

Identification et contrôle des variétés de ray-grass au moyen de marqueurs génétiques

J. Lallemand

Pour être inscrite au Catalogue officiel des semences, une variété doit prouver sa bonne valeur agronomique et technologique mais aussi avoir un caractère de nouveauté, c'est-à-dire être différente de toutes les autres variétés déjà connues. Ceci garantit à l'agriculteur qu'une nouvelle variété apporte un progrès génétique et, d'autre part, assure à l'obtenteur une protection de sa variété.

Chaque variété candidate à l'inscription au Catalogue est donc soigneusement décrite. Cette description permet sa comparaison avec les autres variétés, ainsi que la vérification de son homogénéité et de sa stabilité. Si l'inscription de la variété a lieu, sa fiche descriptive servira aussi de référence aux contrôleurs du S.O.C. (Service Officiel de Contrôle).

Chez le ray-grass, comme chez de nombreuses plantes fourragères, il y a peu de caractères descriptifs (tableau 1) et ceux-ci sont assez subjectifs (comme la couleur de la feuille) ou sujets à variations (époque d'épiaison). De plus, il existe une forte variabilité intravariétale due à l'allogamie de l'espèce.

Malgré 2 lieux d'implantation, et 3 voire 4 années d'observation, les cas d'ajournement d'une variété sont de plus en plus nombreux si on n'utilise que les caractères

MOTS CLÉS

Contrôle, cultivar, électrophorèse, identification variétale, marquage enzymatique, ray-grass

KEY-WORDS

Checking, cultivar, cultivar identification, electrophoresis, enzymatic marking, ryegrass

AUTEUR

Laboratoire de Biochimie du G.E.V.E.S., BP 52, F-17700 Surgères

	Variété Axis	Variété Actif
- Ploïdie	diploïde	diploïde
- Tendance à l'épiaison l'année du semis	assez faible	assez faible
- Epoque d'épiaison (en 2e année)	demi-précoce	demi-précoce
- Port à l'épiaison	demi-dressé	demi-dressé
- Hauteur naturelle à l'épiaison	assez haute	assez haute
- Couleur du feuillage (l'automne de l'année du semis)	vert moyen	vert moyen
- Longueur de feuille (feuille culinaire d'une tige représentative, dans les deux semaines suivant l'épiaison)	moyenne	moyenne
- Largeur de feuille (même feuille que précédemment)	moyenne	moyenne
- Longueur de la tige la plus longue (inflorescence incluse, à la fin de l'élongation)	assez longue	assez longue
- Longueur de l'inflorescence (à la fin de l'élongation)	moyenne	moyenne

TABLEAU 1 : Description de 2 variétés de ray-grass italien que les caractères traditionnels ne permettent pas de distinguer.

TABLE 1 : Description of two Italian ryegrass varieties using traditional descriptors. The two varieties cannot be distinguished.

traditionnels. D'autre part, étant donné que 80 à 90 % des variétés sont refusées à cause de leur valeur agronomique et technologique, le travail mis en œuvre sur le terrain pour la distinction est disproportionné en regard du nombre de variétés inscrites.

La nécessité d'un outil plus performant se fait donc sentir. Dans cette optique, des études d'électrophorèse des isoenzymes ont été entreprises. Cet article décrit les applications suivantes :

- la comparaison de variétés,
- le contrôle,
- l'estimation du taux d'hybridation dans des croisements,
- la prévision des plans de semis pour les études comparatives en champ.

Principe de l'électrophorèse

Une molécule ionisée, placée dans un champ électrique, se déplace vers une électrode à une vitesse proportionnelle à sa charge. Les isoenzymes étant des protéi-

nes, elles sont donc toujours chargées quand elles se trouvent à un pH différent de leur pH isoélectrique. Si on les place sur un support et qu'on leur applique un champ électrique pendant un temps déterminé, elles parcourront une distance caractéristique de chaque type protéique. La figure 1 montre des diagrammes observés sur l'enzyme phosphogluco-isomérase chez le ray-grass. Chaque diagramme est caractéristique d'un génotype et permet de déterminer les allèles en présence. L'interprétation des diagrammes tient compte de la ploïdie de la variété.

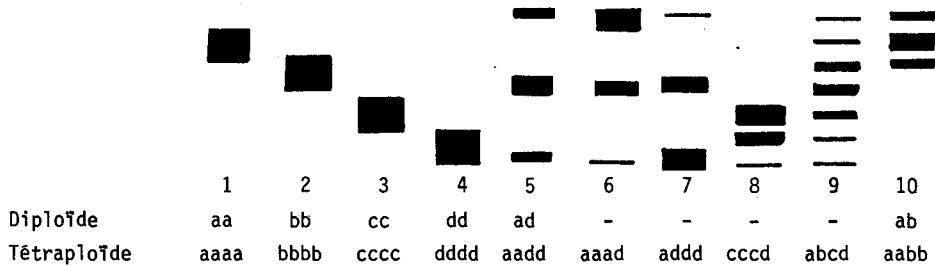


FIGURE 1 : Diagrammes des phosphogluco-isomérases rencontrées chez le ray-grass. 4 allèles sont fréquents (a,b,c,d) et représentés sur la figure à l'état homozygote (1 à 4) et hétérozygote (5 à 10) pour des individus diploïdes ou tétraploïdes.

FIGURE 1 : *Electrophoretic patterns observed among ryegrass varieties for the enzyme phosphogluco-isomerase. 4 alleles (a, b, c, d) are displayed on the figure in homozygotic (1 to 4) or heterozygotic (5 to 10) individuals, either diploid or tetraploid.*

Pour décrire les variétés, 100 individus sont analysés, ce qui permet de calculer une fréquence allélique spécifique de la variété. Ce résultat s'obtient en une journée sur des plantules de 15 jours à trois semaines, alors qu'il faut 1 an ou plus pour les caractères traditionnels.

Comparaison des variétés

• Choix des enzymes

Pour le ray-grass italien et le ray-grass anglais, 3 enzymes sont utilisées en France pour des tests en série : les phosphogluco-isomérases (PGI) (HAYWARD et Mc ADAM, 1977 ; NIELSEN, 1980), les phosphatases acides (ACP), et les isocitrate-déshydrogénases (IDH) (GRENECHE et al., sous presse ; LALLEMAND et al., sous presse). Elles ont été choisies pour leur variabilité sur la collection variétale étudiée, pour leur facilité d'interprétation génétique et leur simplicité d'obtention. La technique utilisée est l'électrophorèse sur gel d'amidon en système continu (pH 6,5) pour ACP et IDH, en système discontinu (pH 8,3) pour les PGI.

Pour les PGI, qui sont utilisées dans d'autres pays, il a été vérifié que les résultats concordent, quels que soient le lot d'origine et le laboratoire effectuant l'analyse (GRENECHE et al., sous presse).

• Description et comparaison des variétés

Le comportement à l'électrophorèse de la plupart des variétés du Catalogue a été décrit (LALLEMAND et al., sous presse). Pour comparer 2 variétés, on effectue un test χ^2 . Le tableau 2 montre les fréquences alléliques de 2 variétés. Alors qu'elles ont la même description (tableau 1) et qu'on ne peut pas les distinguer au champ, leurs fréquences alléliques pour les ACP et les IDH permettent de les identifier. Actuellement, on considère que 2 variétés sont distinctes quand leurs fréquences alléliques sont significativement différentes au seuil de 1% pour 2 enzymes, si aucune autre différence physiologique ou morphologique n'est visible. Sur l'ensemble du Catalogue, la plupart des variétés diffèrent des autres par au moins 1 enzyme en plus des caractères morphologiques.

Allèles Variétés	PGI				ACP				IDH			
	a	b	c	d	a	b+c	d	e+f	a	b	c	d
- Actif	0	72	0	132	46	117	8	17	69	90	11	2
- Axis	0	90	2	112	14	149	35	2	146	47	9	2
χ^2	3,4 NS				49,4 ***				38,8 ***			

TABLEAU 2 : Effectifs des allèles observés sur 2 variétés de ray-grass pour 3 enzymes (PGI, ACP, IDH) ; les fréquences des ACP et IDH permettent nettement de les distinguer.

TABLE 2 : Allelic distribution observed on 2 ryegrass varieties for 3 enzymes (PGI, ACP, IDH) ; ACP and IDH frequencies separate clearly the two varieties.

Contrôle de la conformité des lots de semences

Le service officiel de contrôle (S.O.C.) est de plus en plus demandeur de tests d'électrophorèse. Le lot à contrôler est comparé à un standard pour ses fréquences alléliques. Le test permet aussi de vérifier la composition d'un mélange (pour les gazons par exemple) à condition qu'il n'y ait pas plus de 2 ray-grass parmi les constituants : connaissant les fréquences alléliques de chaque constituant, on peut calculer celles du mélange et les comparer à celles observées sur le lot à tester. Le tableau 3 montre les effectifs alléliques observés sur un lot non conforme. En effet, ils sont significativement différents de ceux attendus pour le mélange annoncé (proportion Pennfine/Vigor : 1/2,5).

Etude et contrôle des variétés de ray-grass par électrophorèse

Allèles (ACP)	a	b	c	Allèles (PGI)	a	b	c	d	χ^2*	χ^{2**}	χ^{2***}
Pennfine	5	102	97	Magella	37	98	65	0			
Vigor	1	77	126	Bartolini	12	77	19	92			
attendu	2,14	84,1	118	croisement 1	22	100	42	36	6,23	2,2	6,25
observé	2	132	70	croisement 2	17	103	40	40	11,38	3,01	10,28
				croisement 3	27	108	46	19	2,58	13,83	

$\chi^2 = 22,8$ ***

* : χ^2 calculés pour les hypothèses "croisement au hasard",
 ** : χ^2 calculés pour les hypothèses "100% hybridation",
 *** : χ^2 calculés pour les hypothèses "identité avec croisement 3".

Tableau 3

TABLEAU 3 : Effectifs des allèles observés sur un mélange annoncé comme étant constitué des variétés Pennfine et Vigor dans une proportion 1/2,5 ; ils sont significativement différents de ceux attendus.

TABLE 3 : Allelic distribution in a mixture supposed to be Pennfine and Vigor in a 1/2.5 ratio ; the distribution is significantly different from that expected.

Tableau 4

TABLEAU 4 : Effectifs des allèles observés sur 2 variétés et leurs croisements. Pour les croisements 1 et 2, Magella a reçu un traitement gamétocide, pour le 3, non. Les taux d'hybridation sont nettement supérieurs sur les croisements 1 et 2.

TABLE 4 : Allelic distribution observed on 2 varieties and the "hybrids" obtained from them. In crosses 1 and 2, a gametocide has been applied, not in cross 3. The hybridization rate is much higher for 1 and 2.

Contrôle du taux d'hybridation

Les variétés de ray-grass dites hybrides, sont constituées en fait d'un mélange de vrais hybrides, de ray-grass anglais ou de ray-grass italiens dans des proportions variables et qui peuvent différer d'une génération à l'autre. L'électrophorèse permet d'estimer la contribution de chaque parent. On peut aussi calculer le pourcentage d'autofécondation (ARCIONI et MARIOTTI, 1983). Enfin, on peut évaluer l'efficacité d'un traitement gamétocide ; le tableau 4 montre les fréquences alléliques obtenues après le protocole d'expérience suivant : les deux parents sont semés en lignes alternées et les graines sont récoltées sur le ray-grass anglais ayant reçu ou non un traitement gamétocide. Les résultats indiquent une augmentation significative du taux d'hybrides après traitement.

Prévision des plans de semis pour les études de distinction

Le protocole traditionnel prévoyait une série d'observations sur toutes les variétés implantées de façon randomisée pendant 2 années successives. La deuxième implantation a lieu au printemps alors que les résultats de la première série ne sont pas encore connus. Les variétés ayant des problèmes de distinction ne sont donc pas

côte à côte. Il faut donc procéder à une 3^e, voire à une 4^e implantation pour pouvoir mettre côte à côte les variétés à distinguer.

Dans le nouveau protocole avec étude systématique des variétés par électrophorèse (pour le ray-grass italien), les résultats de l'électrophorèse permettent de prévoir le plan de semis en implantant les unes à côté des autres les variétés signalées proches par l'électrophorèse. Ceci permet de gagner 1 à 2 ans pour les observations en champ et d'optimiser la comparaison des variétés litigieuses pour les caractères végétatifs. Dans ce système, c'est l'électrophorèse qui permet une première estimation de la proximité des variétés, pronostic qui sera ensuite confirmé ou infirmé par les études en champ dans les meilleures conditions possibles de comparaison puisque les variétés proches seront côte à côte.

Conclusion

L'électrophorèse des enzymes est un outil fiable dans l'étude des semences. Les protéines étant une expression directe du génome, on peut ainsi s'affranchir des variations dues au milieu. D'autre part, la technique est très rapide et permet de réaliser un gain de temps appréciable. Il en est de même pour le gain d'espace.

Déjà demandés pour les vérifications de routine par le S.O.C. pour différentes espèces (pois, blé, orge, maïs, ray-grass), les tests par électrophorèse sont en passe de prendre de plus en plus d'importance et d'être intégrés dans les études préparatoires à l'inscription au Catalogue.

L'électrophorèse des protéines ne détecte pas toutes les mutations survenues dans le gène d'une protéine : en effet, à cause de la redondance du code génétique, toutes les mutations n'aboutissent pas à la substitution d'un acide aminé. De même, toutes les substitutions d'acides aminés n'aboutissent pas à un changement de charge de la protéine détectable par l'électrophorèse. D'autre part, l'électrophorèse est un outil à utiliser avec précaution. En effet, en augmentant indéfiniment le nombre de marqueurs, il sera toujours possible de trouver une différence entre deux variétés, même génétiquement très proches. C'est pourquoi des études sont en cours au G.E.V.E.S. pour tenter d'établir une "distance génétique minimum" en dessous de laquelle deux variétés seront considérées comme identiques.

Accepté pour publication, le 18 novembre 1990

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARCONI S. et MARIOTTI D. (1983) : "Selfing and interspecific hybridization in *Lolium perenne* L. and *Lolium multiflorum* Lam. evaluated by phosphoglucosomerase as isozyme marker", *Euphytica*, 32-33-40.
- GRENECHE M., LALLEMAND J., MICHAUD O. (1990) : "Comparison of different enzyme loci as a means of distinguishing ryegrass varieties by electrophoresis", *Seed Sci. and Techn.*, (sous presse).
- HAYWARD M.D. et MC ADAM N.J. (1977) : "Isozyme polymorphism as a measure of distinctiveness and stability in cultivars of *Lolium perenne*", *Zeitschrift fuer Pflanzenzuechtung*, 79, 59-68.
- LALLEMAND J., MICHAUD O., GRENECHE M. (1991) : "Electrophoretical description of ryegrass varieties : a catalogue", *Plant varieties and seeds*, (sous presse).
- NIELSEN G. (1980) : "Identification of all genotypes in tetraploid ryegrass (*Lolium* spp.) segregating for four alleles in a Pgi-enzyme locus", *Hereditas*, 92, 49-52.

RÉSUMÉ

Devant l'insuffisance des caractères descriptifs morphologiques et physiologiques chez le ray-grass, l'étude de marqueurs biochimiques apparaît comme une nécessité pour pouvoir distinguer les variétés. Quatre applications de l'électrophorèse isoenzymatique sont décrites ici :

- la comparaison entre elles de variétés et dans de nombreux cas leur identification,
- le contrôle de la conformité de lots de semences par rapport à un standard et de la composition d'un mélange chez des gazons,
- l'estimation du taux d'hybridation suivant différentes méthodes de croisement,
- la prévision des plans de semis pour les études comparatives en champ.

SUMMARY

Identification and checking of ryegrass cultivars by genetic markers

In order to be homologated, a new variety must fulfil two conditions :

- have a good agronomical and technological value,
- be stable, homogeneous and distinct from all other varieties.

For ryegrass, morphological and physiological traits are no longer sufficient to distinguish the varieties. Therefore, biochemical markers have been studied. This paper describes 4 applications for electrophoresis of isozymes in ryegrass species :

- comparison and identification of varieties,
- control of conformity of seed lots compared to a standard, and of composition of perennial ryegrass variety mixtures for lawns,
- estimation of hybridization rates according to different mating methods,
- setting-up of designs for distinctiveness studies in the field.

Electrophoresis is a good tool for the study of varieties : it gives information on the genotype, not the phenotype, and it saves space and time.

Remerciements

Le Comité de rédaction remercie les "lecteurs" qui ont bien voulu lui accorder leur collaboration pour l'indispensable travail de critique constructive des textes qui lui ont été soumis pour publication dans *Fourrages* en 1990 :

MM. J.D. ARNAUD

G. BALENT

G. BOUDET

A. BOURGEOIS

A. CAPILLON

Mme E. CHEVREAU

M. B. COSSÉE

Mlle G. DAVID

MM. C. DEMARQUILLY

M. ETIENNE

J.L. FIORELLI

P. GAYRAUD

M. GHESQUIERE

G. GINTZBURGER

A. HARDY

A. PHODEN

D. PHUBERT

P. JANNOT

Mme E. LECRIVAIN

MM. LILA

P. LOISEAU

E. LOYSEL

J.R. MARTY

D. MICOL

F.X. DE MONTARD

P. MORLON

J. PICARD

C. POISSON

F. PAPY

M. PETT

J.M. PROSPERI

G. RAYNAL

J. SAGET

J.C. SIMON

J.L. TISSERAND

Mlle F. VERTÈS

M. VIVIER

Mme F. VOLAIRE