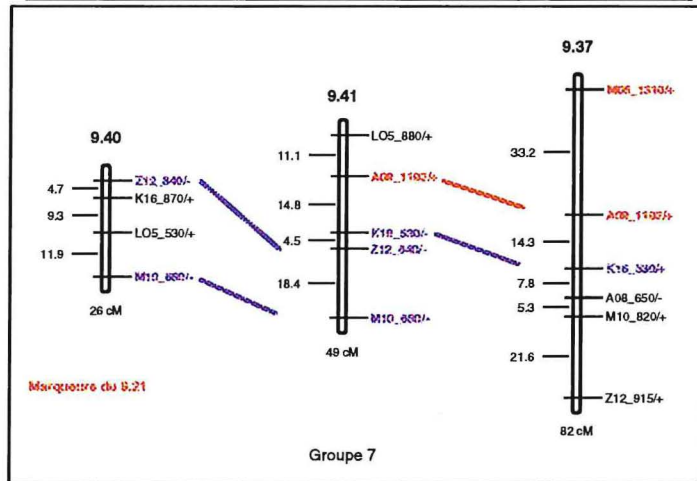
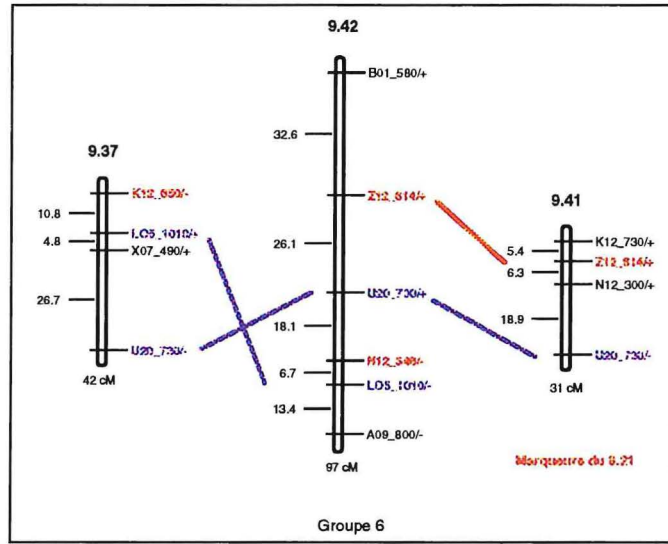


Figure 8 : (suite)



et aux autres pères du plan factoriel. Les groupes reconstruits pour le 9-37 couvrent 452 cM (32 % de la carte du 9-21), ce qui représente environ un marqueur tous les 9 centimorgans. Certains marqueurs posent problèmes : A08-479, présent sur le groupe 1, est un marqueur du groupe 3 du 14-144. A09-800, présent sur un des segments du groupe 2 est également présent sur le groupe 6 du père 9-42. La présence du marqueur M05-1310 sur le groupe 7 pose question, puisque ce marqueur est présent sur le groupe 9 du 9-21.

La cartographie du père 9-40 a été réalisée à partir de 82 individus, réunissant les effectifs des familles 1 et 27. Au total, nous avons disposé de 40 marqueurs. Six d'entre eux sont communs aux géniteurs 9-41 et 9-42. Au total, 25 marqueurs ont été cartographiés et ont permis la construction de 5 groupes de liaison. Le père 9-40 n'ayant aucun marqueur cartographié commun avec le 9-21, l'identification des groupes de liaisons 1, 2, 3, 7 et 11., a été possible uniquement par homologies avec les groupes de liaison des trois autres pères du plan factoriel. Cette reconstruction couvre 173 cM, soit 12,2% de la carte du géniteur 9-21 et avec une densité de marquage moyenne de 7 cM. On retrouve sur le groupe de liaison 1 la présence du marqueur A08-479, marqueur de la mère du groupe 3 de la mère 14-144.

111 individus (familles 2 et 42) et 44 marqueurs, 15 communs au père 9-42 ont permis la construction de 6 groupes de liaisons pour le géniteur 9-41. Sur les 32 marqueurs cartographiés, 7 sont communs au père 9-21 et on permis d'identifier les groupes de liaisons 1, 2, 3, 6, 7 et 11. Cette carte partielle couvre 390 cM, soit 28% de la carte du géniteur 9-21, avec 1 marqueur tous les 9 cM environ.

Sur le groupe de liaison 3 du 9-41, on note la présence du marqueur A09-1084, présent sur le groupe de liaison 3 de la mère 14-144. Le marqueur N11-1195 présent sur le groupe de liaison 11 est retrouvé sur le groupe de liaison 2 du père 9-42.

La cartographie du père 9-42 a été réalisée à partir de 107 individus (familles 3 et 16), avec 34 marqueurs, dont 15 communs avec le 9-41. Une totalité de 26 marqueurs jalonnent 6 groupes de liaison, 7 d'entre eux sont communs à la carte du géniteur référence (9-21). Les groupes de liaison 1, 2, 3, 6, 10 et 11 ont été identifiés. Ces groupes de liaison couvrent 275 cM, soit 19% environ de la carte du 9-21, avec un marqueur tous les 11 cM. On retrouve la présence de quelques marqueurs problématiques comme A09-800, présent sur le groupe 6, alors qu'il est présent sur le groupe de liaison 2 du 9-37, et N11-1115, présent sur le groupe de liaison 2 chez le 9-42 et sur le groupe 11 du 9-41.

La figure 8 représente les cartes partielles pour les quatre géniteurs *E. grandis*. Les caractéristiques de ces cartes sont présentées dans le tableau 8, cité précédemment.

On note la formation d'un groupe de liaison de deux marqueurs chez les géniteurs 9-40 et 9-41, de 14 et 6 cM environ respectivement. Ces deux groupes ont un marqueur en commun (K10-1026), mais le manque de marqueurs liés ne permet pas d'identifier ce groupe de liaison à un groupe d'*E. grandis* 9-21.

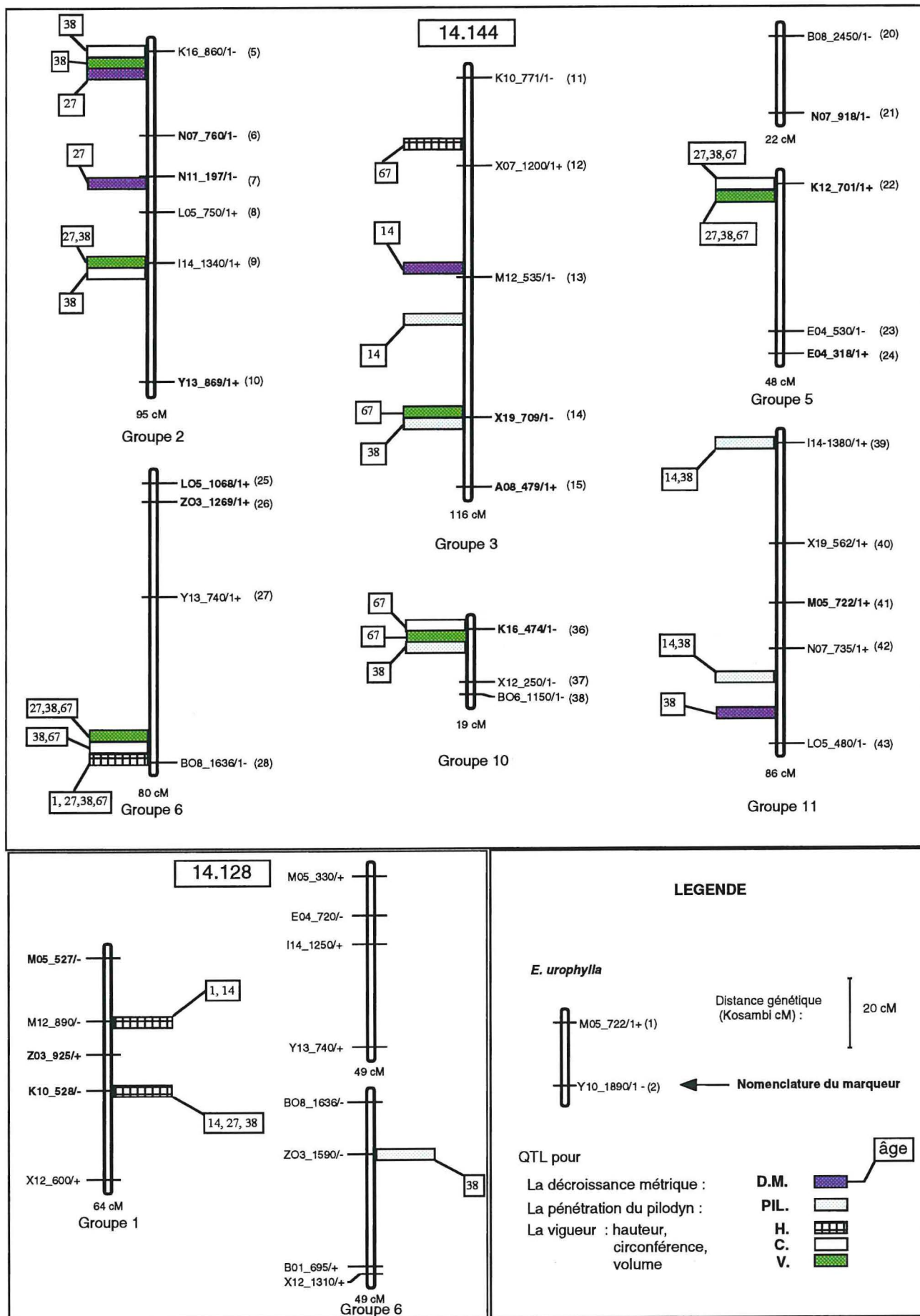


Figure 9 : Localisation sur les groupes de liaisons des QTL détectés par IM chez les géniteurs *E.urophylla* 14-144 et 14-128.





Tableau 9 : Mise en évidence de QTL par cartographie d'intervalle pour les caractères de hauteur (H), de circonférence (C), de volume (V), de décroissance métrique (DM) et de pilodyne (pil) à différents âges (1, 14, 27, 38, et 67 mois) chez *E. urophylla* 14-144.

Caractères	Groupe de liaison	Intervalle	Position (cM)	LOD max	% variation	% var. cumulé
H1	6	27-28	0	1,8	5,9	
H27	6	27-28	47	1,83	4,5	
H38	6	27-28	47	2,7	6,6	
H67	3	11-12	20	1,9	6,0	] 15,7%
H67	6	27-28	47	3,8	9,3	
C27	5	22-23	0	2,6	6	
C38	2	5-6	0	1,6	3,8	] 15,9%
C38	2	9-10	0	1,9	4,9	
C38	5	22-23	0	2,5	5,8	
C38	6	27-28	47	2,3	5,5	] 16,6%
C67	5	22-23	0	2	4,7	
C67	6	27-28	47	2,2	5,5	
C67	10	36-37	0	2,3	5,5	
V27	2	9-10	0	1,9	4,8	] 14%
V27	5	22-23	0	2,5	5,7	
V27	6	27-28	47	1,7	4,1	
V38	2	5-6	2	2,1	5,2	] 17,2%
V38	2	9-10	0	2,2	5,7	
V38	5	22-23	0	2,5	5,7	
V38	6	27-28	47	2,3	5,4	] 18,7%
V67	3	14-15	0	1,7	4	
V67	5	22-23	0	2	4,6	
V67	6	27-28	47	2,4	5,8	
V67	10	36-37	0	2,2	5,1	
DM14	3	12-13	40	2,9	6,9	
DM27	2	5-6	2	2,0	5,1	] 6%
DM27	2	7-8	2	2,0	4,8	
DM38	11	42-43	28	2,0	6,1	
PIL14	3	12-13	18	3,0	13	] 22,5%
PIL14	11	39-40	0	2,4	7,3	
PIL14	11	42-43	18	3,6	13,3	
PIL38	3	14-15	0	1,6	3,9	] 28,8%
PIL38	10	36-37	6	1,8	4,9	
PIL38	11	39-40	6	6,3	23,6	
PIL38	11	42-43	8	4,8	14,7	

## **2. Détection de QTL par IM**

La détection de QTL par IM a été réalisée uniquement pour les mères 14-144 et 14-128. En effet pour les 4 pères du factoriel, l'effectif utilisé pour la cartographie est insuffisant pour la détection de QTL. La localisation des QTL sur les cartes est représentée sur la figure 9.

### **a. Chez la mère 14-144**

Tout caractère et tout âge confondus, on met en évidence 35 QTL, répartis sur les groupes de liaison (GL) 2, 3, 5, 6, 10 et 11 (cf. tableau 9). 25 QTL sont détectés au seuil de LOD 2.

Sur le GL 2, un QTL de vigueur à 38 mois (volume), et un QTL de décroissance métrique à 27 mois sont mis en évidence au niveau du marqueur K16-860.

Le marqueur N11-197 est lié à un QTL de décroissance métrique à 27 mois, également mis en évidence par l'analyse de variance au seuil de 5%. Le marqueur I14-1340 est lié à des QTL de vigueur à 38 mois. Ce marqueur est à 14,8 cM du marqueur L05-750, lié à des QTL de vigueur au même âge par analyse de variance au seuil de 5%. Le pourcentage de variation phénotypique expliqué par ces QTL est compris entre 4,8 et 5,7%.

Sur le GL3, l'IM permet la mise en évidence de 2 QTL, liés au marqueur X07-1200. Un QTL de pilodyn et un QTL de décroissance métrique à 14 mois. Les pourcentages de variation expliqués par ces QTL sont de 13 et 6,9 % respectivement.

Sur le GL5, des QTL de circonférence et volume à 27, 38 et 67 mois sont lié étroitement au marqueur K12-701. Ces QTL expliquent de 4,6 à 6 % de la variation phénotypique, au seuil de LOD de 2,5. L'analyse de variance montrait un effet de ce marqueur pour les caractères de vigueur à 27, 38 et 67 mois( aux seuils de 0,5 et 0,05%).

Sur le GL6, six QTL de vigueur sont mis en évidence à trois âges (27, 38 et 67 mois), localisés au niveau du marqueur B08-1636. Les pourcentages de variation phénotypique expliqués par ces derniers varient entre 5,3 et 9,4%.

Le marqueur K16-474 (GL 10), lié à la circonférence et au volume à 67 mois ainsi qu'au pilodyn à 38 mois par analyse de variance (significatif au seuil 0,5%), est aussi lié à des QTL de circonférence et volume à 67 mois (LOD score de 5,3 en moyenne).

Sur le GL11, 4 QTL de pilodyn à 14 et 38 mois sont mis en évidence au niveau des marqueurs I14-1380 et N07-735, avec un LOD score variant de 2,4 à 6,3. Ces deux marqueurs sont à 30 cM du marqueur X19-562, lié par analyse de variance à des QTL de pilodyn à 38 mois (au seuil de 5%). Le pourcentage de variation phénotypique expliqué par ces deux QTL sont compris entre 7,3 et 23,6%. Le marqueur N07-735 est également lié à un QTL de décroissance métrique à 38 mois, avec un LOD score de 2. Ce QTL explique 6,1% de la variation phénotypique observée.

Il semblerait que l'on puisse confirmer la présence au niveau de ce marqueur d'un locus impliqué dans le contrôle de ces caractères à l'âge de 67 mois pour les caractères de vigueur

Tableau 10 : Mise en évidence de QTL par cartographie d'intervalle pour les caractères de hauteur (H), de circonférence (C), de volume (V), de décroissance métrique (DM) et de pilodyne (pil) à différents âges (1, 14, 27, 38, et 67 mois) chez *E. urophylla* 14-128.

Caractères	Groupe de liaison	Intervalle	Position (cM)	LOD max	% variation
H1	1	2-3	0	1,8	6.2
H14	1	2-3	0	1.7	5.9
H14	1	4-5	0	1.7	5.9
H27	1	4-5	0	2.6	9.3
H38	1	4-5	0	1.7	6
H38	4	8-9	32	1.8	9.1
pyl38	6	15-16	0	1.6	9.5

et de 38 mois pour la densité de bois. Ce locus est vraisemblablement stable dans les différents croisements mettant en jeu le géniteur 14-144.

#### **b. Chez la mère 14-128**

Un seul QTL a pu être mis en évidence au seuil de LOD de 2 (cf. tableau 10). Celui-ci est sur le GL1, lié au marqueur K10-528. Il explique 9,3% de la variation en hauteur à 27 mois.

6 QTL supplémentaires ont pu être mis en évidence par IM au seuil de LOD de 1,6, dont 4 sont sur le GL1 et les deux autres sur les groupes 4 et 6.

Sur le GL1, deux QTL de la hauteur à 1 et 14 mois sont liés au marqueur M12-890, au LOD de 1,7. Ils expliquent environ 6% de la variation phénotypique. Le marqueur K10-528 est lié à des QTL de hauteur à 14 et 38 mois avec un LOD de 1,7. Ils expliquent environ 6% de la variation phénotypique. Par analyse de variance, les marqueurs Z06-925 (à 10 cM de M12-890 et de K10-528) et M05-527 (à 18 cM de M12-890) sont liés à des QTL de hauteur aux mêmes âges au seuil de 5 et 0,5%.

Sur le GL4, un QTL de la hauteur à 38 mois a été détecté au seuil de LOD de 1,8 au niveau du marqueur R15-671. Il explique 9% de la variation phénotypique. Sur ce même marqueur, l'analyse de variance a mis en évidence des QTL de hauteur et décroissance métrique à 67 et 38 mois (seuil de 5%).

Sur le GL6, un QTL de pilodyn à 38 mois a pu être mis en évidence avec un LOD de 1,6. Ce QTL explique 9,5% de la variation phénotypique.

Un QTL, impliqué dans la variation de la hauteur des arbres à 1 et 14 mois, est détecté non à 10 cM environ du marqueur Z03-925, où l'analyse de variance a mis en évidence un QTL impliqué dans le contrôle de la hauteur des arbres de 1 à 27 mois, mais aussi du volume à 14 mois et de la forme du tronc des arbres de 14 à 38 mois. Par interval Mapping, on estime que le QTL détecté explique environ 6% de la variation en hauteur de l'arbre. On ne peut conclure quant à la présence d'un seul et même locus à cet endroit du génome, contrôlant le caractère de hauteur, mais il semblerait que la participation de cette région dans le déterminisme du caractère soit d'une part stable pour les croisements impliquant cette mère, et transitoire d'autre part au cours du développement des arbres.

On remarque également que le QTL détecté par Interval Mapping proche du marqueur R15-671 coïncide à peu près avec un QTL mis en évidence avec l'analyse de variance, tous deux étant impliqués dans le contrôle de la hauteur de l'arbre, le premier pour à 38 mois et le second pour 67 mois. Ce QTL paraît stable dans les 3 croisements envisagés.



## DISCUSSION

### I. La technique RAPD : des avantages et des inconvénients

Cette technique est relativement simple, rapide (uniquement basée sur la technique PCR), facile à automatiser, peu onéreuse. Ce marquage moléculaire présente l'avantage de fournir un nombre relativement important de marqueurs (environ 8 fragments polymorphes par amorce).

La répétabilité de la méthode RAPD est souvent sujette à polémique (Meunier *et al.*, 1993), de même que l'identité des fragments amplifiés. En effet, Rabouam *et al.*, (1999) ont montré que les fragments RAPD, amplifiés à partir de l'ADN total d'un nématode, étaient dans 50 à 75% des cas un mélange de bandes artéfactuelles. Ces bandes seraient produites pendant l'amplification PCR, par réarrangement des brins d'ADN.

Dans le cas des *Eucalyptus*, les marqueurs spécifiques du géniteur *E. urophylla* 14-144 ont été développés au laboratoire de l'INRA de Bordeaux entre 1992 et 1996. Leurs ségrégations dans les différentes familles de notre étude montrent que le génotype des marqueurs est identique à la première étude, ce qui confirme la répétabilité de la technique RAPD et l'authenticité des fragments amplifiés.

L'inconvénient majeur de cette technique pour ce type d'étude réside dans la nature des marqueurs générés (marqueurs dominants). Seulement deux phénotypes au marqueur peuvent être observés (présence ou absence de bande). L'observation de la ségrégation du marqueur dans une descendance permet de trancher entre les deux génotypes 1/1 et 1/0 pour la présence de bande. Cependant, l'absence de bande correspond à un génotype 0/0, sans distinction possible entre ces deux allèles. Comme on a pu le démontrer précédemment, une partie importante de l'information contenue par la ségrégation des allèles récessifs est perdue.

Une méthode alternative au marquage RAPD capable de palier au manque de distinction des différentes formes alléliques serait le marquage par marqueurs microsatellites, qui sont codominants et spécifiques. Cette spécificité inclut néanmoins une diminution du nombre de marqueurs polymorphes par amorce (un marqueur par amorce). De plus, cette technique est plus lourde et plus coûteuse.

Dans nos résultats, il semble qu'un grand nombre de marqueurs RAPD soit spécifique de chaque espèce. Pour 30 marqueurs étudiés chez *E. urophylla*, 83% sont effectivement spécifiques aux géniteurs de l'espèce. Ceci est moins vrai pour les géniteurs *E. grandis*, pour lesquels seulement 40% sont spécifiques.



## **II. La détection de QTL**

### **1. Comparaison des deux méthodes de détection**

L'analyse de variance met en évidence un effet significatif pour de nombreux marqueurs (plus de la moitié des liaisons marqueur-QTL sont significatives au seuil de 5%).

Les paramètres influençant la détection de QTL peuvent être liés au seuil de risque que l'on s'impose, de l'effectif, de l'effet additif du QTL pour un effectif fixe, et de la variance intra-classe (qui dépend de l'environnement, des autres QTL en ségrégation dans le génome et de la distance marqueur-QTL).

**Le seuil** de rejet de l'hypothèse nulle « pas d'effet du marqueur » au risque  $\alpha$  de 5% (risque de rejeter l'hypothèse nulle alors qu'elle est vraie) est peut-être trop élevé. Ceci nous a peut-être conduit à détecter de faux QTL. En effet, la méthode d'IM avec un LOD de 2 met en évidence moins de QTL que la méthode d'analyse de variance.

**L'effectif** peut avoir un effet sur la détection de QTL, dans la mesure où des QTL détectés sur des descendance à effectifs modestes peuvent avoir un effet largement surestimés (Beavis *et al.*, 1994). La détection de QTL dans cette étude concerne environ 200 individus en moyenne, pour les deux méthodes employées, ce qui semble représenter un effectif suffisant pour les espèces forestières.

**Variance intra-classe** : la détection de QTL par analyse de variance peut être biaisé par un effet d'échantillonnage. Plus une population a un effectif réduit, plus il est probable qu'un allèle à un locus soit plus représenté que l'autre. Malgré le fait que, pour chaque marqueur, la ségrégation dans les proportions mendéliennes ait été vérifiée dans chaque famille, il se peut qu'après correction des données (suppression de certains individus), la proportion des individus 1/0 et 0/0 ne soit plus équilibrée.

L'intérêt de l'analyse de variance comme méthode de détection est sa simplicité d'utilisation. Les modèles de décomposition des valeurs phénotypiques individuelles peuvent mettre en évidence l'effet d'un marqueur, en considérant différents niveaux du plan factoriel d'une part et en tenant compte de différents de facteurs et cofacteurs. Ces analyses sont robustes aux écarts à la normalité des populations. Toutefois, l'efficacité de l'analyse dépend fortement de la densité de marquage.

L'Interval Mapping est une méthode qui permet de localiser les QTL de façon plus précise car elle tient compte des pourcentages de recombinaisons entre marqueurs et QTL. Sa principale limite réside dans le fait que deux QTL proches sur le génome pourront être détectés comme un seul QTL, localisé entre les deux.





La comparaison de la puissance de détection de l'une et l'autre méthode indique que la méthode dite d'« Interval Mapping » n'est pas supérieure à l'analyse de variance pour des intervalles inférieurs à 20cM. Au delà, l'avantage de la cartographie d'intervalle augmente très vite (Rebaï *et al.*, 1995).

## **2. La stabilité des QTL**

Quatre types de résultats ont pu être obtenus au travers de cette étude :

- certains QTL ne sont apparemment pas stables ;
- certains QTL d'un caractère particulier ont un effet sur un autre caractère dans d'autres fonds génétiques ;
- d'autres QTL semblent contrôler le même caractère mais à un âge différent ;
- enfin, des QTL semblent stables ( mêmes caractères et mêmes âges).

### **a. Stabilité des QTL détectés chez un géniteur pour différentes descendances**

Malgré un fond génétique hétérogène (un géniteur est croisé avec 4 parents différents), la mise en évidence de QTL a été possible, ce qui constitue la première constatation de stabilité des QTL.

Dans le cas de la mère 14-144, de nombreux QTL sont stables, ces résultats sont probablement liés à la qualité de ce géniteur. On peut penser que ce géniteur utilisé en croisement avec d'autres *E. grandis* fournira de bonnes familles hybrides.

Nous avons pu mettre en évidence des régions contrôlant les mêmes caractères dans le plan factoriel et dans le croisement élite. Seul l'âge des caractères contrôlés peut changer d'une étude à l'autre. L'effet de l'âge sur l'expression des QTL a déjà été étudié par Verhaegen *et al.* (1997) mais également par Emebiri *et al.* (1998). Ils ont montré que l'expression des QTL dans le temps variait selon trois modalités : une expression de moins en moins significative, une expression de plus en plus significative et une expression curviligne des QTL pendant la maturation des individus.

Certains caractères comme la décroissance métrique ne sont pas détectés au même âge dans l'étude du plan et l'étude du croisement élite. On peut émettre l'hypothèse que les gènes sous-jacents à ces QTL, impliqués dans la variation d'un même caractère, codent pour un produit identique (gènes de structure), mais sont soumis à des régulations dans le temps différentes en fonction des fonds génétiques, ce qui expliquerait qu'ils ne soient pas détectés aux mêmes âges.

### **b. Stabilité des QTL entre les différents géniteurs d'*Eucalyptus*.**

Premièrement, parmi les quatre géniteurs de chaque espèce étudiée, des régions identiques du génome ont pu être détectées comme liées à la variation d'un caractère



quantitatif. Seule la nature du caractère contrôlé change d'un fond génétique à l'autre. Cet effet pléiotropique explique en partie les faibles corrélations génétiques entre certains caractères (vigueur et de pylodin).

Deuxièmement, nous avons mis en évidence l'existence de QTL impliqués dans la variation des mêmes caractères, mais à des âges différents. La régulation de l'expression de ces QTL dans le temps est vraisemblablement nuancée par le biais de facteurs de régulations. Il se peut également que ces QTL soient assimilables à des gènes de régulations dont la régulation (en *cis*) n'a pas la même cible en fonction du fond génétique.

Enfin, des QTL stables dans les divers fonds génétiques étudiés ont pu être mis en évidence, et sont impliqués dans la variation des caractères aux mêmes âges. L'expression de certains QTL semble transitoire à une période de développement, cette période restant significative dans différents fonds génétiques.

Notre attention a été attirée essentiellement par des marqueurs comme K12-701 (le séquençage de ce fragment a été entrepris, dans la perspective de confronter sa séquence avec les banques de gènes). Il est lié à des QTL communs aux deux mères (14-136 et 14-144) pour les caractères de vigueur, aux mêmes âges. L'effet du QTL peut être particulièrement fort dans certaines familles issues du croisement de ces deux mères avec les pères 9-37 et 9-40. L'allèle « absence de bande » paraît favorable aux caractères, mis à part dans la famille 21 (14-128 x 9-37) où c'est l'allèle « présence de bande » qui paraît favorable. L'effet du QTL peut être particulièrement fort dans certaines familles, et l'allèle favorable au caractère est tantôt la présence de bande, tantôt l'absence. Ceci laisse penser qu'il y a plusieurs allèles à ce locus dans les différentes populations étudiées, dont les interactions sont variables. Les allèles qui se cachent sous l'absence du marqueur RAPD sont tantôt favorables tantôt défavorable au caractère par rapport à l'allèle « présence de bande ». Des marqueurs codominant permettraient d'investir les populations et de mettre en évidence les allèles les plus favorables au caractère. Ils sont d'autant plus justifiés pour les études de croisements interspécifiques que ces derniers génèrent beaucoup d'interactions intralocus.



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La première conclusion que l'on peut déduire de cette étude est que la Sélection Assistée par Marqueur est tout à fait envisageable dans le cas d'une famille interspécifique. Il suffit pour cela de cartographier les marqueurs liés à des QTL pour des caractères d'intérêt. Il est possible, par différentes méthodes statistiques de mettre en évidence ces liaisons tout en tenant compte d'un certains nombres de paramètres, tels que les interactions intra et interlocus. Chez les arbres forestiers, la corrélation des caractères entre l'état juvénile et l'état adulte est faible. Même si on ne peut pas mettre en évidence de liaisons marqueur-QTL significative à tous les âges, cela ne représentent pas une barrière pour la mise en œuvre de la SAM. En effet, le caractère lié à un marqueur est constamment associé à celui-ci au cours du développement. Un QTL détecté à un âge tardif pourra tout de même faire l'objet d'une sélection précoce (Emebiri *et al.*, 1998).

En ce qui concerne les aspects de stabilité des QTL dans différents fonds génétiques, cette étude pourrait être étendue à d'autres géniteurs, afin de valider certains résultats. En effet, la relative stabilité des liaisons marqueur-QTL montre que les loci semblent être conservés dans plusieurs fonds génétiques. Les allèles au locus peuvent être différents (QTL multiallèlique). Ces différences se traduisent par une magnitude plus ou moins importante de l'effet de l'allèle. Des marqueurs codominants seraient plus appropriés à ce genre d'étude.

Il aurait été intéressant d'étudier l'effet du cumul des allèles favorables au caractère par un régression linéaire entre le nombre d'allèles favorables et le caractère à différents âges. Par ce type de régression, on aurait pu mettre en évidence des QTL à effet trop faible pour pouvoir être détecter par une analyse marqueur par marqueur ou par Interval Mapping.



## Références

- Andrianirina G., Bouillet J.P., Bouvet J.M., Rakotovao G., Rasimindisa A. (1991). Place de l'Eucalyptus à Madagascar. In the proceedings of the IUFRO Conference ; Intensive Forestry the role of Eucalypts. Durban, South Africa 2-6 september 1991 : 1082-1091
- Bahrman N., Damerval C. (1989). Linkage relationships of loci controlling protein amounts in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Heredity* 63 : 267-274
- Beavis W.D., Smith O.S., Grant D., Fincher R. (1994). Identification of quantitative trait loci using a small sample of topcrossed and F4 progeny from maize. *Crop Sci.*, 34 : 882-896.
- Bouvet J.M. (1991). Geno-phenotypic regression and juvenile mature correlations: methodological tools for clonal selection of Eucalyptus hybrids in Congo. *In*: IUFRO Symp "Intensive Forestry: the role of Eucalypts" Durban, South Africa : 13-18
- Bouvet J.M. (1998). Les plantations d'Eucalyptus, évolutions récentes et perspectives. UR2PI. Rapport interne CIRAD-Forêt 30 p
- Bradshaw H.D., Stettler R.F. (1995). Molecular genetics of growth and development in *Populus*. IV. Mapping QTLs with large effects on growth, form and phenology traits in a forest tree. *Genetics* 139 : 963-973
- Bradshaw H.D., Villar M., Watson B.D., Otto K.G., Stewart S., Stettler R.F. (1994). Molecular genetics of growth and development in *Populus*. III. A genetic linkage map of a hybrid poplar composed of RFLP, STS, and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 89 : 167-178
- Brondani R.P.V., Brondani C., Tarchini R., Grattapaglia D. (1998). Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theor. Appl. Genet.* 97 : 816-827
- Brown A.H.D. (1979). Enzyme polymorphism in plant populations. *Theor. Popul. Biol.* 15 : 1-41
- Byrne M., Murrell J.C., Owen J.V., Kriedemann P., Williams E.R., Moran G.F. (1997). Identification and mode of action of quantitative trait loci affecting seedling height and leaf area in *Eucalyptus nitens*. *Theor. Appl. Genet.* 94 : 674-681
- Byrne M., Murrell J.C., Allen B., Moran G.F. (1995). An integrated genetic linkage map for eucalypts using RFLP, RAPD and isozyme markers. *Theor. Appl. Genet.* 91 : 869-875





Charcosset A. (1996). L'identification de locus affectant des caractères quantitatifs (QTL). *Le Selectionneur Français* 46 : 35-45

Dale G., Chaparro J. (1996). Integration of molecular markers into tree breeding and improvement programs. *In Tree Improvement for Sustainable Tropical Forestry. Proc. QFRI-IUFRO Conf.*, Caloundra, Queensland, Australia.

Danjon F. (1994). Heritabilities and genetic correlations for estimated growth curve parameters in maritime pine. *Theor. Appl. Genet.* 89 : 911-921

Doyle J.J., Doyle J.L. (1990). Isolation of DNA from fresh plant tissue. *Focus* 12: 13--15

Edwards M.D., Stuber C.W., Wendel J.F. (1987). Molecular marker-facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution and types of gene action. *Genetics* 116 : 113-125

Eldridge K., Davidson J., Hardwood C., Van Wyk G. (1993). Eucalyptus domestication and Breeding. *Clarendon Press*. Oxford. 288 p.

Emeberi L.C., Devey M.E., Matheson A.C., Slee M.U. (1998). Age-related changes in the expression of QTLs for growth in radiata pine seedlings. *Theor. Appl. Genet.* 97 : 1053-1061.

Fisher (1918). The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Trans Roy Soc Edin* 52 : 399-433.

Gallais A. (1989). Théorie de la sélection en amélioration des plantes. *Masson Ed.* 598 p

Gallais A., Bannerot H. (1991). Amélioration des espèces végétales cultivées. *INRA Ed.* 759p

Geldermann H. (1975). Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. methods. *Theor. Appl. Genet.* 46 : 319-330

Grattapaglia D., Sederoff R. (1994). Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137 : 1121-1137

Grattapaglia D., Bertolucci F.L.G., Penchel R., Sederoff R. (1996). Genetic mapping of quantitative trait loci controlling growth and wood quality traits in *Eucalyptus grandis* using a maternal half-sib family and RAPD markers. *Genetics* (sous presse)



Groover A., Devey M., Fiddler T., Lee J., Megraw R., Mitchel-Olds T., Sherman B., Vujcic S., Williams C., Neale D. (1994). Identification of quantitative trait loci influencing wood specific gravity in an outbred pedigree of loblolly pine. *Genetics* 138 : 1293-1300

Jones C.J., Edwards K.J., Castaglione S., Winfield M.O., Sala F., van de Wiel C., Bedemeijer G., Vosman B., Matthes M., Daly A., Brettschneider R., Bettini P., Buiatti M., Maestri E., Malcevski A., Marmioli N., Aert R., Volckaert G., Rueda J., Linacero R., Vazquez A. and Karp A. (1997). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plant by a network of European Laboratories. *Mol. Breed.* 3 : 381-390

Kosambi D.D. (1944). The estimation of map distance from recombination values. *Ann. Eugen.* 12 : 172-175

Kremer A. (1994). Diversité génétique et variabilité des caractères phénotypiques chez les arbres forestiers. *Genet. Sel. Evol.* 26, 105-123

Lander E.S., Botstein D. (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121 : 185-199

Lander E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J., Lincoln S.E., Newburg L. (1987). MAPMAKER : an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1 : 174-181

Lefort-Buson M., Rodolphe F., Charcosset A. (1990). De nouvelles perspectives pour l'analyse génétique des caractères quantitatifs (1ère partie). *Biofutur juin 1990*

Lefort-Buson M., Rodolphe F., Charcosset A. (1990). De nouvelles perspectives pour l'analyse génétique des caractères quantitatifs (2ème partie). *Biofutur juillet/aout 1990*

Lincoln S.E., Lander E.S. (1990). Mapping genes for quantitative traits using MAPMAKER/QTL. A Whitehead Institute for Biomedical Research Technical Report, Cambridge, Massachusetts

Marques C.M., Araujo J.A., Ferreira J.G., Whetten R., O'Malley D.M., Liu B.H., Sederoff R. (1998). AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. *Theor. Appl. Genet.* 96: 727--737

Martin B., Quillet G. (1974). Bouturage des arbres forestiers au Congo : résultats des essais effectués à Pointe-Noire de 1969 à 1973. *Bois et Forêt des tropiques* 157: 41-57



- McKeand S.E. (1988). Optimum age for family selection for growth in genetic tests of loblolly pine. *For. Sci.* 34 : 400-411
- Pandey D. (1997). Hardwood plantations in the tropics and subtropics. Tropical forest plantations area 1995. Rapport interne de la FAO. 76 p
- Paterson A.H., Lander E.S., Hewitt J.D., Peterson S., Lincoln S.E., Tanksley S.D. (1988). Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335 : 721-726
- Plomion C., Bahrman N., Durel C.E., O'Malley D. (1995). Genomic analysis in *Pinus pinaster* (Maritime pine) using RAPD and protein markers. *Heredity* 74 : 661-668
- Plomion C., Durel C-E. et Verhaegen D. (1996). Utilisation des marqueurs moléculaires dans les programmes d'amélioration génétique des arbres forestiers : exemple du pin maritime et de l'eucalyptus. *Ann. Sci. For.* 53 : 819-848.
- Pryor L.D. (1976). The biology of eucalypts. Arnold, London
- Rabouam C., Comes A.M., Bretagnolle V., Humbert J.F., Periquet G., Bigot Y. (1999). Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. *Molecular Ecology* 8 : 493-503
- Rebaï A., Goffinet B., Mangin B. (1995). Comparing power of different methods for QTL detection. *Biometrics* 51 : 87-99.
- Sax K. (1923). The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8 : 552-560
- Tanksley S.D. (1993). Mapping polygenes. *Ann. Rev. Genet.* 27 : 205-233
- Teulières C., Marque C., Boudet A.M. (1994). Genetic transformation of *Eucalyptus*. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 29. Plant Protoplasts and Genetic Engineering (ed. by YPS Bajaj). Springer Verlag, Berlin : 289-307
- Verhaegen D., Plomion C. (1996). Genetic mapping in *Eucalyptus urophylla* and *E. grandis* using RAPD markers. *Genome* 39 : 1051-1061
- Verhaegen D., Plomion C., Gion J.M., Poitel M., Costa P., Kremer A. (1997). Quantitative trait dissection analysis in *Eucalyptus* using RAPD markers : 1. Detection of QTL in interspecific hybrid progeny, stability of QTL expression across different ages. *Theor. Appl. Genet.* 95: 597-608



Verhaegen D., Plomion C., Poitel M., Costa P., Kremer A. (1998). Quantitative trait dissection analysis in *Eucalyptus* using RAPD markers : 2 Linkage disequilibrium in a factorial design between *E. urophylla* and *E. grandis*. *Forest Genetics* 5 : 61-69

Vigneron P. (1988). Les hybrides artificiels d'Eucalyptus au Congo : création et multiplication. Contribution à la réunion IUFRO de Pattaya, Thaïlande.

Vigneron P. (1991). Création et amélioration de variétés d'hybrides d'Eucalyptus au Congo. *In*: IUFRO Symp "Intensive Forestry : the role of Eucalyptus" Durban, South Africa, 345-360

Vigneron P., Bouvet J.M. (1997). Amélioration des plantes tropicales ; les eucalyptus. *Editions CIRAD* 265-288

Williams J.E., Brooker M.I.H. (1997). Eucalypts : an introduction. In *Eucalypt ecology, individuals to ecosystem*. Edited by Williams J.E. and Woinarsky J.C.Z., Cambridge University Press : 1-13.





## ANNEXE 1

### **Protocole d'extraction d'ADN de Doyle et Doyle (1989) adapté**

Les feuilles sont dans un premier temps découpées en carré de 2-3 cm<sup>2</sup> et sont broyées dans des microtubes de 2 ml en présence de sables de fontainebleau, d'azote liquide et de 400 µl de tampon d'extraction à 0.2 % de 2-mercaptoéthanol ( voir fiche technique n°1). Le broyage est alors effectué à l'aide d'un potter plastique jusqu'à obtenir une pâte homogène. 800 µl de tampon d'extraction sont ajoutés et mélangés. Le mélange est incubé pendant 1H à 55°C sous agitation douce. Les tubes sont refroidis sur la pailleasse pendant 10 min. On ajoute 400 µl de dichlorométhane pour dénaturer les protéines et on agite doucement jusqu'à obtenir une émulsion. Les tubes sont alors centrifugés pendant 10 minutes à 13000 rpm (4°C). La phase supérieure est prélevée en évitant de prélever l'interphase, où s'agglomèrent les protéines. Lorsque l'épiphase n'est pas claire, alors cette étape au dichlorométhane est répétée. Ensuite, on ajoute 400 µl d'isopropanol froid et on mélange lentement. On peut alors observer la formation d'une pelote d'ADN, sinon on laisse le tube à -20°C pendant une heure.

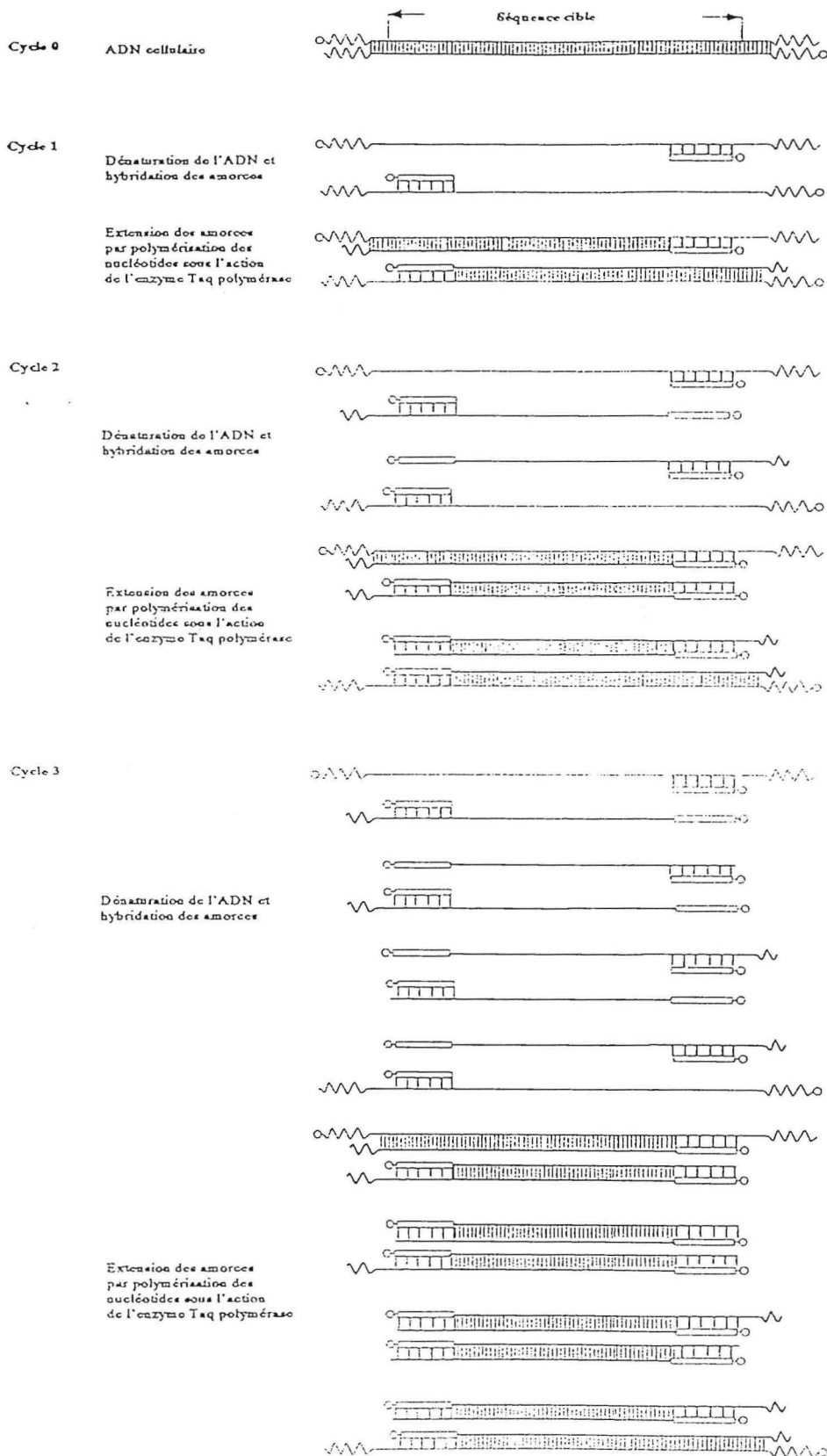
Les tubes sont alors centrifugés pendant 10 minutes à 13000 rpm à 4°C afin de précipiter l'ADN. On élimine le surnageant et les tubes sont laissés à sécher sur la pailleasse pendant 15 minutes sur papier filtre.

Pour rincer l'ADN ainsi récupéré, on ajoute 1 ml d'éthanol 76%, on vortexe et on centrifuge 10 minutes à 13000 rpm à 4°C. On élimine le surnageant délicatement et le culot est séché au speed-vac pendant 15 minutes à température ambiante.

L'ADN est repris dans 100 µl d'eau et constitue l'ADN stock.



Annexe 2 : Schéma de la réaction d'amplification d'une séquence d'ADN cible par la technique RAPD à partir d'amorces de 10 nucléotides. En fin de réaction, le nombre de fragments de taille identique (encadré par deux amorces) est beaucoup plus important que celui des fragments partiellement finis





## ANNEXE 3

### Composition des Tampons

#### Tampon d'extraction pour 1L :

Tris Hcl 1M pH 8 (tamponne la solution)	100 ml
EDTA 0.5M pH8 (inhibe la dégradation de l'ADN, en chélatant les ions Mg <sup>2+</sup> , cofacteur des ADNases)	40 ml
ATMAB (Complexe les polysaccharides et les protéines)	20 g
NaCl 5M (évite les interactions ADN-protéines)	280 ml
H <sub>2</sub> O qsp.	1000 ml

*Le tampon est autoclavé, puis sont ajoutés 0.1% de Mercaptoéthanol et 1% de PVP (PolyVinylPyrrolidone). Conservation à 4 °C.*

#### Tampon PCR 2X :

dNTP 5mM	40 ul
BSA 20 mg.ml <sup>-1</sup>	20 ul
Détergent W1 Gibco BRL®	50 ul
Tampon 10X	200 ul
H <sub>2</sub> O dd qsp	1000 ul

*Conservation à -20 °C.*

#### Tampon 10X pour 10 ml :

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1M	1.66 ml
Tris HCl pH8 1M	6.70 ml
MgCl <sub>2</sub> 1M	200 ul
Mercaptoéthanol	0.7%
H <sub>2</sub> O qsp.	1.37 ml

*Autoclaver puis conserver à -20 °C.*

#### Tampon de migration TBE 10X pour 1L :

Tris 121.1 g.mol <sup>-1</sup>	108 g
Acide Borique 61.83 g.mol <sup>-1</sup>	55 g
EDTA pH8 0.5M	40 ml
H <sub>2</sub> O qsp. 1L	

*Le pH final est ajusté à 8.3, puis le tampon est autoclavé. Conservation à -20 °C.*

#### Bleu de charge pour 50ml :

Bleu de bromophénol	125 mg
EDTA Na <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O 0.5M pH8	5 ml
TBE 10X 1M pH8.3	2.5 ml
SDS	1 ml
H <sub>2</sub> O distillée	1.5 ml

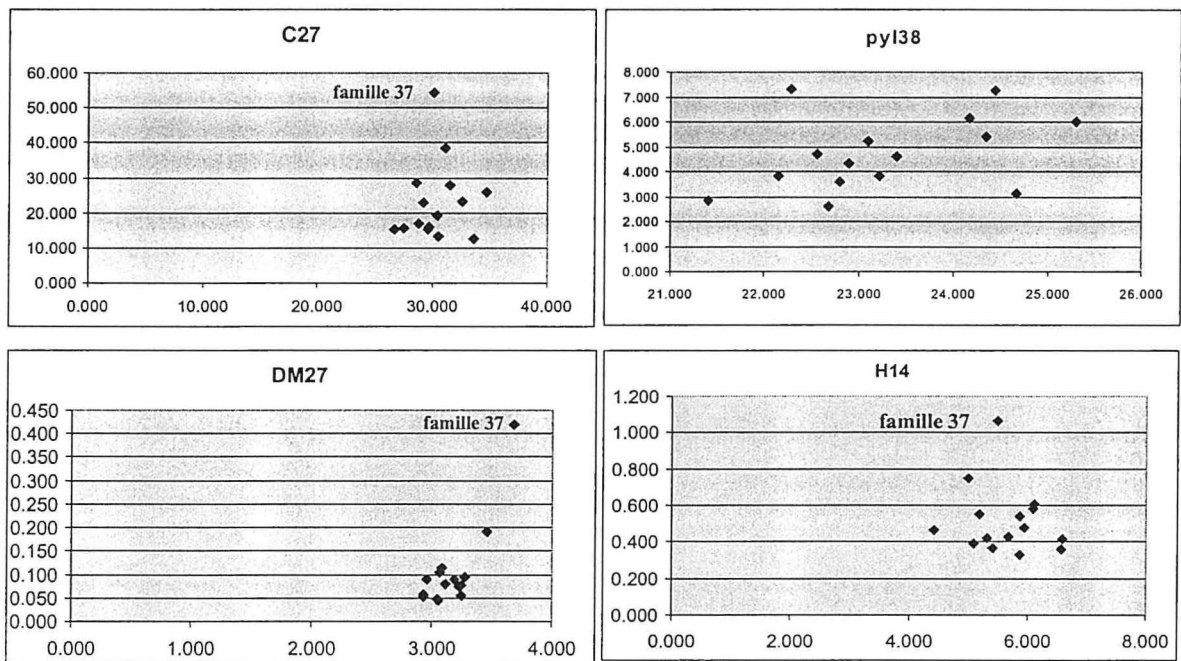
*Utilisation : arrêt enzymatique et agent porteur*

*Conservation : 4 °C*



## ANNEXE 4

Représentation de la variance intra-famille des caractères de circonférence à 27 mois (C27), de pylodine à 38 mois (pyl38), de décroissance métrique à 27 mois (DM27) et de hauteur à 14 mois (H14) par rapport à la moyenne du caractère dans la famille, pour chacune des familles (♦) du plan factoriel.







**MORIN Elisabeth, 1999. Etude de la stabilité des liaisons marqueur-QTL à partir d'un plan factoriel 4x4, *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*.**

Laboratoire de Génétique et Amélioration des Arbres Forestiers du CIRAD-Forêt – Campus Internationale de Baillarguet – BP 5035-34032 Montpellier.

---

Dans le cadre d'un programme d'amélioration génétique développé par le CIRAD forêt, des recherches ont été engagées pour mieux connaître la structure et l'organisation du génome d'*Eucalyptus*. A l'aide de marqueurs RAPD, les cartes génétiques de deux parents d'un croisement spécifique *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* ont été réalisées. Cette étude a eu pour but d'étudier la stabilité des QTL mis en évidence dans ce croisement interspécifique d'*Eucalyptus* dans un plan factoriel complet 4x4 (*E. urophylla* x *E. grandis*). Au total, 180 RAPD marqueurs ont été génotypés sur les 16 familles de plein-frères (944 individus environ). Les profils obtenus ont été confrontés avec des données agronomiques portant sur des critères de formes, de croissance et de densité du bois. Les techniques statistiques utilisées pour mettre en évidence les liaisons marqueur-QTL sont l'analyse de variance réalisée par le logiciel SAS et l'Interval Mapping. L'analyse des résultats a mis en évidence quatre types de QTL : des QTL qui n'étaient pas stables dans les divers fonds génétiques étudiés, des QTL stables mais contrôlant des caractères de nature différente (pylodin ou vigueur), des QTL contrôlant les mêmes caractères mais à des âges différents, et enfin, des QTL qui contrôlent des caractères de même nature et aux mêmes âges.

**Mots-clé :** *Eucalyptus*, QTL, stabilité dans différents fonds génétiques.

---

**MORIN Elisabeth, 1999. Stability of linkage between markers and QTL in a factorial mating design 4x4 : *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*.**

Laboratoire de Génétique et Amélioration des Arbres Forestiers du CIRAD-Forêt – Campus Internationale de Baillarguet – BP 5035-34032 Montpellier.

---

Previous work reported the localisation of QTL on *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis* linkage maps for growth and wood density with RAPD markers, using a specific cross *E. urophylla* x *E. grandis*. The aim of this study is to find out whether linkages between QTL and markers detected in this interspecific family for form, growth and wood density are stables in different genetic backgrounds. This investigation has been carried out in a factorial mating design 4x4 (4 *E. urophylla* used as female parent and 4 *E. grandis* used as male parent). A total of 180 markers were genotyped on 16 interspecific full-sib progenies (a total of 944 hybrids). The linkage between QTL and RAPD markers have been underlined by the ANOVA displayed by SAS program (*glm* procedure) and Interval Mapping. The analysis of the results shows that QTL could be range in four classes : QTL not stable in different genetic backgrounds, QTL which may control different characters, QTL which control the same characters, but at a different periods of maturation and finally, QTL which control the same characters at the same period of individual development.

**Key words :** *Eucalyptus*, QTL, stability in different genetic backgrounds.

---