

Variabilité génétique révélée à l'aide de marqueurs neutres entre et à l'intérieur de variétés de luzerne

S. Flajoulot¹, P. Baudouin², J. Ronfort³, T. Huguet⁴, P. Barre⁵, C. Huyghe⁵, B. Julier⁵

1 : Jouffray-Drillaud, La Litière, F-86600 Saint-Sauvant ; flajou@lusignan.inra.fr

2 : GIE GRASS, La Litière, F-86600 Saint-Sauvant ;

3 : INRA, SGAP, Domaine de Melgueil, F-34130 Mauguio

4 : UMR CNRS-INRA 2594/441, LIPM, BP27, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex

5 : INRA, UGAPF, F-86600 Lusignan

1. Introduction

Les variétés de luzerne (*Medicago sativa*) sont des variétés synthétiques, obtenues par la multiplication en panmixie pendant 3 ou 4 générations de plantes ou de familles parentales. De ce fait, et aussi en raison de l'allogamie et de l'autotétraploïdie de l'espèce, la variabilité entre plantes issues d'une variété est importante. Cependant, il existe aussi une variabilité entre variétés, liée à leur origine génétique et au processus de sélection.

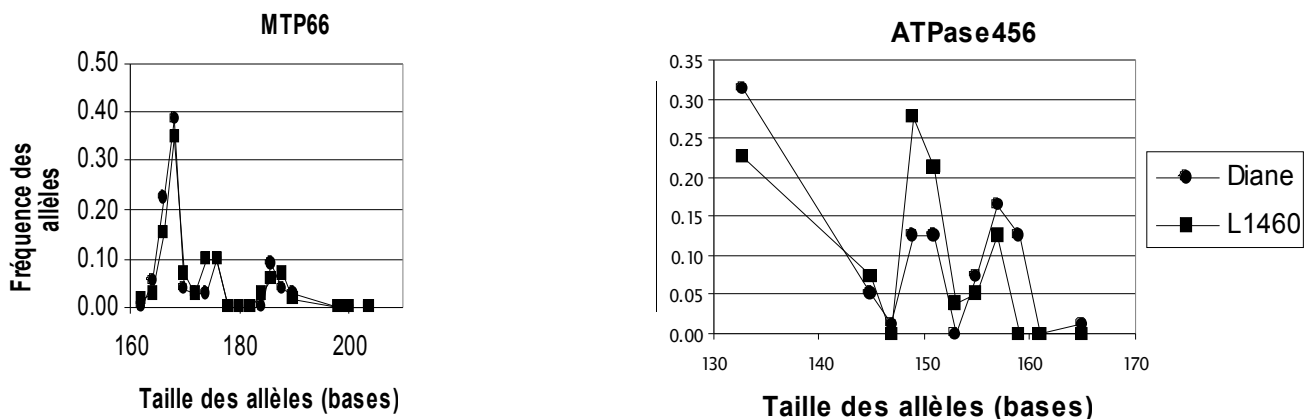
L'analyse de la variabilité génétique, entre ou à l'intérieur des variétés, est couramment effectuée grâce à des caractères morphologiques, que ce soit au cours des programmes de sélection, pour la gestion des ressources génétiques ou pour l'inscription de nouvelles variétés au Catalogue Officiel français. Cependant, ces caractères sont quantitatifs, influencés par le milieu et souvent faiblement héritables. Au contraire, les marqueurs moléculaires sont qualitatifs (on lit une présence ou une absence d'allèles), indépendants du milieu, très héritables et neutres. Ils permettent une analyse de la diversité et de la structuration des populations. Les marqueurs moléculaires microsatellites présentent de plus l'avantage d'être co-dominants : on peut ainsi déterminer chacun des quatre allèles d'une plante.

Nous présentons ici une analyse de la variabilité génétique entre variétés et à l'intérieur de sept variétés obtenues par un sélectionneur privé (GIE GRASS) pour un ensemble de huit marqueurs microsatellites.

2. Matériel et méthodes

Parmi les sept variétés, six ont été inscrites au Catalogue Officiel entre 1990 et 2001 (Diane, Julia, Harpe, Kali, Rachel, Timbale) et l'une est en demande d'inscription (L1460). Chaque variété a été représentée par 20 plantes, prises au hasard. L'ADN a été extrait, et a servi à réaliser l'amplification par PCR de 8 locus microsatellites. Les 8 locus ont été choisis pour être cartographiés sur 8 groupes d'homologie différents, et pour avoir de nombreux allèles dans une étude antérieure (JULIER *et al.*, 2003). La migration des produits d'amplification a été réalisée sur un séquenceur Licor. D'après l'intensité des bandes, on a déterminé la dose de chaque allèle. L'importance de la variabilité génétique est mesurée par le nombre d'allèles à chaque locus et leur fréquence. Pour décrire plus précisément l'origine de cette variabilité, la structuration entre variétés (Fst) et la structuration intra-variété (Fis, qui mesure l'écart à la panmixie des variétés) ont été calculés à l'aide du logiciel Gene4x, avec des formules adaptées aux autotétraploïdes (RONFORT *et al.*, 1998).

FIGURE 1 – Fréquence des différents allèles pour deux locus microsatellites (MTP66 et ATPase456), pour deux variétés de luzerne (Diane et L1460)



3. Résultats et discussion

La variabilité génétique, mesurée par la diversité allélique, est importante puisqu'il y a de 3 à 23 allèles par locus (tableau 1). Les allèles fréquents sont les mêmes dans toutes les variétés et, de même, les allèles rares sont communs à toutes les variétés (figure 1). L'un des locus, MTIC299, montre un Fis (écart à la panmixie) significatif, avec un excès d'homozygotes. Pour les autres locus, la structuration intra-variétale (Fis) est non significative, indiquant un équilibre panmictique en accord avec la multiplication des variétés en polycross. La structuration entre variétés (Fst) est faible (tableau 1), mais le Fst est significatif sauf pour le locus B14B03.

TABLEAU 1 – Nombre d'allèles différents dans chaque variété et au total, et valeurs du paramètre Fst (structuration entre variétés) pour 8 locus microsatellites évalués dans 6 variétés de luzerne

Locus	Diane	Julia	Kali	Rachel	Timbale	L1460	Total	Fst ⁽¹⁾
MTP66	10	11	10	10	9	12	14	0.005 *
MTIC299	5	5	6	6	4	6	6	0.000 NS
MTIC451	10	12	13	11	12	13	16	0.007 ***
MTIC189	16	15	14	15	12	15	21	0.009 ***
ATPase456	9	8	7	7	9	7	11	0.002 **
MTIC93	3	3	3	2	3	3	3	0.016 ***
MTIC432	8	10	9	14	12	11	23	0.004 *
B14B03	8	10	8	10	8	10	16	0.000 NS

1 : Seuils de signification de 5% (*), 1% (**) et 1‰ (***) ; NS : non significatif

La distinction entre variétés prises deux à deux a été évaluée par le calcul du Fst et de sa signification avec 6 locus (MTIC299 et B14B03 ont été exclus) (tableau 2). Sur les 15 paires de variétés, seules 4 ne sont pas significativement différentes. Ce résultat est encourageant : une meilleure distinction pourrait sûrement être obtenue en augmentant le nombre de locus microsatellites, et en augmentant aussi le nombre de plantes analysées dans chaque variété. De plus, dans le cas présent, les variétés sont probablement apparentées puisqu'elles proviennent du même obtenteur.

TABLEAU 2 – Valeur du Fst (structuration entre variétés) pour chaque paire de variété. Les valeurs de Fst non significatives sont suivies de NS.

	Timbale	Julia	Kali	Diane	L1460
Rachel	0,009 NS	0,006	0,012	0,011	0,012
Timbale		0,000 NS	0,013	0,011	0,011
Julia			0,009 NS	0,004	0,006 NS
Kali				0,007	0,006
Diane					0,007

4. Conclusion

Les résultats montrent que les marqueurs microsatellites peuvent aider à analyser la diversité génétique de variétés ou de populations de luzerne.

Les marqueurs moléculaires neutres sont donc des outils intéressants pour analyser la structure et la diversité des populations ou des variétés, y compris chez des espèces autotétraploïdes. Ils offrent des perspectives pour la distinction variétale, mais aussi pour l'évaluation et la gestion des ressources génétiques. Cependant, des marqueurs non neutres (intervenant dans des caractères sélectionnés comme des résistances) permettraient certainement une plus grande distinction entre variétés améliorées.

Références bibliographiques

- JULIER B., FLAJOULOT S., BARRE P., CARDINET G., SANTONI S., HUGUET T., HUYGHE C. (2003) : "Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers", *BMC Plant Biology*, 3:9, <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/3/9>
- RONFORT J., JENCZEWSKI E., BATAILLON T., ROUSSET F. (1998) : "Analysis of population structure in autotetraploid species", *Genetics*, 150, 921-930.