

La diversité génétique au sein des variétés : une richesse ou un problème ?

C. Scotti

L'utilisation de la diversité génétique est à l'origine de la création variétale. Mais cette diversité est délicate à isoler et à gérer, puis à valoriser dans de nouvelles variétés ; quels outils et méthodes utiliser ? Le cas particulier de la luzerne, qui bénéficie d'une longue histoire d'amélioration, apporte des éléments de réponse.

RÉSUMÉ

Les ressources génétiques de luzerne (espèce fourragère autotétraploïde allogame) sont en fait un complexe de plusieurs souches. Or les systèmes agricoles actuels demandent des variétés très spécialisées et très homogènes. L'institut de Lodi a choisi d'utiliser la diversité "agronomiquement utile" des sous-espèces pures sativa ou falcata. Il ressort que la diversité génétique joue un rôle important pour équilibrer l'effet de consanguinisation chez différents modèles variétaux (semi-hybrides et synthétiques) à nombre de constituants réduit et partiellement consanguins. De plus, la diversité génétique peut être utilisée pour faire exprimer, étudier et exploiter les interactions non additives liées à l'aptitude spécifique à la combinaison au sein d'un modèle variétal semi-hybride.

MOTS CLÉS

Cultivar, Italie, luzerne, ressources génétiques, sélection variétale, variabilité génétique.

KEY-WORDS

Cultivar, cultivar breeding, genetic variation, genetic resources, Italy, luzerne.

AUTEUR

Istituto Sperimentale Colture Foraggere, C.R.A., Viale Piacenza 29, I-26900 Lodi (Italie) ; biol@iscf.it

Introduction

Quelle est la situation de la diversité génétique dans une espèce fourragère autotétraploïde qui a une longue tradition d'amélioration comme la luzerne ? Différents auteurs (KIDWELL *et al.*, 1994 ; GHÉRARDI *et al.*, 1998), en travaillant avec différents marqueurs moléculaires neutres, ont trouvé que la distinction entre différentes souches de ressources génétiques ou populations n'était pas toujours complète et qu'une partie importante de la variation interpopulations était liée à la présence de la sous-espèce *Medicago falcata*. CROCHEMORE *et al.* (1996), en étudiant la variation inter et intra-populations du complexe *Medicago sativa* à l'aide de marqueurs RAPD, trouvaient que la variation intergroupes (*falcata*, flamand, méditerranéen) était inférieure à celle entre populations au sein des groupes. Avec un matériel plus homogène comme origine, les écotypes italiens de luzerne, différents auteurs (PUPILLI *et al.*, 2000 ; ZACCARDELLI *et al.*, 2003) ont montré que la variation entre différentes accessions d'un même écotype était supérieure à celle entre écotypes et que cette variation portait principalement sur des marqueurs communs mais présents en différentes fréquences dans les populations plutôt que sur des marqueurs spécifiques à une population donnée. D'autre part, RIDAY et BRUMMER (2002), dans un croisement diallèle comprenant des génotypes de *Medicago sativa* et de *Medicago falcata*, trouvent que les hybrides interspécifiques ont des productions supérieures aux croisements intraspécifiques et sont les seuls qui présentent des effets significatifs d'aptitude spécifique à la combinaison (ASC). L'ensemble de ces données indique que **les ressources génétiques de luzerne actuellement utilisées dans l'amélioration sont, en partie, le résultat d'un mélange entre plusieurs souches** dont la diversité génétique s'est ensuite répandue à l'intérieur du complexe. Deux questions se posent alors : d'une part, quels sont les outils qu'on peut mettre en place pour augmenter et gérer la diversité génétique ? d'autre part, comment l'utiliser dans le processus de construction des variétés ?

A ce propos, il est d'abord important de définir le type de variété en relation avec les nécessités du monde agricole et agro-industriel qui va l'utiliser. **L'exploitation de la luzerne dans les systèmes agricoles "intensifs" demande des variétés à haute spécialisation pour lesquelles le caractère homogénéité est fondamental.** A l'Institut de Lodi, ROTILI a commencé, dès la fin des années 60, à réfléchir à la mise au point d'une méthodologie d'amélioration cohérente avec ce but. L'homogénéité d'une variété doit être considérée par rapport à la plante et aux relations entre plantes dans la prairie (structure d'une prairie) face à l'ensemble de l'environnement où le facteur "coupe" joue un rôle déterminant. ROTILI et ZANNONE (1975) ont montré qu'il y avait toujours pour la production de matière sèche une corrélation négative et très significative entre la moyenne et le coefficient de variation intra-génotype de familles de luzerne ; il en était de même pour des génotypes en mélanges et en parcelles pures où le mélange augmentait la variabilité mais non le rendement. Cette relation négative était due à l'**existence généralisée, en culture dense, de situations de compétition (+,-) soit au niveau des individus, soit**

au niveau des familles : un génotype vigoureux en culture pure gagnait en mélange par rapport à sa performance en parcelle pure ; le contraire se passait pour le partenaire de vigueur inférieure (figure 1a). La compétition était expliquée par le fait que, à densité numérique identique, chaque partenaire se trouvait à différentes "densités biologiques", déterminées par le rapport entre la demande des individus qui l'entourent et la disponibilité de l'environnement. Un génotype a donc un meilleur rendement en mélange qu'en parcelle pure parce qu'il se trouve alors à une densité biologique plus faible qu'en parcelle pure du fait, par exemple, d'un partenaire de vigueur inférieure. L'objectif de **réduire les phénomènes de compétition entraîne donc la recherche d'une forte homogénéité et d'une forte synchronie des plantes individuelles, surtout pour les caractères qui sont en relation avec la réponse à la coupe**. Un modèle de variété idéal où tous les individus posséderaient le même nombre de tiges de même hauteur réduirait fortement la compétition à l'égard de la lumière en culture dense, en favorisant le passage de situations de compétition à une situation de neutralisme (0,0) entre individus (figure 1b). Au niveau de la structure d'une luzernière, c'est-à-dire des relations entre plantes dans la prairie, il s'agirait de passer d'une structure "polystratifiée", résultant de la compétition entre individus (figure 2a), à une structure idéale "monostratifiée", résultant d'une situation de neutralisme (figure 2b). Un modèle variétal tendant à réaliser cette homogénéité doit utiliser un nombre réduit de constituants ; cela implique aussi de trouver des stratégies efficaces d'amélioration de la valeur propre des parents et d'exploitation de la diversité génétique pour limiter les effets de la consanguinité.

FIGURE 1 : Situations de compétition (a) et neutralisme (b) entre 2 partenaires (P1 et P2) par l'approche des réponses plastiques : évolution au cours des coupes du rapport (R) performance en mélange/performance en culture pure.

FIGURE 1 : Situations de a) compétition et b) neutralisme between 2 partners (P1 and P2) revealed by the approach of plastic responses : evolution, over successive cuts, of the ratio (R) of performance in a mixed sward to performance in a pure sward.

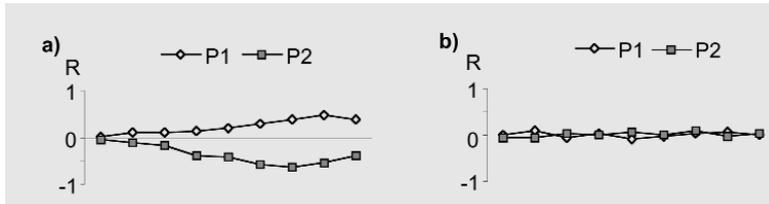
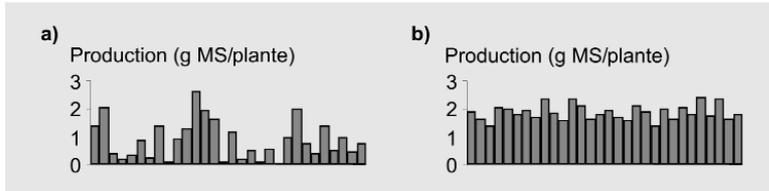


FIGURE 2 : Structure d'une section de luzernière : a) polystratifiée, résultant d'une situation de compétition ; b) monostratifiée, résultant d'une situation de neutralisme entre plantes.

FIGURE 2 : Structure of a lucerne crop section : a) polystratified, resulting from a situation of competition, b) monostratified, resulting from a situation of neutralism.



1. Enrichissement et gestion de la diversité génétique

Mises à part les approches biotechnologiques (culture *in vitro*, hybridation interspécifique par fusion de protoplastes, transformation génétique) qui ne seront pas traitées ici et pour lesquelles il n'y a pas encore des résultats significatifs au niveau variétal, les voies utilisables pour l'enrichissement de la diversité génétique se tournent vers

la recherche de ressources génétiques chez les sous-espèces pures. RIDAY et BRUMMER (2002), en mettant en évidence des effets d'hétérosis dans des croisements *sativa x falcata*, proposent de développer un programme d'amélioration des ressources génétiques de *M. falcata* avec l'objectif d'en tirer des lignes "élites" à utiliser en croisement avec *M. sativa*. **À l'Institut de Lodi, au contraire, nous avons choisi d'exploiter des écotypes d'oasis du Sahara de *M. sativa ssp. sativa* sous l'hypothèse** qu'ils soient indemnes de toute introgression par *M. falcata* **et qu'ils puissent constituer une source de différenciation génétique originale** du fait de l'amélioration traditionnelle de ces populations.

L'autre méthode utilisée à l'Institut de Lodi **pour gérer la diversité génétique de départ est l'autofécondation associée à la sélection pour la vigueur en condition de densité** (ROTILI *et al.*, 1999). ROTILI (1976) a étudié des croisements diallèles entre parents ayant été obtenus après plusieurs cycles d'autofécondation ($S_0 - S_4$) et sélection divergente intra-familiale pour la vigueur (production de matière sèche supérieure à la moyenne de plus de 2 fois l'écart type). Il montre que : a) l'autofécondation et la sélection augmentent la moyenne et la variabilité des hybrides simples entre S_2 ; b) l'avantage productif se transmet à la génération synthétique suivante (Syn2) ; c) les variances d'aptitude générale et spécifique à la combinaison (AGC et ASC) augmentent avec l'autofécondation jusqu'au niveau S_2 ; de plus, la variance d'ASC n'est significative qu'aux niveaux S_2 et S_4 . P. ROTILI expliquait les résultats obtenus par **l'hypothèse suivante : la phase d'autofécondation a pour effet de réduire le poids du niveau d'hétérozygotie dans l'expression de la vigueur mais d'augmenter le poids relatif de la valeur propre des gènes et linkats** (DEMARLY, 1979). La sélection pour la vigueur à l'intérieur des familles partiellement consanguines peut soit maintenir l'hétérozygotie encore présente, soit porter sur la valeur propre des gènes et linkats favorables dont la fréquence se trouve alors augmentée à la génération suivante.

Dans le cas de réponse positive à la sélection, c'est-à-dire où la vigueur des hybrides simples et des synthétiques (Syn2) augmentait avec l'autofécondation, ROTILI (1976) concluait que **la vigueur repose plus sur la valeur propre des gènes et linkats que sur le niveau d'hétérozygotie**. WOODFIELD et BINGHAM (1995), en étudiant des populations tétraploïdes à deux allèles seulement par doublement chromosomique de diploïdes hétérozygotes, concluent aussi que la consanguinité associée à la sélection aboutit à l'accumulation d'allèles et linkats favorables avec des effets aussi bien additifs que dominants.

Du point de vue de la diversité génétique, autofécondation et sélection pour la vigueur ont pour effet de **distribuer puis de concentrer chez différents individus les gènes et linkats favorables des caractères complexes**. Cela permet aussi d'approfondir l'analyse de la diversité génétique intra-population. Une conséquence de ce processus de distribution et concentration est non seulement d'améliorer la valeur propre des parents, liée à la variance de l'Aptitude Générale à la Combinaison (AGC), mais aussi de faire émerger le rôle des interactions de dominance, non additives, entre

La diversité génétique au sein des variétés : une richesse ou un problème ?

gènes et linkats liées à la variance d'ASC. Cela est particulièrement important vu le rôle que la variance non additive joue dans l'expression des caractères complexes chez les tétraploïdes.

2. Le rôle de la diversité génétique dans le processus de construction des variétés

DEMARLY (1969), traitant de la sélection des variétés synthétiques, écrivait que "une bonne variété se définit comme un compromis harmonieux entre une forte moyenne de production, une homogénéité technologiquement satisfaisante du produit utilisé, une réserve de variabilité permettant une meilleure exploitation du milieu et une meilleure adaptation". On retrouve la diversité génétique au cœur de ces différents aspects qui caractérisent, selon DEMARLY, une bonne variété : a) dans l'exploitation des aptitudes générale et spécifique à la combinaison qui interviennent positivement sur la valeur variétale ; b) dans l'effet de consanguinité qui au contraire agit négativement sur le progrès attendu ; c) dans l'effet du degré d'homogénéité des structures génétiques au niveau de l'individu et entre individus dans la prairie ; d) dans le degré de variabilité intra-population dont les modèles de variété disposent.

■ Exploitation des aptitudes générale et spécifique à la combinaison

A partir des années 90, ROTILI à l'I.S.C.F. de Lodi s'est posé le problème des modèles variétaux les plus performants pour l'amélioration de la vigueur. Il a proposé un **modèle semi-hybride c'est-à-dire sans contrôle de l'hybridation** (ROTILI *et al.*, 1996) ; deux modèles de semi-hybrides, à 4 et 8 constituants S₂ et dont la généalogie est indiquée dans le tableau 1, ont été particulièrement étudiés (ROTILI *et al.*, 1999). L'ensemble des croisements a été fait à la main en apportant un excès d'allopollen ; une sélection pour la vigueur a été effectuée à chaque génération de croisement/multiplication pour le passage à la génération suivante.

Un essai de comparaison a été effectué, en serre, sur un ensemble de semi-hybrides à 4 et 8 constituants, leurs parents respectifs et les synthétiques correspondantes. Pour les semi-hybrides et les synthétiques à 4 constituants, deux diallèles, A et B, ont été réalisés. La diversité génétique qu'ils mettaient en jeu était maximale au sens

TABEAU 1 : Plan de construction des semi-hybrides et des synthétiques correspondantes.

TABLE 1 : Construction plan for semi-hybrids and the corresponding synthetics.

| 4 constituants | | 8 constituants | |
|-------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|----------------------|
| A B C D S ₂ | | E F G H I L M N S ₂ | |
| Croisement diallèle* | | Croisement diallèle* | |
| 6 2S ₂ HS (Syn1) | 4S ₂ Syn1 | 16 2S ₂ HS | 8S ₂ Syn1 |
| ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| 6 2S ₂ Syn2 | 4S ₂ Syn2 | 8 4S ₂ HDF ₁ | 8S ₂ Syn2 |
| ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| 6 2S ₂ Syn3 | 4S ₂ Syn3 | 8 4S ₂ HDF ₂ | 8S ₂ Syn3 |
| Diallèle | ↓ | Diallèle | ↓ |
| 15 4S ₂ HDF ₁ | 4S ₂ Syn4 | 28 8S ₂ HQF ₁ | 8S ₂ Syn4 |

* HS=Hybride Simple; HD=Hybride Double; HQ=Hybride Quadruple

où les constituants S_2 provenaient tous de populations éloignées du point de vue géographique et biologique. Chez les semi-hybrides et synthétiques à 8 constituants, différents niveaux de diversité génétique des constituants S_2 ont été mis en place : un niveau maximal, par une origine différente pour chaque constituant S_2 (diallèle C) ; un niveau intermédiaire, par deux cultivars du nord de l'Italie en proportions équilibrées entre S_2 (diallèle E) ; un niveau minimal, où tous les constituants dérivait déjà d'une unique variété synthétique à 8 constituants S_2 (diallèle D).

Les deux modèles de semi-hybrides différaient nettement dans leurs composantes de la variance génétique : bien que les variances d'AGC et d'ASC étaient toujours hautement significatives, la variance d'ASC représentait toujours la première source de variation entre semi-hybrides à 4 constituants. Ces mêmes hybrides montraient aussi des valeurs d'hétérosis par rapport au meilleur parent positives et significatives (+ 49 et + 33% en moyenne pour les deux groupes A et B), tandis que chez les hybrides à 8 constituants, l'hétérosis par rapport au meilleur parent était en général non significatif ou négatif (-10, -11 et -16% chez les groupes C, D et E respectivement).

L'ensemble de ces résultats suggère que **la combinaison de 4 constituants S_2 améliorés, et hautement différenciés par leur origine génétique, permet de faire exprimer et d'évaluer les situations d'interaction entre linkats partiellement homozygotes pour en identifier les plus favorables**. En absence d'autofécondation, les seuls cas reportés d'effets significatifs d'ASC se réfèrent à des croisements entre populations très éloignées et, dans certains cas, appartenant à des sous-espèces différentes (BUSBICE et RAWLINGS, 1974 ; RIDAY et BRUMMER, 2002). En contraste, avec le même modèle de semi-hybride à 4 constituants S_2 mais à un niveau de diversité génétique des composants plus réduit, ROTILI et ZANNONE (1977b) trouvaient une prépondérance des effets d'AGC par rapport à ceux d'ASC. Il semble donc que l'utilisation de parents partiellement consanguins (S_2), tirés de populations fortement divergentes, puis leur combinaison dans un modèle semi-hybride à 4 constituants permettent d'optimiser les effets de dominance.

■ Diversité génétique et effet de la consanguinité au sein des variétés

L'effet de la consanguinité se pose différemment dans le cas du modèle variétal semi-hybride et dans le cas des synthétiques, variétés dont la structure génétique évolue vers l'équilibre au cours des générations de multiplication. Les croisements diallèles indiqués précédemment ont donné lieu à des populations à différents niveaux de consanguinité suivant que les parents (hybride simple ou double) présentaient ou non des constituants S_2 en commun. L'effet de la consanguinité est **en moyenne significatif dans le cas de semi-hybrides à 4 constituants** (tableau 2) ; cependant, il est aussi possible de trouver des hybrides partiellement consanguins du même niveau de production que celui des meilleurs croisements entre non apparentés. **Chez les semi-hybrides à 8 constituants** (groupes C et

La diversité génétique au sein des variétés : une richesse ou un problème ?

TABEAU 2 : Effet de la consanguinité sur la production (g/parcelle) d'hybrides à 4 et 8 constituants. Moyennes de 5 + 5 coupes en 2 ans de culture.

TABLE 2 : Effect of inbreeding on the production (g/plot) of hybrids with 4 and 8 constituents. Means of 5 + 5 cuts over 2 years of cultivation.

| Constituants en commun | 4 constituants | | Constituants en commun | 8 constituants | | |
|------------------------|----------------|--------|------------------------|----------------|--------|--------|
| | A | B | | C | D | E |
| 0 | 42,4 a | 45,4 a | 0 | 30,1 ab | 29,8 a | 32,8 a |
| 2/4 | 36,2 b | 37,9 b | 2/8 | 32,1 a | 28,3 a | |
| | | | 4/8 | 28,6 bc | 28,0 a | 31,2 a |
| | | | 6/8 | 27,3 c | 28,0 a | |
| | | | 8/8 | | | 27,6 b |

Dans une même colonne, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes ($P \leq 0,05$ et $P \leq 0,005$, en italique)

E), l'effet de consanguinité affectait la production d'une façon significative bien que l'effet soit tamponné par la structure génétique plus complexe de cette formule par rapport aux hybrides à 4 constituants. Dans le groupe D, enfin, l'effet global du taux de consanguinité, du fait d'une même origine de tous les constituants S_2 , s'est avéré prévalent devant l'effet du degré d'apparentement des parents dans le diallèle (hybrides à 4 constituants ayant 1, 2, 3 ou 4 constituants en commun). Il semble donc qu'avec un modèle variétal à base génétique étroite, comme le semi-hybride à 4 constituants, les croisements entre deux hybrides simples non apparentés (aucun constituant S_2 en commun) sont en moyenne favorables à l'expression de la vigueur ; cependant, il est possible que certaines interactions (complémentarité positive) puissent contrebalancer les effets négatifs d'une augmentation de la consanguinité.

Les mêmes constituants S_2 utilisés dans la construction des semi-hybrides ont été croisés par polycross pour l'obtention des **synthétiques à 4 et 8 constituants** correspondants. Pour tous les groupes, la synthèse a été effectuée au départ (Syn1) en utilisant l'ensemble de tous les hybrides simples disponibles (6 et 28 respectivement pour les groupes de semi-hybrides à 4 et 8 constituants). On a donc une seule synthétique correspondant à chaque diallèle et qui a eu une évolution séparée de celle des hybrides dès la génération Syn2. On a comparé l'effet de consanguinité au cours des générations de multiplication Syn3 et Syn4 des différentes synthétiques (tableau 3) : dans le cas des synthétiques à 4 constituants, la chute de production entre les deux générations peut être expliquée par l'hypothèse qu'un niveau maximal d'hétérozygotie était atteint en Syn3 et que la diversité génétique n'était pas suffisante à équilibrer l'effet de la consanguinisation. Au contraire, aucune synthétique à 8 constituants ne montrait une variation significative de production entre Syn3 et Syn4, même si dans le groupe D, à niveau minimal de diversité génétique, il y avait une diminution de production.

TABEAU 3 : Effet des générations de multiplication (Syn3 et Syn4) sur la production (g/parcelle) de synthétiques à 4 et 8 constituants. Moyennes de 5 + 5 coupes en 2 ans de culture. Les synthétiques sont réalisées avec les mêmes S_2 que les hybrides à 4 et 8 constituants du groupe correspondant.

TABLE 3 : Effect of the generation of multiplication (Syn3 and Syn4) on the production (g/plot) of synthetics with 4 and 8 constituents. Means of 5 + 5 cuts over 2 years of cultivation. The synthetics are created from the same S_2 as the hybrids with 4 and 8 constituents of the corresponding group.

| | Groupe | Syn3 | Syn4 |
|----------------|--------|--------|--------|
| 4 constituants | A | 50,1 a | 41,3 b |
| | B | 48,9 a | 41,9 b |
| 8 constituants | C | 41,0 a | 46,9 a |
| | D | 38,1 a | 34,1 a |
| | E | 40,2 a | 40,8 a |

Dans une même ligne, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes ($P \leq 0,05$)

Un essai précédent (ROTILI *et al.*, 1985) sur l'effet de consanguinisation dans les générations Syn1-Syn3 de **synthétiques à 5, 10 et 15 constituants** S_2 à faible niveau de diversité génétique (analogue à celui du groupe D) avait montré une augmentation générale de la production de Syn1 à Syn2 tandis que, dans la génération Syn3, il y avait des cas de diminution du rendement, indépendants du nombre de constituants. La synthétique la plus performante en Syn3 était basée sur 5 constituants. Si la dynamique Syn1-Syn2 était attendue sur la base de la théorie génétique des autotétraploïdes, la diminution en Syn3 pouvait être expliquée par le fait que le maximum d'hétérozygotie est atteint à des générations différentes par chaque synthétique suivant la richesse allélique de leurs constituants. L'augmentation du nombre des parents en elle-même n'est pas suffisante pour équilibrer l'effet de consanguinité dans la génération Syn3. Il semble donc possible de conclure qu'un nombre inférieur à cinq de constituants partiellement consanguins (S_2) et fortement divergents n'est pas suffisant pour limiter les effets de la consanguinité sur le rendement au cours des générations de multiplication Syn2 à Syn4. Au contraire, **avec un nombre de constituants S_2 supérieur à cinq, la diversité génétique des constituants s'avère une méthode efficace pour réduire ces effets de consanguinité.**

Dans notre essai, **les hybrides à 4 constituants étaient en moyenne soit non significativement différents de la synthétique (Syn4) correspondante (groupe B), soit moins performants (groupe A) (tableaux 2 et 3) ; les meilleurs hybrides dépassaient la synthétique de +19% et +25% respectivement dans les deux groupes. Au contraire, les hybrides à 8 constituants montraient des productions moyennes inférieures aux synthétiques (groupes C et E, à divergence maximum et intermédiaire des constituants S_2) ou non significativement différentes (groupe D, à divergence minimum) ; de plus, aucun hybride ne dépassait d'une façon significative la synthétique à 8 constituants correspondante. Chez les hybrides à 4 constituants, les effets de dominance semblent donc parvenir à équilibrer les effets de la consanguinité et, dans certains cas, à les surcompenser.**

Concernant la **production de graines**, d'autres résultats (ROTILI et ZANNONE, 1977a) montrent que ce caractère est **plus sensible à la consanguinité que le rendement en matière sèche** ; dans le cas des hybrides à 4 constituants, il apparaît donc nécessaire de prévoir une forte sélection pour la fertilité parmi les parents ($2S_2$ Syn3).

■ Effet des structures génétiques sur l'homogénéité intra-variétale

Une estimation de la variabilité intra-population des différents modèles variétaux a été faite pour les meilleurs semi-hybrides à 4 constituants, les meilleures familles parentales correspondantes ($2S_2$ Syn3) et les synthétiques correspondantes ($4S_2$ Syn4). Les données se réfèrent à l'essai en serre déjà mentionné, la première année de production après l'implantation (coupes 2 - 5) et pour une densité de culture équivalente à 250 plantes/m².

La diversité génétique au sein des variétés : une richesse ou un problème ?

Les meilleurs **semi-hybrides à 4 constituants** les plus divergents ont montré une variabilité intra-population plus réduite à la fois pour la hauteur de la tige principale et le poids sec par plante ainsi qu'un pourcentage supérieur de plantes fleuries au moment de la coupe et une mortalité inférieure (tableau 4). Bien qu'on s'attende à ce que la synthétique soit plus homogène en moyenne que les hybrides dérivés des mêmes constituants, **les hybrides les plus performants réalisent une bonne homogénéité pour la précocité de floraison qui se reflète aussi sur la mortalité**. Il faut rappeler aussi que la sélection pour la vigueur, exercée au cours de la phase d'autofécondation des constituants S_2 et dans la phase de croisement et multiplication des hybrides simples parentaux ($2S_2Syn3$), a contribué à une convergence des individus au plan de l'architecture de la plante et de la réponse aux coupes fréquentes. ROTILI (1977) en étudiant des croisements diallèles dérivés de parents soumis à plusieurs cycles d'autofécondation et sélection pour la vigueur, a trouvé que la précocité se comportait comme la production de matière sèche, augmentant avec la consanguinité chez les hybrides simples et les synthétiques ($Syn2$) dérivées. Il a expliqué ce résultat par la **forte corrélation positive en culture dense entre vigueur et précocité**. **La consanguinité permet ainsi d'obtenir une homogénéité satisfaisante entre individus pour la morphologie de la plante** (hauteur et nombre de tiges après chaque coupe) **et une meilleure synchronie des plantes** pour le taux de croissance et la précocité de floraison en favorisant le passage de situations de domination entre plantes (+, -) vers des situations de neutralisme (0, 0) (ROTILI, 1979).

| Groupe | Population | C.V. entre plantes | | Plantes fleuries (%) | Mortalité (%) |
|--------|----------------------------------|--------------------|-----------|----------------------|---------------|
| | | Hauteur tige | Poids sec | | |
| A | Semi-hybride ($4S_2HDF_1$) | 29 | 81 | 59 | 8 |
| | Synthétique ($4S_2Syn4$) | 37 | 93 | 51 | 27 |
| | Famille parentale ($2S_2Syn3$) | 48 | 121 | 29 | 53 |
| B | Semi-hybride ($4S_2HDF_1$) | 27 | 82 | 68 | 21 |
| | Synthétique ($4S_2Syn4$) | 36 | 123 | 52 | 65 |
| | Famille parentale ($2S_2Syn3$) | 39 | 93 | 45 | 39 |

TABLEAU 4 : Estimation de la variabilité intrapopulation de différents modèles variétaux (moyennes des coupes 2 - 5 de la 2^e année de culture).

TABLE 4 : *Estimation of the intra-variety variability in different models of cultivars (means of cut 2 - 5 in the 2nd year of cultivation).*

La plus grande précocité et uniformité de floraison, associées à un haut niveau de production, sont des caractéristiques particulièrement intéressantes car elles sont à la base de la longévité d'une luzernière (ROTILI, 1977). De plus, de tels semi-hybrides seraient aussi plus tolérants vis-à-vis d'un régime de coupe anticipé (stade 50% bouton bleu). En tout cas, il semble possible de cumuler dans un modèle variétal semi-hybride à 4 constituants à la fois un haut niveau de diversité génétique des constituants, à la base de l'expression d'effets d'ASC, et une uniformité satisfaisante pour la morphologie et physiologie des plantes.

■ Degré d'hétérozygotie intra-variétal

On peut se demander quelle est l'hétérozygotie moyenne chez les parents ($2S_2Syn3$ et $4S_2HDF_2$) des semi-hybrides à 4 et 8 constituants et **quelle est la contribution de la divergence génétique des constituants S_2 du départ**. L'hétérozygotie moyenne peut estimer le degré

C. Scotti

de variabilité présent chez les parents des semi-hybrides, qui joue un rôle dans l'aptitude à l'exploitation du milieu et dans l'adaptation. Cela est particulièrement important pour les 2S₂Syn3 qui présentent la formule génétique la plus consanguine et qui, en tant que base pour la production de semence de semi-hybrides à 4 constituants, doivent garder une stabilité de production dans différents environnements et conditions. L'estimation a été basée sur une analyse avec 18 marqueurs SSR (*Simple Sequence Repeat*) ou microsatellites dérivés de *M. sativa* et *M. truncatula* (tableau 5).

| Groupe | Population parentale | Nombre de familles et de plantes / famille analysées | Structure génotypique (%) | | | | Nombre moyen d'allèles / locus |
|--------------------|----------------------------------|--|---------------------------|-------|-------|-------|--------------------------------|
| | | | mono | di | tri | tétra | |
| B (4 constituants) | 2S ₂ Syn3 | 6 (5 pl./fam.) | 23,90 | 38,33 | 28,33 | 9,44 | 2,23 ± 0,13 b |
| C (8 constituants) | 4S ₂ HDF ₂ | 8 (7 pl./fam.) | 20,24 | 37,80 | 29,56 | 12,40 | 2,34 ± 0,07 a |
| D (8 constituants) | 4S ₂ HDF ₂ | 8 (7 pl./fam.) | 17,76 | 44,94 | 29,46 | 7,84 | 2,27 ± 0,09 b |
| E (8 constituants) | 4S ₂ HDF ₂ | 8 (7 pl./fam.) | 17,86 | 45,73 | 27,78 | 8,63 | 2,27 ± 0,07 b |

Dans une même colonne, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes (P≤0,05).

Pour un même type de population (parents 4S₂HDF₂ des hybrides à 8 constituants), l'effet de la divergence génétique entre constituants S₂, maximale chez le groupe C, est significatif tant pour le nombre moyen d'allèles par locus que pour la distribution des fréquences des structures génotypiques (test χ^2) ; à niveau de divergence génétique similaire et maximale (groupes B et C), les parents (4S₂HDF₂) des hybrides à 8 constituants ont, comme attendu, une hétérozygotie supérieure aux familles 2S₂Syn3, parents des hybrides à 4 constituants. Cependant, ces dernières gardent une fréquence importante de loci tri et tétragéniques. On doit souligner que les plantes analysées dérivent d'une sélection pour la vigueur à l'intérieur de chaque famille au cours des générations de multiplication, ce qui a pu favoriser les génotypes multigéniques.

Il semble possible de conclure que **des populations construites à partir d'un nombre réduit de constituants, partiellement autofécondés, peuvent maintenir des structures hétérozygotes en proportions importantes** grâce à l'emploi efficace de la diversité génétique au sein du complexe *M. sativa*, à la méthodologie de construction de la variété (emploi de parents S₂ améliorés, types de croisement, évaluation des produits du croisement, sélection pendant la multiplication, etc.) et aux procédures expérimentales utilisées (densité de la culture, régime de coupe, etc.).

Conclusions et perspectives

Chez la luzerne, et en général chez les espèces fourragères, la diversité génétique est une richesse qui doit être d'abord préservée en maintenant séparées les différentes origines de ressources génétiques (BRUMMER, 1999). Dans le cas de la luzerne, qui a la plus longue histoire d'amélioration parmi les espèces fourragères, il semble nécessaire et intéressant du point de vue de l'amélioration, d'étendre la diversité "agronomiquement utile" tant vers la sous-espèce *sativa* que vers la sous-espèce *falcata*.

TABLEAU 5 : Estimation du degré d'hétérozygotie des parents des semi-hybrides à 4 et 8 constituants.

TABLE 5 : Estimation of the degree of heterozygosity in the parents of the semi-hybrids with 4 and 8 constituents.

La diversité génétique au sein des variétés : une richesse ou un problème ?

Au sein des variétés, **la diversité génétique apparaît bien à la fois comme une richesse et un problème**. En effet, dans le cadre d'une agriculture intensive où la transformation industrielle des fourrages a un rôle important, on doit rechercher un modèle variétal caractérisé par une homogénéité phénotypique élevée susceptible d'être atteint par homogénéité génétique la plus grande possible : nombre réduit de constituants, recours à l'autofécondation. Or, pour construire de telles variétés, il est nécessaire de disposer de populations parentales fortement différenciées, cela pour deux raisons principales : a) nécessité d'équilibrer l'effet de la consanguinité lié à l'utilisation d'un nombre réduit de constituants ; b) possibilité d'étudier et utiliser les effets non additifs de dominance liés à l'aptitude spécifique à la combinaison (ASC). Cette part de la variabilité génétique est très importante dans l'expression des caractères complexes chez les tétraploïdes ; elle s'exprime au mieux chez le modèle hybride ou semi-hybride, en particulier chez les combinaisons à 4 constituants S_2 fortement divergents (modèle semi-hybride double) où l'on a montré une prédominance de la variance d'ASC par rapport à celle d'AGC. Cette variance est à la base des valeurs d'hétérosis trouvées et de l'avantage productif de ces hybrides à l'égard des synthétiques correspondantes. Bien que les résultats présentés doivent être confirmés et développés, il semble que deux facteurs ont joué principalement dans l'expression de l'ASC : l'effet de l'autofécondation et de la sélection dans l'amélioration des parents S_2 et la divergence génétique entre les 4 parents. Ainsi on est confronté au **paradoxe** suivant : **la réalisation d'une variété maximisant les performances et l'uniformité génétique nécessite une diversité génétique initiale très élevée. Cette diversité doit être gérée d'une façon cohérente au modèle variétal et au processus de construction de la variété adopté.**

Plusieurs questions restent à considérer :

- Est-il possible de mettre en évidence des effets d'ASC d'importance similaire en absence d'autofécondation ? On ne dispose pas de réponses expérimentales à ce jour ; on peut cependant penser que la probabilité de mettre en évidence des interactions non additives importantes diminue en l'absence d'effets sur la fréquence des gènes et linkats favorables comme ceux apportés par l'autofécondation et la sélection. En effet, dans l'expérience de RIDAY et BRUMMER (2002) où des populations non soumises à l'autofécondation avaient été utilisées, seuls les croisements inter-spécifiques *sativa x falcata* présentaient des valeurs d'ASC et d'hétérosis significatives.

- Est-il envisageable de pousser plus loin la sélection sur la valeur propre par l'autofécondation et la sélection ? ROTILI (1976) ne rapporte pas de résultats positifs de sélections en S_3 et S_4 par rapport à la génération S_2 et explique ce comportement par la perte de cohésion des linkats favorables après un certain nombre de générations de consanguinité ; il conclut que préserver les linkats et les valoriser est un objectif qui doit être pris en compte par la méthodologie de sélection.

- Y a-t-il des moyens efficaces autres que le croisement dialléle pour l'estimation et la prévision des effets non additifs d'hétérosis ? En effet, l'importance des interactions non additives n'est pas en relation

simple avec le degré de divergence génétique des parents mais semble résulter d'une complémentarité, positive ou négative, entre linkats hétérogènes. L'utilisation de marqueurs moléculaires neutres pour estimer la diversité génétique des parents et la mettre en relation avec la performance des croisements n'a pas donné, jusqu'à présent, de résultats utilisables en amélioration (KIDWELL *et al.*, 1999 ; RIDAY *et al.*, 2003). Une approche pourrait être d'identifier les gènes des parents qui s'expriment d'une façon différentielle dans les croisements et donc susceptibles d'être impliqués dans les phénomènes d'hétérosis. Cela permettrait de passer d'une approche "neutre" de l'analyse moléculaire à une approche plus ciblée et potentiellement plus informative.

Intervention présentée aux Journées de l'A.F.P.F.,
"Génétique et prairies",
les 15 et 16 mars 2005.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BRUMMER E.C. (1999) : "Capturing heterosis in forage crop cultivar development", *Crop Sci.*, 39, 943-954.
- BUSBICE T.H., RAWLINGS J.O. (1974) : "Combining ability in crosses within and between diverse groups of alfalfa introductions", *Euphytica*, 23, 86-94.
- CROCHEMORE M.L., HUYGHE C., KERLAN M.C., DURAND F., JULIER B. (1996) : "Partitioning and distribution of RAPD variation in a set of populations of the *Medicago sativa* complex", *Agronomie*, 16, 423-432.
- DEMARLY Y. (1969) : "La sélection des variétés synthétiques", *C.R.V Eucarpia Congress, Milano, Italy*, 269-295.
- DEMARLY Y. (1979) : "The concept of linkat", *C.R. Conference Broadening Genetic Base of Crops*, Wageningen, the Netherlands, 257-265.
- GHERARDI M., MANGIN B., GOFFINET B., BONNET D., HUGUET T. (1998) : "A method to measure genetic distance between allogamous populations of alfalfa (*Medicago sativa*) using RAPD molecular markers", *Theor. Appl. Genet.*, 96,406-412.
- KIDWELL K.K., AUSTIN D.F., OSBORN T.C. (1994) : "RFLP evaluation of nine *Medicago* accessions representing the original germplasm sources for North American alfalfa cultivars", *Crop Sci.*,34,230-236.
- KIDWELL K.K., HARTWECK L.M., YANDELL B.S., CRUMP P.M., BRUMMER E. C., MOUTRAY J., OSBORN T.C. (1999) : "Forage yield of alfalfa populations derived from parents selected on the basis of molecular marker diversity", *Crop Sci.*, 39, 223-227.
- PUPILLI F., LABOMBARDA P., SCOTTI C., ARCIONI S. (2000) : "RFLP analysis allows for the identification of alfalfa ecotypes", *Plant Breeding*, 118, 271-276.
- RIDAY H., BRUMMER E.C. (2002) : "Forage yield heterosis in alfalfa", *Crop Sci.*, 42, 716-723.
- RIDAY H., BRUMMER E.C., AUSTIN CAMPBELL T., LUTH D., CAZCARRO P.M. (2003) : "Comparison of genetic and morphological distance with heterosis between *Medicago sativa* subsp. *sativa* and subsp. *falcata*", *Euphytica*, 131, 37-45.
- ROTILI P. (1976) : "Performance of diallel crosses and second generation synthetics of alfalfa derived from partly inbred parents. I. Forage Yield", *Crop Sci.*,16, 247-251.
- ROTILI P. (1977) : "Performance of diallel crosses and second generation synthetics of alfalfa derived from partly inbred parents. II. Earliness and mortality", *Crop Sci.*,17, 245-248.
- ROTILI P. (1979) : "Contribution à la mise au point d'une méthode de sélection de la luzerne prenant en compte les effets d'interférence entre les individus. I. Etude expérimental de la structure de la luzernière", *Ann. Amélior. Plantes*, 29,353-381.

La diversité génétique au sein des variétés : une richesse ou un problème ?

- ROTILI P., ZANNONE L. (1975) : "Principaux aspects d'une méthode de sélection de la luzerne basée sur des dispositifs qui utilisent la concurrence entre les plantes", *Ann. Amélior. Plantes*, 25, 29-49.
- ROTILI P., ZANNONE L. (1977a) : "Quantitative analysis of fertility in luzerne at different levels of selfing", *Ann. Amélior. Plantes*, 27, 341-354.
- ROTILI P., ZANNONE L. (1977b) : "Performance of diallel crosses among single crosses of luzerne and comparison of double crosses and synthetics derived from the same parental clones", *Ann. Ist. Sper. Colt. Forag.*, IV, 97-113.
- ROTILI P., GNOCCHI G., SCOTTI C., ZANNONE L. (1985) : "Performance of second and third generation synthetics of alfalfa derived from partly inbred parents: forage yield and fertility", *C.R. Eucarpia Fodder Crops Sect. Meet.*, Svalöv, Sweden, 135-141.
- ROTILI P., BUSBICE T.H., DEMARLY Y. (1996) : "Breeding and variety constitution in alfalfa: present and future", *C.R. 16th EGF Meeting*, Grado, Italy, 163-180.
- ROTILI P., GNOCCHI G., SCOTTI C., ZANNONE L. (1999) : "Some aspects of breeding methodology in alfalfa", <http://www.naaic.org/TAG/TAGpapers/Rotili/Rotili.html>.
- WOODFIELD D.R., BINGHAM E.T. (1995) : "Improvement in two-allele autotetraploid populations of alfalfa explained by accumulation of favorable alleles", *Crop Sci.*, 35, 988-994.
- ZACCARDELLI M., GNOCCHI S., CARELLI M., SCOTTI C. (2003) : "Variation among and within Italian alfalfa ecotypes by means of bio-agronomic characters and amplified fragment length polymorphism analyses", *Plant Breeding*, 122, 61-65.

SUMMARY***Does the genetic diversity within cultivars constitute an asset or a problem ?***

This question can be partly answered by considering the particular case of Luzerne, an allogamous autotetraploid forage plant with a long history of improvement through breeding. As a matter of fact, the present genetic resources of luzerne utilized nowadays are made up of a number of different strains.

Present agricultural systems require highly specialized cultivars, for which homogeneity is an essential feature. Under these circumstances, it is difficult to increase the genetic diversity. The Breeding Station at Lodi opted for the utilization of an 'agriculturally useful' diversity in the pure subspecies *sativa* or *falcata*. The utilization of genetic diversity in the process of cultivar creation is discussed with consideration of the following points : a) the utilization of the general and the specific combining abilities, having a positive effect on the value of a cultivar, b) the effect of intensified inbreeding, with a negative effect on the expected progress, c) the level of homogeneity among individual plants and the relationships among different individual plants in the sward, d) the estimation of the level of intra-varietal heterozygosity available in the various genetic formulae according to the level of inbreeding.

The results show that genetic diversity has a balancing effect against increased inbreeding in various models of cultivars (semi-hybrid and synthetic) with a limited number of partly inbred constituents. Moreover, genetic diversity can be used for expressing, studying and utilizing the non-additive interactions linked to the specific combining ability within a semi-hybrid model of cultivar.