

Développement de marqueurs moléculaires chez le Ray-grass anglais pour une meilleure évaluation et utilisation des ressources génétiques.

Séminaire “Ressources génétiques, qualité des
semences et innovations variétales”

CTPS - 23 Nov. 2012

Projet

- CB 45 2006-2008
- Budget 132 000 € (dont 18 mois en 2 CDD)
- ACVF
 - Sections graminées fourragères et à gazon conjointes
 - Entreprises:
 - Tourneur-Barenbrug Recherches (Connantre & Mas-Grenier)
 - DLF Trifolium (Les Alleuds)
 - GIE Grass (St-Sauvant)
 - R2N (Rodez & Montours)
 - Carneau Frères (Orchies)
 - Rega (Verneuil)
- URP3F/INRA Lusignan
- SICASOV
- FNAMS

Contexte

Le ray-grass anglais comme espèce modèle:

- 1^{ère} espèce commercialisée en France, en fourrage et en gazon;
- Une amélioration qui reste complexe:
 - Nature des caractères: pérennité, productivité primaire, valeur esthétique...
 - Reproduction allogame mais non maîtrisée:
 - ⇒ variétés synthétiques
 - ⇒ sélection massale et/ou familiale (polycross) à deux échelles:
 - Pépinière de plantes individualisées
 - Parcelle dense
 - sur plusieurs années
- Des interrogations sur la réalité du progrès génétique vis-à-vis des autres espèces/catalogues;
- Un retard pris sur le développement des outils moléculaires et leur application, encore limitée à des études, à bas débit, de:
 - diversité génétique (marqueurs AFLP);
 - cartographie génétique - recherche de QTLs (marqueurs microsatellites);

Objectifs

- Maîtriser un marquage moléculaire:
 - de type microsatellite (co-dominant)
 - robuste (répétable entre méthodes et labos)
 - à moyen débit (séquenceur, génotypage assisté par informatique)
 - pour caractériser la diversité génétique à l'échelle de populations/variétés
- Décrire la structuration génétique entre variétés fourragères et à gazon chez le ray-grass anglais;
- Évaluer conjointement le progrès génétique réalisé depuis les débuts de l'amélioration chez cette espèce

Matériel végétal:

- 61 variétés de ray-grass anglais diploïde:
 - 7 populations spontanées en Europe
 - 4 variétés d'utilisation mixte
 - 32 variétés à gazon
 - 18 variétés fourragères
- de précocité voisine,
- inscrites au Catalogue français entre 1965 et 2004,
- par 11 Obtenteurs en Europe

Cv name or country of origin	Year of first registration	Usage
Belgium		Population
French Brittany		Population
Centre of France		Population
Danemark		Population
Hungary		Population
Irish		Population
Ukraine		Population
<i>Verna</i>	1965	Turf
<i>Vigor</i>	1971	dual
<i>Belida</i>	1974	dual
<i>Perma</i>	1974	dual
<i>Game</i>	1974	Turf
<i>Manhattan</i>	1974	Turf
<i>Loretta</i>	1975	Turf
<i>Pennfine</i>	1976	Turf
<i>Donata</i>	1977	Forage
<i>Trani</i>	1977	Forage
<i>Bianca</i>	1979	Turf
<i>Idole</i>	1979	Turf
<i>Maprima</i>	1980	dual
<i>Score</i>	1980	Turf
<i>Rathlin</i>	1982	Forage
<i>Barclay</i>	1982	Turf
<i>Lisabelle</i>	1983	Turf
<i>Barlet</i>	1985	Forage
<i>Final</i>	1986	Turf
<i>Numan</i>	1986	Turf
<i>Pacage</i>	1988	Forage
<i>Repell</i>	1988	Turf
<i>Marathon</i>	1989	Turf
<i>Rambo</i>	1989	Turf
<i>Herbie</i>	1990	Forage
<i>Ohio</i>	1990	Forage
<i>Flor</i>	1990	Turf
<i>Appolo</i>	1992	Turf
<i>Sun</i>	1992	Turf
<i>Baccara</i>	1995	Turf
<i>Plaisir</i>	1995	Turf
<i>Verdi</i>	1995	Turf
<i>Cadans</i>	1996	Forage
<i>Clerpin</i>	1996	Forage
<i>Compliment</i>	1997	Forage
<i>Concerto</i>	1997	Turf
<i>Sourire</i>	1998	Turf
<i>Barnhem</i>	1999	Forage
<i>Greenfair</i>	1999	Turf
<i>Aberavon</i>	2000	Forage
<i>Brital</i>	2000	Forage
<i>Carrera</i>	2000	Forage
<i>Bargold</i>	2000	Turf
<i>Carnac</i>	2000	Turf
<i>Pradal</i>	2001	Forage
<i>Barlennium</i>	2001	Turf
<i>Carillon</i>	2002	Forage
<i>Cachemire</i>	2002	Turf
<i>Lactis</i>	2003	Forage
<i>Bardorado</i>	2003	Turf
<i>Greenflash</i>	2003	Turf
<i>Recital</i>	2003	Turf
<i>Argoal</i>	2004	Forage
<i>Transate</i>	2004	Turf

18 essais multiloceaux exploités de 2006 à 2008

- 6 en parcelle pour valeur en gazon
- 4 en parcelle pour valeur fourrage
- 2 en pépinière de plantes individualisées
- 2 en parcelle pour productivité grainière
- suivant le protocole d'étude des variétés par le GEVES

Base de données phénotypiques et traitement par:

- Analyse de variance (modèle mixte);
- Analyse en composantes principales;
- Régression sur l'année d'inscription
(après correction éventuelle de la précocité d'épiaison).



Marquage moléculaire

- Recensement bibliographique des ressources en marqueurs microsatellites cartographiés et à séquences des amorces publiques;
- Test d'amplification et de polymorphisme sur 197 marqueurs x 20 individus;
- Choix et portabilité de 43 marqueurs entre labos par méthode LiCor (INRA/Lusignan & DLF/Danemark) et méthode séquenceur ABI3000 (INRA/Clermont & R2N/Rodez);
- Extraction ADN et PCR de l'ensemble de la collection (2688 individus, 44 individus/variété) à INRA/Lusignan;
- Génotypage en multiplexage à INRA/Clermont sur ABI3000;
- Codage de 2629 individus (37 à 44 /variété) à 16 marqueurs, estimation des fréquences alléliques, analyse par *F-statistics*;
- Classification des variétés sur D^2 (fréquences alléliques): 2300 individus - 10 marqueurs et 107 allèles;
- Analyse en composantes principales sur une sélection de 13 allèles (8 marqueurs) à différenciation maximum;
- Analyse factorielle discriminante et consistance avec la classification globale;

Résultats

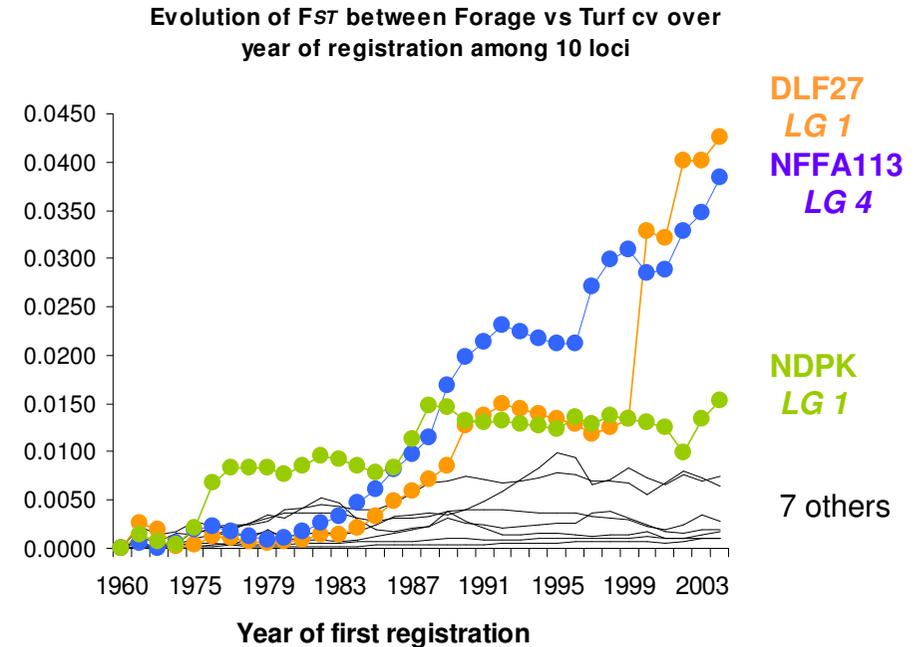
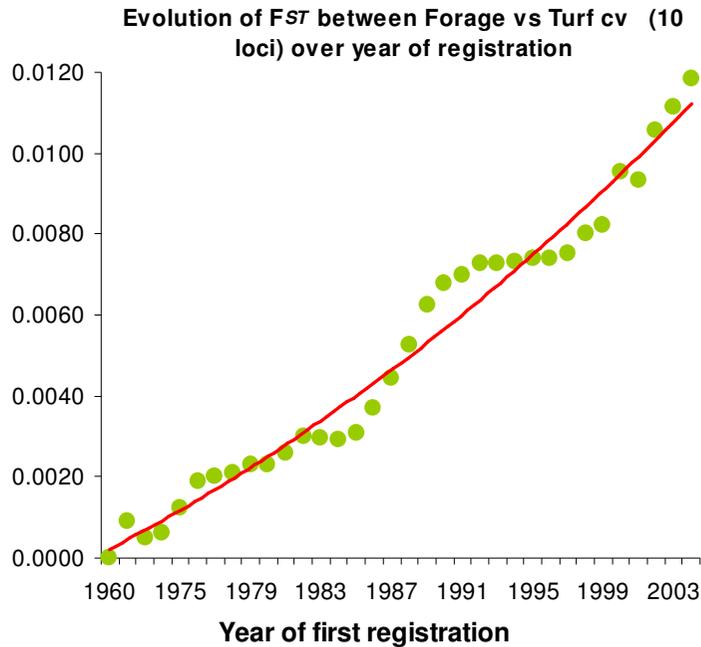
- Difficultés techniques du génotypage/codage:
 - Taux élevé de non-amplification PCR et d'homozygotes apparents
Microsatellites de régions non-codantes du génome
polymorphisme de séquence (SNP) élevé chez le ray-grass;
 - Forte structuration apparente intra-variétale (excès de génotypes homozygotes)
⇒ Etude du niveau inter-variétés et entre type fourrage vs gazon
- Classification robuste des 61 variétés et populations en 6 groupes:
 - Faible perte de diversité allélique intra-variétale au cours des générations;
 - Différenciation très faible mais croissante entre type fourrage et gazon;
 - Différenciation marquée entre variétés au sein de chaque type et qui s'accroît entre variétés récentes de gazon

Codage/génotypage

Profil observé	Codage 1	Codage 2	Codage 3	Codage 4
2 pics (ou bandes)	AB	AB	AB	AB
1 pic	A0	AA	AA	A
Pas d'amplification	00	00	Manquant	Manquant

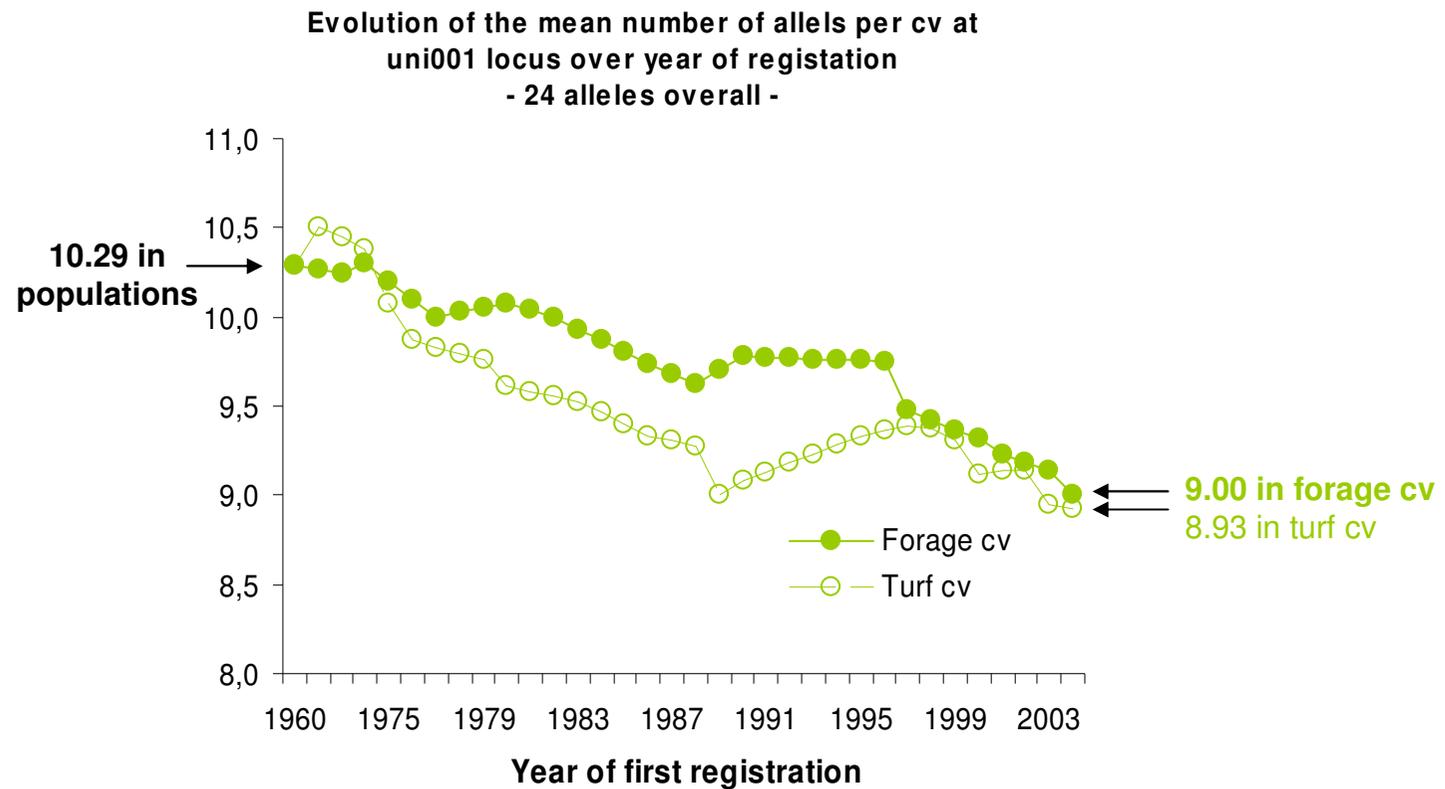
Codage 3								
	Groupe de liaison	Nb allèles actifs	% non amplification	p_{max}	p_{nul}	H_o	H_e	F_{it}
LpSSR112	2	26	31.5	0.306	0.000	0.240	0.80	0.70
DLF27	1	9	15.4	0.539	0.000	0.410	0.64	0.36
S7F7	6	18	13.5	0.467	0.000	0.400	0.70	0.40
B1A2	3	13	10.0	0.194	0.000	0.400	0.87	0.54
UNI001	3	24	4.7	0.182	0.000	0.610	0.88	0.31
LpH01H06	7	15	5.6	0.781	0.000	0.330	0.38	0.13
Lp165	3	15	3.7	0.404	0.000	0.500	0.75	0.33
DLF20	4	13	5.2	0.515	0.000	0.380	0.66	0.43
NFFA023	4	7	4.6	0.508	0.000	0.510	0.61	0.16
NFFA015	5	7	4.6	0.635	0.000	0.290	0.55	0.47
syn20738	6	7	4.5	0.534	0.000	0.500	0.60	0.17
NDPK	2	6	4.8	0.463	0.000	0.510	0.67	0.25
NFFA059	7	10	4.1	0.657	0.000	0.280	0.52	0.46
NFFA113	7	8	3.2	0.603	0.000	0.460	0.52	0.13

Evolution de la différenciation Fourrages vs Gazon

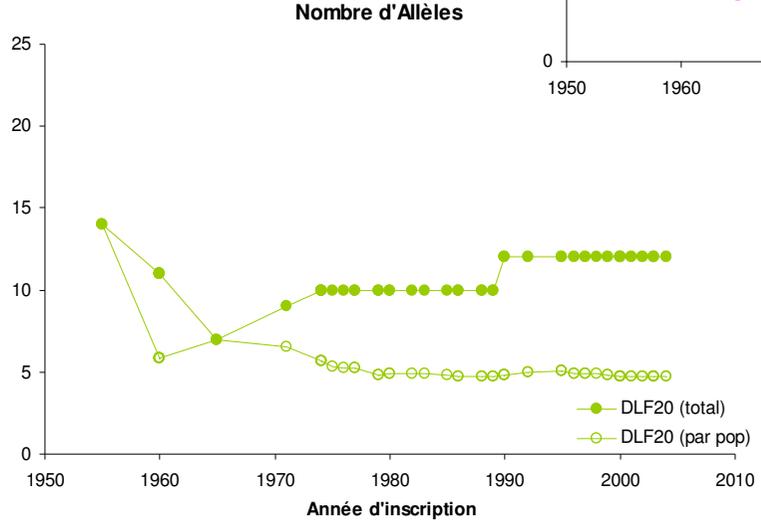
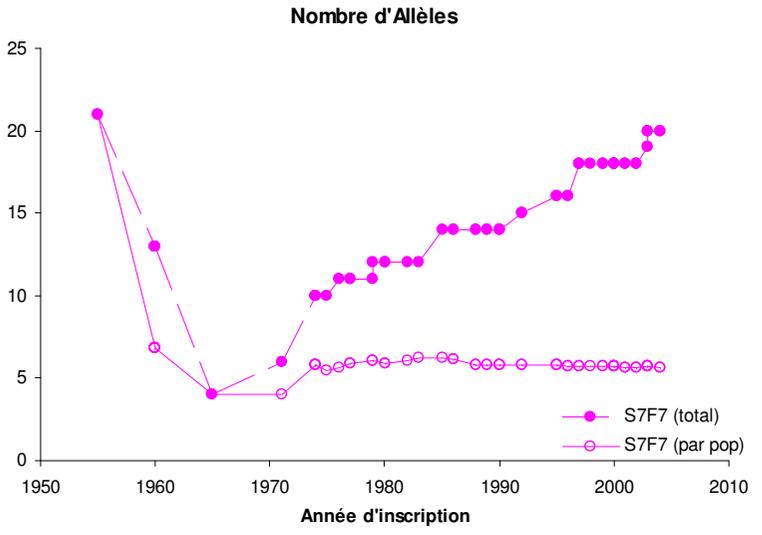
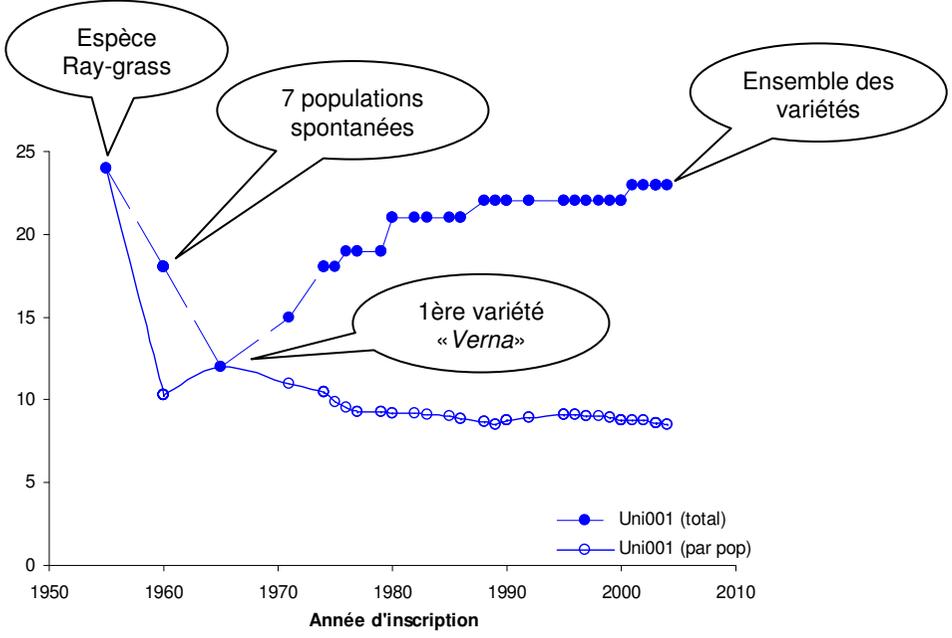


- Entre écotypes: 0,061 (0,054 sur isozymes (G. Charmet, 1993))
- Entre variétés fourragères: 0,1029 (0,0843 – 0,1208)
- Entre variétés à gazon: 0,1143 (0,1000 – 0,1297)
- Entre variétés fourragère et à gazon: 0,0118

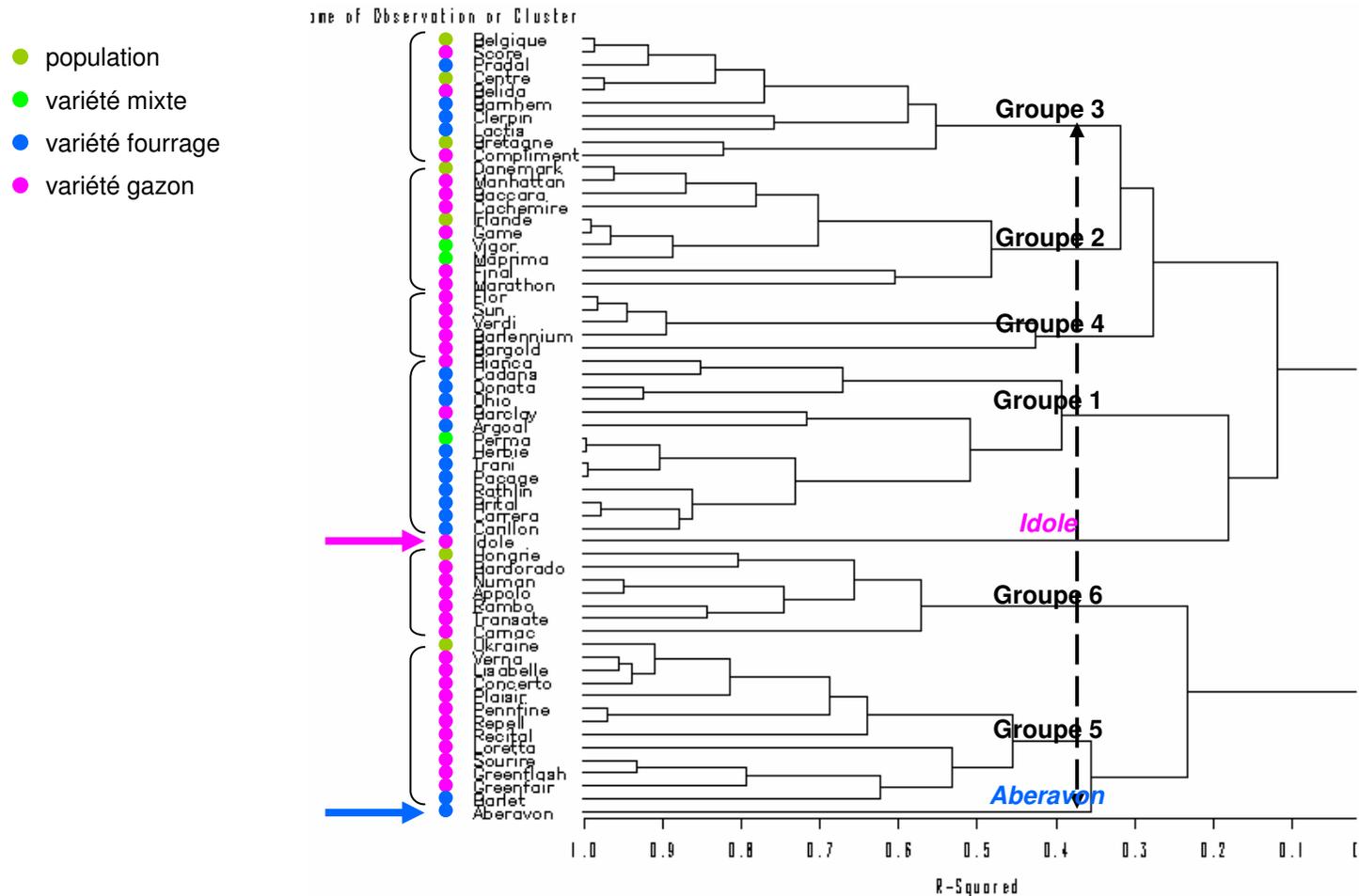
Evolution de la diversité intra-variétale



Evolution de la diversité globale

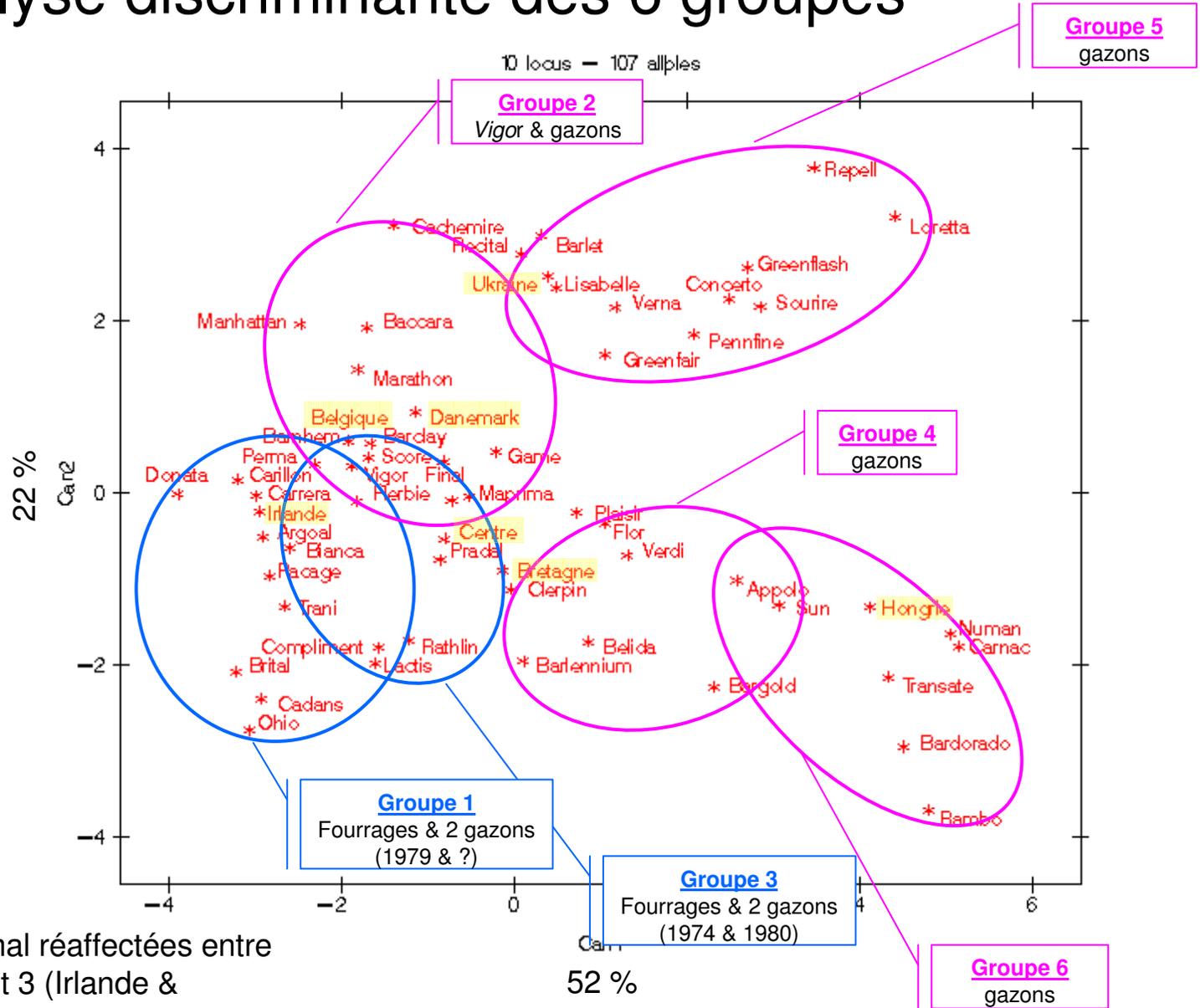


Classification sur distance entre variétés



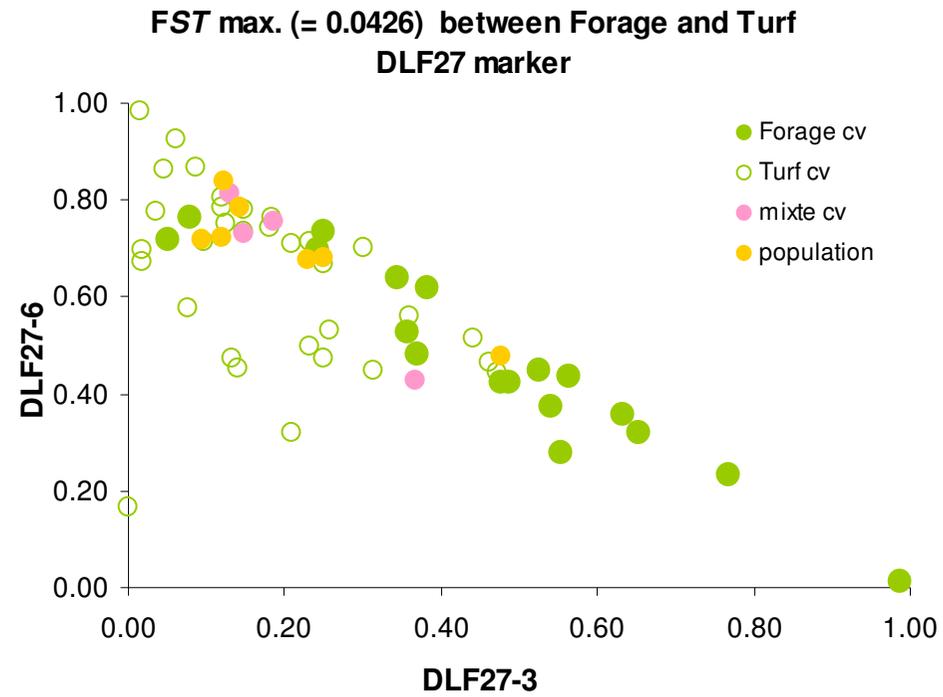
6 groupes et 2 singletons à ~ 37 % de variance inter-groupe

Analyse discriminante des 6 groupes



2 variétés mal réaffectées entre groupes 2 et 3 (Irlande & Belgique)

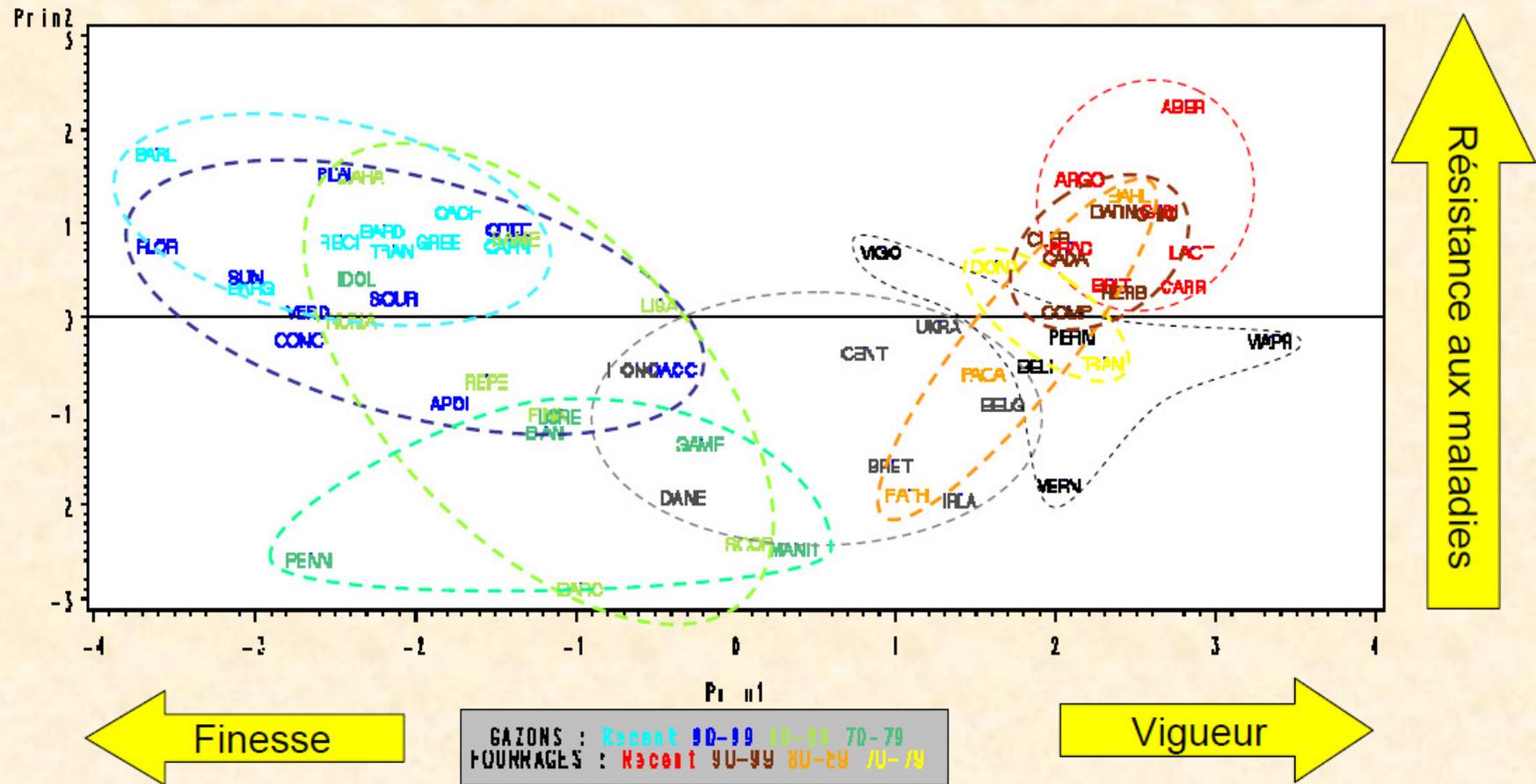
Nature continue de la différenciation



Résultats – progrès génétique

- Un progrès linéaire significatif pour une majorité de caractère;
 - Résistance aux maladies
 - Moindre remontaison
 - Productivité en été-automne des variétés fourrages
 - Critères biochimiques de valeur alimentaire
 - Valeur esthétique des variétés à gazon
- Mais pas d'augmentation du rendement aux coupes de printemps;
- Ni de réponse sur des composantes de la morphogénèse évaluées en plantes isolées;
- Une variabilité considérable de la productivité semencière:
 - Sans progrès au cours du temps
 - Indépendante des caractères de nature fourragère

Divergence phénotypique multivariable entre variétés fourrages et à gazon



	ANOVA PH0	Regression on cultivar registration year			
		Trait change per decade		R ²	
		Trait unit	% cv. mean		
Essai en parcelle					
•Rendement	Forage trial traits				
	Cumulated DMY ^a (t ha ⁻¹)	<0.001	0.96**	3.18	0.37
	Spring DMY ^b (t ha ⁻¹)	<0.001	0.10n.s.	1.59	0.13
	Spring 2007 DMY ^h (t ha ⁻¹)	0.07	0.11n.s.	1.66	0.16
	Spring 2008 DMY ^h (t ha ⁻¹)	<0.001	0.09n.s.	1.52	0.08
	Summer DMY ^b (t ha ⁻¹)	0.002	0.12*	2.78	0.26
	Summer 2006 DMY ^h (t ha ⁻¹)	0.57	0.13*	3.16	0.20
	Summer 2007 DMY ^h (t ha ⁻¹)	0.009	0.12*	2.76	0.17
	Summer 2008 DMY ^h (t ha ⁻¹)	0.12	0.11**	2.76	0.34
	Autumn DMY ^b (t ha ⁻¹)	<0.001	0.17***	7.37	0.59
	Autumn 2006 DMY ^h (t ha ⁻¹)	<0.001	0.23***	6.52	0.51
	Autumn 2007 DMY ^h (t ha ⁻¹)	0.002	0.12***	10.02	0.51
	Autumn 2008 DMY ^h (t ha ⁻¹)	0.008	0.09**	5.98	0.32
•Phénologie	Early-spring-vigour (1-9)	<0.001	0.26**	5.22	0.29
	Aftermath heading (1-9)	<0.001	-0.37***	-15.59	0.46
•Sensibilité	Rust resistance (1-9)	<0.001	0.67***	11.39	0.52
•Composition biochimique	Persistency (1-9)	0.08	0.33**	4.21	0.26
	Lignin content (% dry-matter)	0.003	-0.09**	-1.58	0.40
	NDF ^c content (% dry-matter)	0.03	-0.31**	-0.71	0.28
	IVNDFD ^d (%NDF)	0.059	0.55**	1.00	0.29
	WSC ^e content (% dry-matter)	<0.001	0.73**	5.00	0.35
	CP ^f content (% dry-matter)	0.32	-0.25**	-1.67	0.34
	IVDMD ^g (% dry-matter)	0.032	0.39**	0.49	0.36
Essai en pépinière					
• Morphologie foliaire	Space-plant trial traits				
	<i>Lamina</i> narrowness (1-9)	0.27	0.09*	2.56	0.16
	Leaf length 10/2006 (cm)	<0.001	-0.57n.s.	-1.58	0.08
	<i>Lamina</i> length 04-07/2007 (1-9)	0.002	0.03n.s.	0.52	0.01
	Growth habit (1-9)	0.47	0.05n.s.	1.15	0.05
• Phénologie	Tillering (1-9)	<0.001	0.11n.s.	1.84	0.07
	% Plants flowering 1st year	0.56	-0.73n.s.	-41.85	0.14
	Spike emergence date	<0.001			
Essai en parcelle					
Production de semences	Seed production trial trait				
	Seed yield (10 × t ha ⁻¹)	0.002	-0.21n.s.	-1.52	0.04

^{a,b,c,d,e,f,g}See Table 3. ^hSum of dry-matter yields of successive spring (summer, autumn) cuttings in 2006 (2007, 2008) averaged over forage trial locations.

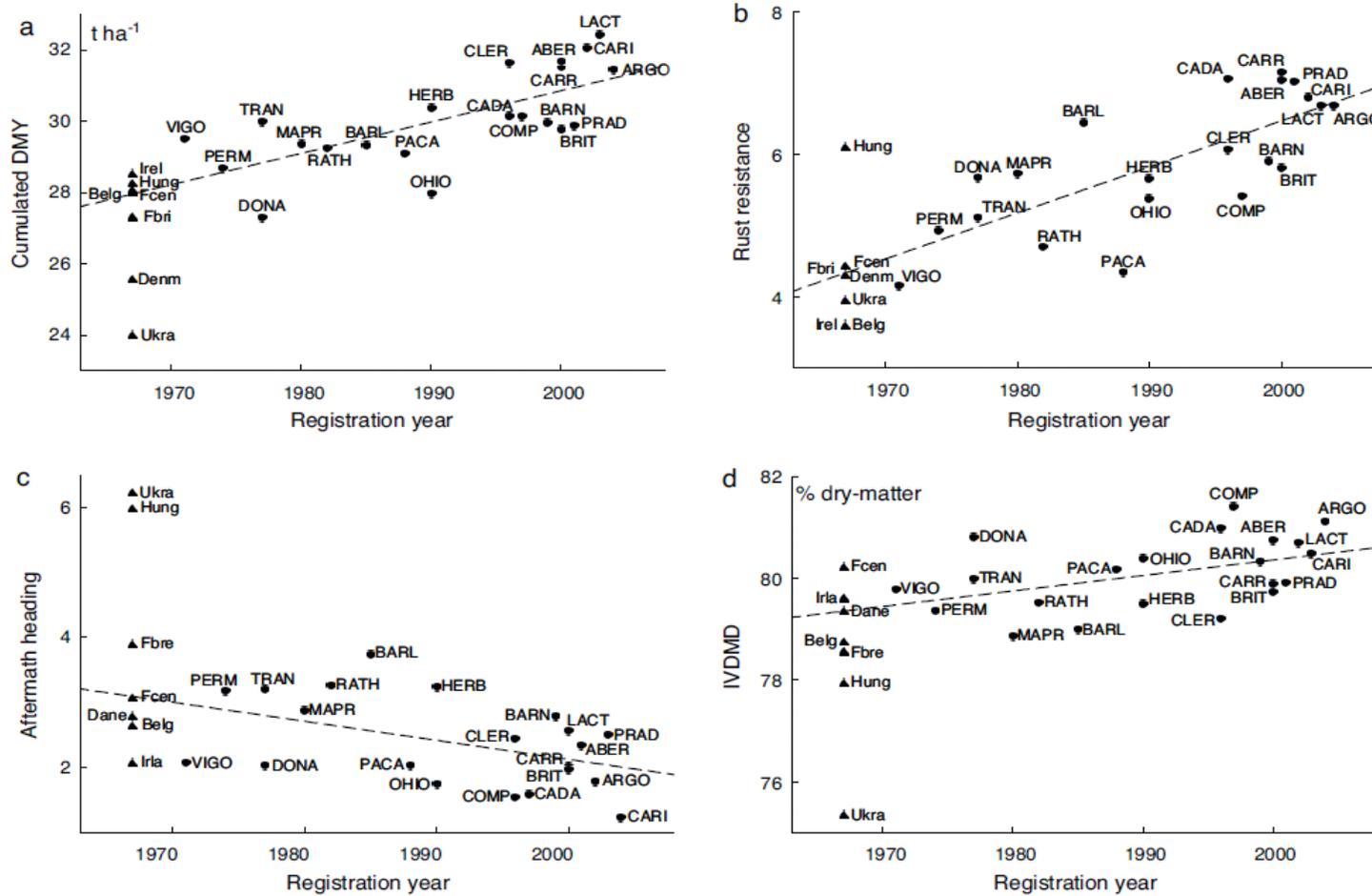
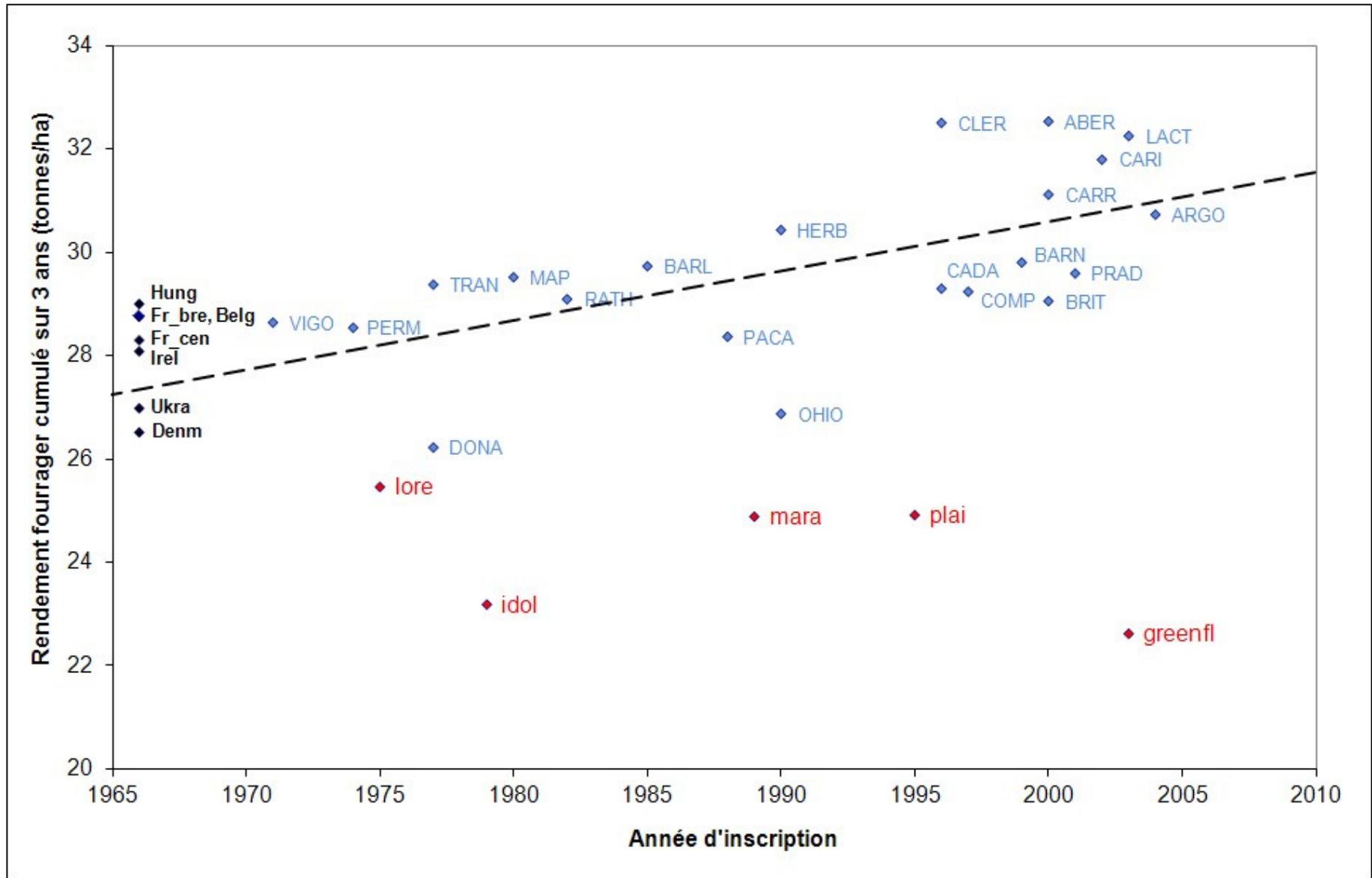
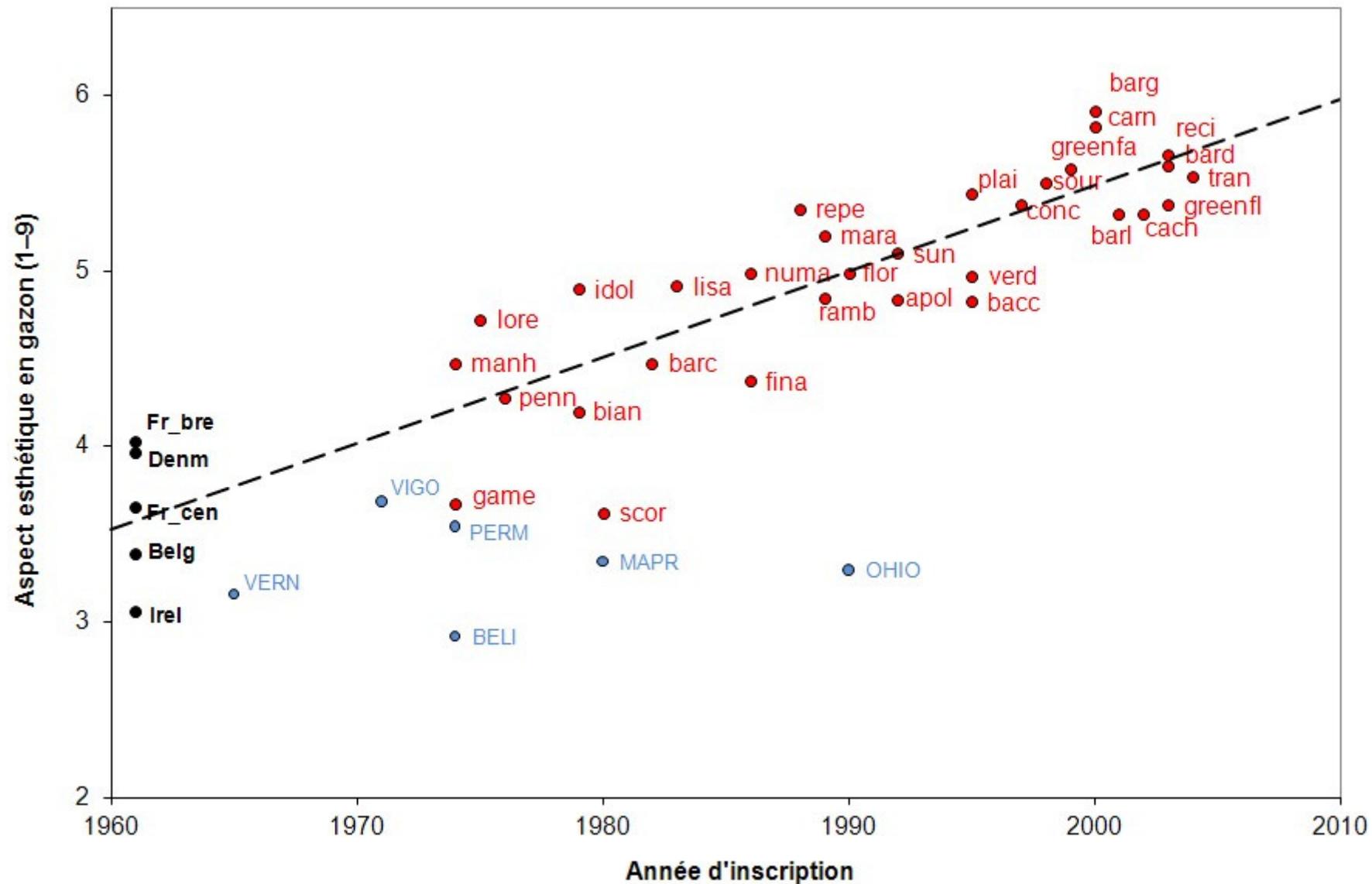
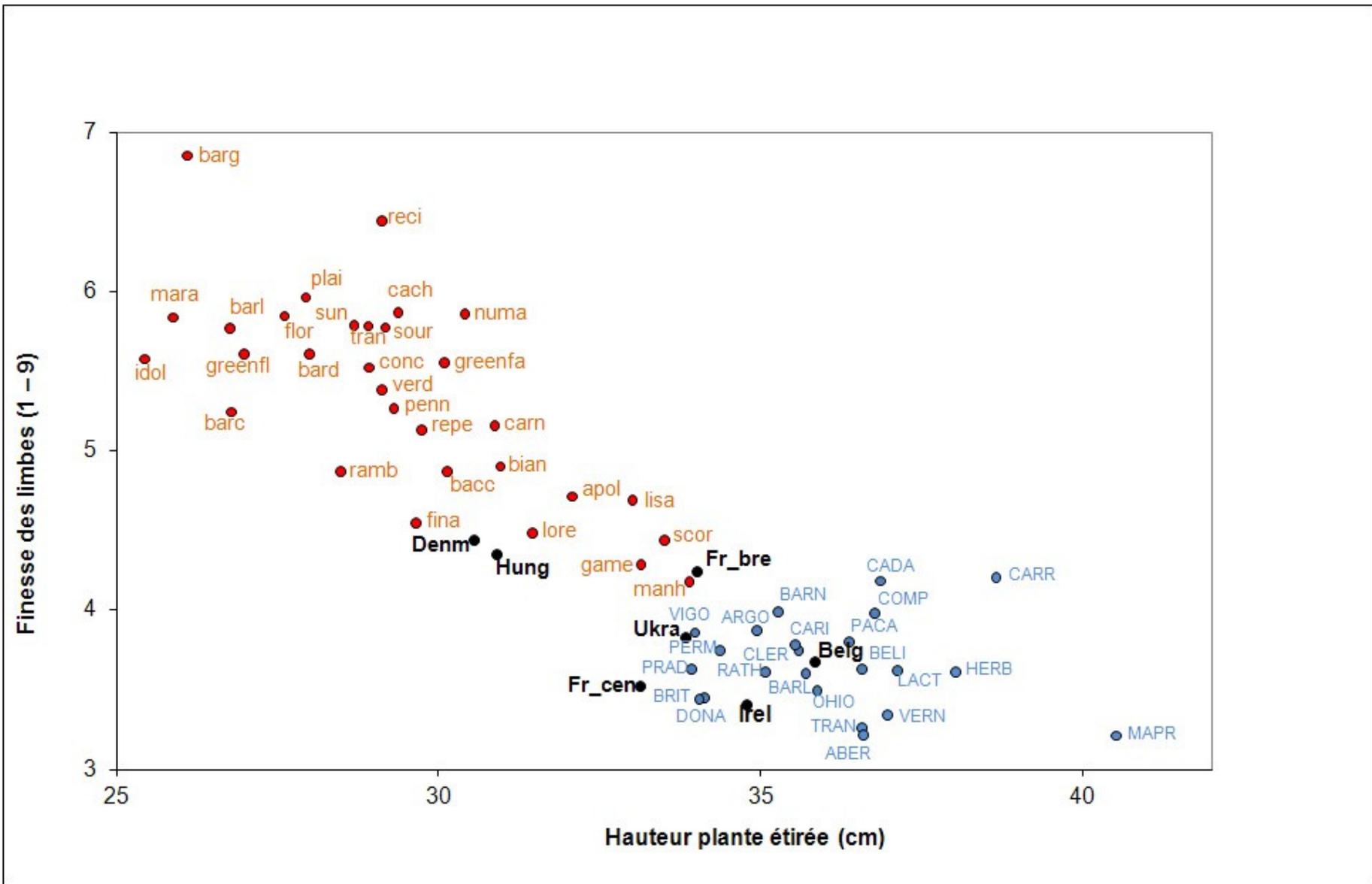


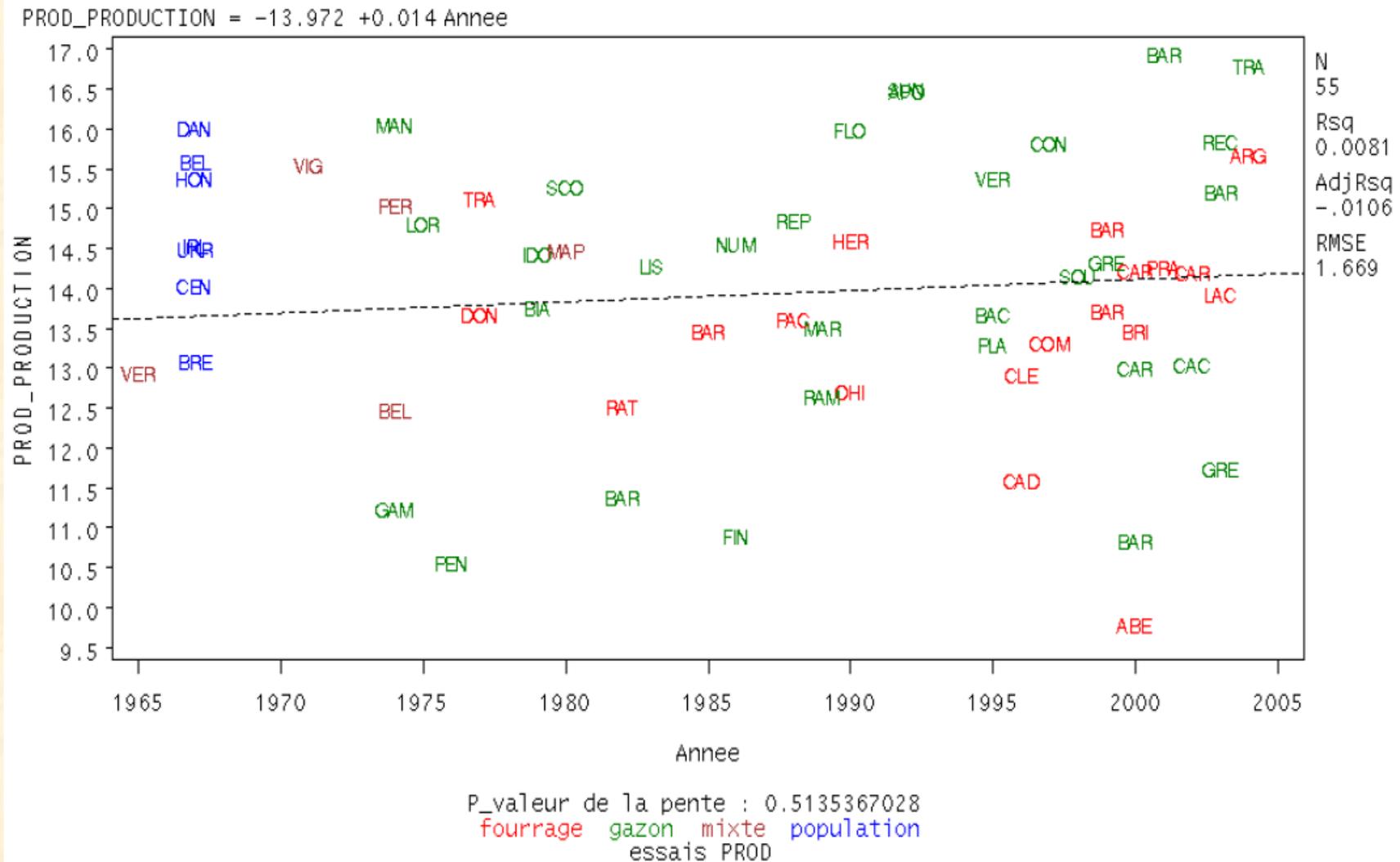
Fig. 1. Cumulated yield (a), rust resistance (b), aftermath heading (c) and IVDMD (d) of a set of 21 diploid perennial ryegrass cultivars (●) bred for pasture usage plotted against their year of first registration in a European country. Dotted lines display trait regression on cultivar registration year. Natural population data (▲) are presented as additional data and arbitrary placed on the horizontal axis. Cultivar and population means are least-squares means computed from a network of four trial locations. Cumulated yield is the sum of dry-matter yields of successive cuttings throughout the 3-year duration of experiment. Rust resistance and aftermath heading are scores from 1 (most severe rust damage, no spike re-growth) to 9 (no rust damage, highest spike re-growth abundance). Codes of cultivars and natural populations are given in Table 1.







Rendement grainier



En résumé:

Un progrès variétal:

- de nature multivariable mais qui peut être quantitativement appréciable pour certains caractères;
- souvent acquis par sélection indirecte pour les caractères complexes;
- sans signe de limite de réponse à la sélection;
- avec une efficacité réelle compte-tenu des moyens engagés et du nombre de générations de sélection (< 10);

cohérent avec:

- La génétique des caractères;
- Les contraintes de nature physiologique;
- Une sélection récurrente:
 - initiée récemment à partir de populations spontanées indifférenciées;
 - capable de réaliser une différenciation phénotypique marquée entre type fourrage et gazon sans épuiser la diversité génétique;
 - par introduction et emprunt continuels au sein des variétés du catalogue

Conclusions

Tournant de l'activité de recherche collaborative avec:

- Étude rétrospective (progrès génétique)
- Etude prospective (les marqueurs)
- Qui souligne l'originalité des espèces à « variétés synthétiques »
- Qui ouvre sur de nombreuses questions:
 - Envisager des méthodes de sélection plus efficace ?
 - Le statut de la variabilité génétique des variétés: un atout ou un handicap ?
 - La place du marquage moléculaire pour une sélection assistée ?
 - L'amélioration comme outil de gestion des ressources génétiques chez les espèces fourragères;

Développement en cours

- Place du génotypage en amélioration des espèces fourragère et avec quelle technologie ?
 - Projet cartographie-QTL (CASDAR 2009-2011)
 - SNP/454 (AIP 2010)
 - DArT (AIP 2011)
- Approfondissement du progrès génétique réalisé chez le ray-grass
 - Projet *Effilolium* sur l'efficacité de l'eau et de l'Azote (CASDAR 2011-2013)
- Diversité génétique pour accroître les services écosystémiques des prairies
 - Projet *Aglae* sur VATE des associations Dactyle/Luzerne et Ray-grass/Trèfle (CASDAR 2012-2014)
- L'amélioration fourragère dans le cadre du réchauffement climatique:
 - Metaprogramme INRA *Climagie* (2012-2015)
 - Projet *Elargir* sur la valorisation des populations méditerranéennes de Dactyle et Fétuque (CASDAR 2013-2015)

Merci à tous.....

- ACVF
 - C. Tabel
- SICASOV
 - A. de la Soujeole
 - M. Lécivain
- INRA/URP3F Lusignan
 - P. Barre
 - I. Cameleyre*
 - C. Gibelin*
 - J-B. Pierre*
 - J-P. Sampoux
- Plateforme Génotypage INRA Clermont
 - G. Boutet*
- Tourneur-Barenbrug Recherches
 - D. Noël
 - B. Tharel
 - K. de Bruijn*
- Carneau Frères
 - P. Bourdon
 - L. Poinsard
- DLF Trifolium
 - B. Bayle*
 - C. Galbrun
 - K. Vangsgaard (DK)
- FNAMS
 - F. Deneubourg
 - J. Hacquet
- GIE Grass
 - V. Béguier
 - P. Baudouin*
 - S. Flajoulot
- R2N
 - J-F. Chosson*
 - A-M. Gras
 - W. Pietraszek
 - P. Romestant
- REGA
 - A. Viguié*