

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

C. Scotti

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

Résumé

La discussion du sujet sera centré sur la luzerne (*Medicago sativa*) en tant que modèle pour les espèces fourragères autotétraploïdes allogames et en considération de sa longue histoire d'amélioration qui fait que les problèmes relatifs à l'utilisation des ressources génétiques dans l'amélioration et aux modèles variétaux sont plus poussés que chez d'autres espèces.

Un ensemble de données bio-agronomiques, génétiques et moléculaires 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 répartie par conséquent à l'intérieur du complexe. Deux questions se posent alors : d'une part, quels outils peut-on mettre en place pour augmenter et gérer la diversité génétique ? ; d'autre part, comment l'utiliser dans le processus de construction des variétés. Les systèmes agricoles actuels demandent des variétés à haute spécialisation pour lesquelles le caractère d'homogénéité est fondamental.

L'enrichissement de la diversité génétique n'est pas facile dans ce contexte ; une possibilité est donnée par l'exploration de la diversité 'agronomiquement utile' des sous-espèces *sativa* pure (par exemple, les écotypes des oasis du Sahara) ou *falcata* pure. L'utilisation de la diversité génétique dans le processus de construction des variétés est discuté : a) dans l'exploitation des aptitudes générale et spécifique à la combinaison qui interviennent positivement sur le progrès sélectif atteint par une variété; b) dans l'effet de consanguinisation qui, au contraire, agit négativement sur le progrès attendu ; c) par rapport au degré d'homogénéité au niveau de l'individu et des relations entre individus dans la prairie ; d) dans l'estimation du degré d'hétérozygotie résiduel dont disposent des formules génétiques de différente consanguinité.

Il en ressort que la diversité génétique joue un rôle important pour équilibrer l'effet de consanguinisation chez différents modèles variétaux (semi-hybrides et synthétiques) au nombre de constituants réduit et partiellement consanguins. Mais, de plus, la diversité génétique peut être utilisée pour faire exprimer à fond, étudier et utiliser les interactions non additives entre structures génétiques hétérogènes, liées à l'aptitude spécifique à la combinaison dans un modèle variétal semi-hybride.

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 ; GHERARDI *et al.*, 1998), en travaillant avec différents marqueur moléculaires neutres, ont trouvé que la distinction entre sources de germplasm ou populations n'était pas toujours complète et que 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 intrapopulations du complexe *Medicago sativa* à l'aide de marqueurs RAPD, trouvent 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 avec 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 répartie par conséquent à l'intérieur du complexe. Deux questions se posent alors : d'une part, les outils qu'on peut mettre en place pour augmenter et gérer la diversité génétique ; d'autre part, l'utilisation de la diversité 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 'riches' demande des variétés à haute spécialisation pour lesquelles le caractère d'homogénéité est fondamental. A l'Institut de Lodi, ROTILI a commencé, des la fin des années 60, à réfléchir à la mise au point d'une méthodologie d'amélioration cohérente dans 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 (1975) a montré qu'il y avait toujours une corrélation négative et très significative entre la moyenne et le coefficient de variation intragénotype de familles de luzerne issues de polycross et de croisements diallèles à différents niveaux de consanguinisation ; il en était de même pour des génotypes en mélanges et en parcelles pures où le mélange augmentait la variabilité et non le rendement. Cette relation négative était due à l'existence généralisée de situations de compétition (+,-) soit au niveau des individus, soit au niveau des familles en culture dense ; la compétition était expliquée par la réponse des différents génotypes à la variation de densité biologique (nombre de plantes x biomasse / ressources de l'environnement) que la situation de culture dense comporte. 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. Tout cela aboutirait idéalement à une structure "monostratifiée" de la prairie qui valorise au mieux la valeur génétique des plantes individuelles comme les relations entre plantes dans la prairies (neutralisme 0, 0). Un modèle variétal qui tend à réaliser cette homogénéité doit utiliser un nombre réduit de constituants ; cela suppose de trouver des stratégies efficaces pour l'amélioration de la valeur propre des parents et pour l'exploitation de la diversité génétique nécessaire à contrôler la consanguinisation.

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 font pas le sujet de ce rapport et pour lesquelles il n'y a pas encore des résultats significatifs au niveau des variétés, les voies utilisables pour l'enrichissement de la diversité génétique s'adressent vers la recherche de germplasm 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 lignées "élites" à utiliser en croisement avec *M. sativa*. A l'Institut de Lodi, au contraire, on s'est tourné vers les ressources génétiques de *M. sativa* ssp. *sativa* autochtone des oasis du Sahara, dans l'hypothèse qu'elle soit la seule cultivée nullement introgressée par *falcata* et qu'elle puisse présenter une diversité génétique interne significative à cause de la longue histoire de culture et de reproduction continue par 'population de ferme'.

L'autre outil qu'on utilise 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), en étudiant des croisements dialèles dérivés de parents soumis à différents cycles d'autofécondation ($S_0 - S_4$) et avec sélection divergente pour la vigueur à l'intérieur de chaque famille, a montré que dans le cas des individus vigoureux, avec une production de matière sèche supérieure à la moyenne plus $2s$: a) l'autofécondation et la sélection augmentaient la moyenne et la variabilité des hybrides simples au niveau S_2 (TABLEAU 1) ; b) l'avantage productif se transmettait à la génération Syn2 (synthétiques à 2, 4 et 8 constituants) ; c) les variances liées aux aptitudes générale et spécifique à la combinaison augmentaient avec l'autofécondation jusqu'au niveau S_2 ; de plus, la variance de ASC n'était significative qu'aux niveaux S_2 et S_4 (TABLEAU 2). Il expliquait les résultats obtenus par l'hypothèse suivante : la phase d'autofécondation a l'effet de réduire le poids du niveau d'hétérozygotie dans l'expression de la vigueur et par conséquent d'augmenter le poids relatif de la valeur propre de gènes et linkats (DEMARLY, 1979). En termes de structures génotypiques, en effet, les tétragéniques sont presque complètement éliminées (0,03%) après deux générations d'autofécondation et les structures digéniques, duplex et simplex, représentent le 50% du total. 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 de gènes et linkats favorables, dont la fréquence sera augmentée par l'autofécondation.

TABLEAU 1 – Effet de l'autofécondation sur la moyenne et la variabilité de 28 hybrides simple entre parents à différents niveaux de consanguinisation (g/parcelle). Moyennes de 5 et 4 coupes en 2 ans de culture.

Hybride simple	$S_1 \times S_1$	$S_2 \times S_2$	$S_4 \times S_4$
Moyenne	16,1	18,9	16,6
Intervalle de variation	23,4 - 9,7	30,1 – 10,2	25,6 – 7,1
Ecart type	3,85	5,47	5,07

TABLEAU 2 – Croisements dialèles à différents niveaux d'autofécondation : variances de AGC et ASC pour la production de matière sèche (g/parcelle). Plantes $> x+2s$ issues de sélection positive pour la vigueur. Moyennes de 5 + 4 coupes en 2 ans de culture.

		Génération d'autofécondation			
		$S_0 \times S_0$	$S_1 \times S_1$	$S_2 \times S_2$	$S_4 \times S_4$
1^{ère} année	AGC	11,34 **	12,77**	41,39**	40,16**
	ASC	1,33	2,75	4,45**	6,31**
	Résiduelle	2,47	1,94	1,47	1,46
2^{ème} année	AGC	50,38**	104,78**	181,15**	123,93**
	ASC	13,16	9,85	19,95**	20,49**
	Résiduelle	13,64	8,97	7,12	9,17

**Significatif pour $P=0,01$

Pour les plantes qui réagissaient positivement à la sélection, c'est-à-dire qui donnaient des hybrides simples et des synthétiques Syn2 dont la vigueur augmentait avec l'autofécondation, il concluait que la vigueur reposait plus sur la valeur propre de gènes et linkats que sur le niveau d'hétérozygotie. WOODFIELD et BINGHAM (1995), en étudiant des populations tétraploïdes avec deux allèles seulement issues par doublement chromosomique de diploïdes hétérozygotes, concluent aussi que la consanguinisation 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 l'effet de distribuer puis concentrer successivement dans **différents individus** parentaux gènes et linkats favorables à caractères complexes d'intérêt. Cela se traduit par une augmentation du pouvoir d'analyse de la diversité génétique présente dans une 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 et d'ordre supérieur, non additives, entre gènes et linkats liées à la variance de 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 (1968), 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 le progrès sélectif atteint par une variété ; b) dans l'effet d'inbreeding qui au contraire agit négativement sur le progrès attendu ; c) dans l'effet du degré d'uniformité des structures génétiques au niveau de l'individu et des relations entre individus dans la prairie ; d) dans le degré de variabilité dont un modèle de variété dispose.

– Exploitation des aptitudes générale et spécifique à la combinaison

A partir des années 90, ROTILI à l'ISCF 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** où le terme semi marque le fait que la probabilité d'hybridation entre parents était égale à celle au sein de chaque parent car aucun mécanisme de contrôle de l'hybridation n'était utilisé (ROTILI *et al.*, 1996). En particulier, il a proposé deux modèles de semi-hybrides, à 4 et 8 constituants S_2 dont la généalogie est indiquée dans le TABLEAU 3 (ROTILI *et al.*, 1999).

Tout au cours de la construction des semi-hybrides et synthétiques correspondantes, les croisements ont été faits à la main en apportant un excès d'allopollen et 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 l'ensemble des semi-hybrides à 4 et 8 constituants, les parents respectifs et les synthétiques correspondantes. Pour les semi-hybrides et synthétiques à 4 constituants, deux groupes A et B de croisements diallèles ont été utilisés, à diversité génétique maximale, chaque constituant S_2 provenant 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 : d'un niveau maximal, avec une origine différente de chaque constituant S_2 (groupe C), à un niveau intermédiaire, deux cultivars du nord de l'Italie dans les mêmes proportions (groupe E), et enfin à un niveau minimal où tous les constituants dérivait d'une seule variété synthétique à 8 composants S_2 (groupe D).

TABLEAU 3 – Plan de construction des semi-hybrides et des synthétiques correspondantes.

4 constituants A B C D S ₂ Croisement diallèle		8 constituants E F G H I L M N S ₂ 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

Les deux modèles de semi-hybrides différaient nettement pour la répartition de la variance liée aux croisements (TABLEAU 4) : bien que les variances de AGC et ASC étaient toujours hautement significatives, chez les semi-hybrides à 4 constituants, la première source de variation était représentée par la variance de ASC. 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 significative ou négative (-10, -11 et -16% chez les groupes C, D et E respectivement).

ROTILI et ZANNONE (1977) ont trouvé une priorité de AGC par rapport à ASC dans le cas d'hybrides doubles S₂xS₂ issus de deux populations du nord de l'Italie ; BUSBICE et RAWLINGS (1974) ont mis en évidence des effets de ASC trois fois plus importants que pour AGC pour la production fourragère avec des croisements entre groupes de différentes origine et caractéristiques agronomiques; RIDAY et BRUMMER (2002) trouvent des effets significatifs de ASC dans les croisements *sativa* x *falcata* et non dans les croisements intraspécifiques.

TABLEAU 4 – Variances de AGC et ASC des semi-hybrides à 4 et 8 constituants. Production de matière sèche (g/parcelle). Moyennes de 5 + 5 coupes en 2 ans de culture.

	4 constituants		8 constituants		
	A	B	C	D	E
AGC	243,84****	166,84****	185,16****	193,74****	328,79****
ASC	518,74****	537,17****	130,53****	104,03****	108,28****
Résiduelle	26,02	19,63	24,48	22,65	21,50

****Significatif pour P=0,001

L'ensemble de ces résultats suggère que la combinaison de 4 constituants S₂ améliorés, à haute diversité par la voie hybride simple-hybride double, donne la possibilité de faire exprimer et évaluer les situations d'interaction entre linkats hétérogènes et d'identifier les plus favorables. Une raison semble être la fréquence chez l'hybride de structures di, tri et tétragéniques qui ne sont pas présentes chez les parents 2S₂Syn3 et les relatifs effets de dominance. Pour les hybrides à 8 constituants, d'une part des possibles effets de dominance présents dans la génération 4S₂HDF₁ sont détruits par recombinaison chez les parents 4S₂HDF₂; d'autre part, les structures di, tri et tétragéniques nouvelles

qui peuvent se former chez l'hybride quadruple, en particulier dans le cas de divergence maximum de constituants (groupe C), se répartiraient de façon plus diffuse car elles entraînent 8 constituants au lieu de 4. En effet, la diversité génétique des parents *per se* n'est pas suffisante à entraîner des phénomènes d'hétérosis dans les croisements, comme il est montré dans des études qui comparent la diversité génétique des parents, estimée par marqueurs moléculaires neutres, et la production ou l'hétérosis des croisements (KIDWELL *et al.*, 1999 ; RIDAY *et al.*, 2003). Le modèle semi-hybride double à 4 constituants S₂ de haute diversité génétique semble le plus efficace pour l'étude et la valorisation des effets de dominance.

– Diversité génétique et effet d'inbreeding 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 en équilibre qui présentent une dynamique au cours des générations de multiplication. Chez les deux groupes de semi-hybrides à 4 constituants A et B, le croisement diallèle de 6 familles 2S₂Syn3 (hybrides simples non apparentés multipliés) a donné lieu à des hybrides doubles à différents niveaux de consanguinité du fait d'avoir ou non des constituants en commun. Pour les semi-hybrides à 8 constituants à différents niveaux de diversité génétique, le croisement diallèle a porté sur 8 familles 4S₂HDF₂ par groupe donnant lieu, de même, à des descendance avec différents nombres de parents en commun.

L'effet de consanguinité qu'il en est résulté est en moyenne significatif dans le cas de semi-hybrides à 4 constituants (TABLEAU 5) ; cependant, il était possible de trouver dans des hybrides partiellement consanguins des productions du même niveau que celles des meilleurs croisements non apparentés. Chez les semi-hybrides à 8 constituants des groupes C et E, l'effet de consanguinité affectait la production d'une façon significative bien que l'effet était tamponné par la structure génétique plus complexe de cette formule par rapport aux hybrides à 4 constituants. Dans le groupe D, enfin, le taux de consanguinisation dérivé de la population d'origine s'est avéré prévalent par rapport au degré de consanguinité des croisements.

Il semble donc qu'avec un modèle variétal à base génétique étroite comme le semi-hybride à 4 constituants, les croisements non apparentés soient en moyenne favorable à l'expression de la vigueur ; cependant, la qualité (complémentarité positive) de certaines interactions peut en partie remplacer l'augmentation de la consanguinité.

TABLEAU 5 – 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.

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

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

Les mêmes constituants S₂ utilisés dans la construction des semi-hybrides ont été croisés par polycross pour l'obtention des synthétiques correspondantes à 4 et 8 constituants. Pour tous les groupes, la synthèse a été effectuée au départ en utilisant l'ensemble de tous les hybrides simples (6 et 28 respectivement pour les groupes à 4 et 8 constituants) comme génération Syn1. On a donc une seule synthétique correspondant à chaque groupe de croisement diallèle qui a une évolution séparée de celle des hybrides dès la génération Syn2. On a donc comparé l'effet de consanguinisation au cours des générations de multiplication Syn3 et Syn4 des différentes synthétiques (TABLEAU 6). 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 maximum 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.

TABLEAU 6 – Effet des génération 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 S₂ que les hybrides du groupe correspondant.

	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 sur l'effet d'inbreeding dans les générations Syn1 – Syn3 de synthétiques analogues à celles du groupe D, mais à 5, 10 et 15 constituants S₂ avait montré une augmentation générale de la production de Syn1 à Syn2 (ROTILI *et al.*, 1985). Au contraire, 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 est attendue sur la base de la théorie génétique des autotétraploïdes, la diminution en Syn3 était expliquée par le fait que le maximum d'hétérozygotie était atteint à des générations différentes par chaque synthétique en essais suite à une richesse allélique différente dans l'ensemble des clones parentaux utilisés. Dans le cas de clones partiellement autofécondés et avec une diversité génétique réduite, l'augmentation du nombre des parents n'était pas suffisante pour équilibrer l'effet d'inbreeding dans la génération Syn3. D'après les résultats des synthétiques du groupe C et, en moindre mesure, du groupe E, il semble que la diversité génétique des constituants peut être un outil efficace pour éviter un sévère effet de consanguinisation.

Les hybrides à 4 constituants étaient en moyenne non significativement différents de la synthétique, Syn4, correspondante (groupe B) ou moins performants (groupe A) (TABLEAUX 5 et 6) ; 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) ou non significativement différentes (groupe D, à divergence minimum) ; de plus, aucun hybride ne dépassait de façon significative la synthétique correspondante. Chez les hybrides à 4 constituants, les effets de dominance semblent arriver à équilibrer les effets de consanguinisation et, dans certains cas, à les surcompenser.

On a considéré la production de graines, estimée par le paramètre de la fertilité de la gousse (croisement à la main en cages de pollinisation), des parents 2S₂Syn3 et 4S₂HDF₂ utilisés dans les croisements diallèles pour la production des semi-hybrides et chez les synthétiques de la génération correspondante Syn3 (TABLEAU 7). En passant de 4 à 8 constituants pour les synthétiques et des 2S₂Syn3 à 4S₂HDF₂ pour les parents des hybrides en croisement diallèle, le nombre de graines par gousse augmentait d'une façon significative. De plus, la fertilité de la gousse était significativement supérieure chez les synthétiques par rapport aux parents des semi-hybrides, indépendamment du nombre de constituants. Enfin, dans le groupe D, à divergence minimale, la fertilité était significativement inférieure au groupe E, à divergence intermédiaire.

TABLEAU 7 – Croisements diallèles entre parents 2S₂Syn3 et 4S₂HDF₂ pour la production de semi-hybrides à 4 et 8 constituants et multiplication des synthétiques correspondantes (génétation Syn3) : fertilité de la gousse (nombre moyen de graines/gousse).

	4 constituants			8 constituants			
	A	B	Moyenne	C	D	E	Moyenne
2S ₂ Syn3	2,66	2,87	2,76	3,65	3,05	4,00	3,57
4S ₂ Syn3	3,73	4,18	3,95	4,96	4,44	6,23	5,21

ROTILI et ZANNONE (1977), en travaillant avec des clones à différents niveaux d'autofécondation (S₀ – S₄), ont montré que l'autofécondation et la sélection pour la vigueur produisaient un effet positif sur la production de matière sèche mais négatif sur la fertilité de la gousse. Cet effet, lié au nombre et au taux d'inbreeding des constituants, est particulièrement important dans le modèle variétal semi-hybride. Dans le cas des semi-hybrides à 4 constituants, il semble donc nécessaire de prévoir une forte sélection pour l'aptitude à la production de graines parmi les parents 2S₂Syn3 ; dans le cas des 8 constituants, semi-hybrides ou synthétiques ; aussi bien la diversité génétique que l'aptitude à la production de graines peuvent être utilisés pour garder une haute fertilité de la gousse.

– Effet du degré d'uniformité des structures génétiques au niveau de l'individu et des relations entre individus dans la prairie

Une estimation de la variabilité interne de différents modèles variétaux a été faite pour les meilleurs semi-hybrides à 4 constituants, les meilleures familles parentales 2S₂Syn3 et les synthétiques correspondantes. Les données se réfèrent à l'essai de comparaison en serre déjà mentionné, la première année de production après l'implantation (coupes 2 – 5), avec une densité de culture équivalente à 250 plantes/m² (TABLEAU 8).

Les meilleurs semi-hybrides à 4 constituants de haute diversité génétique ont en même temps montré une variation interne plus réduite pour la hauteur de la tige principale et le poids sec par plante, un pourcentage supérieur de plantes fleuries au moment de la coupe et une mortalité inférieure. Bien qu'on s'attende à ce que la synthétique soit plus homogène que l'ensemble des hybrides dérivés des mêmes constituants, les hybrides **plus performants** réalisent en même temps une bonne homogénéité pour la précocité de floraison qui se reflète aussi sur la mortalité. ROTILI (1977), en étudiant des croisements diallèles dérivés de parents soumis à différents cycles d'autofécondation et sélection pour la vigueur, a trouvé que la précocité se comportait comme la production de matière sèche en augmentant avec la consanguinisation chez les hybrides simples et les synthétiques (Syn2) dérivés. Il a expliqué ce résultat par la forte corrélation positive en culture dense entre vigueur et précocité.

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 qu'un haut niveau de diversité génétique organisée dans un modèle de variété assez contrôlé comme celui des semi-hybrides à 4 constituants (deux phases de croisements dirigés, séparées par la multiplication et la sélection des hybrides simples) peut conduire à une meilleure synchronie des plantes pour le taux de croissance et la précocité de floraison, et à une homogénéité satisfaisante entre individus pour la morphologie de la plante (hauteur et nombre de tiges après chaque coupe). Tout cela entraîne une modification positive des relations entre plantes en culture dense en favorisant le passage de situations de domination (+, -) vers de situations de neutralisme (0, 0) (ROTILI, 1979).

TABLEAU 8 – Estimation de la variabilité intrapopulation de différents modèles variétaux (moyennes des coupes 2 – 5 de la 2ème année de culture).

Groupe	Population	C.V. entre plantes		Plantes fleuries (%)	Mortalité (%)
		Hauteur tige	Poids sec		
A	4S ₂ HDF ₁	29	81	59	8
	4S ₂ Syn4	37	93	51	27
	2S ₂ Syn3	48	121	29	53
B	4S ₂ HDF ₁	27	82	68	21
	4S ₂ Syn4	36	123	52	65
	2S ₂ Syn3	39	93	45	39

– Degré d'hétérozygotie résiduel

On peut se demander quelle est l'hétérozygotie résiduelle dans les parents 2S₂Syn3 de semi-hybrides à 4 constituants et dans les parents 4S₂HDF₂ des semi-hybrides à 8 constituants, et quel rôle joue le niveau différent de diversité génétique des constituants S₂ du départ. L'hétérozygotie résiduelle peut estimer le degré de variabilité de réserve 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 plus consanguine et qui, en tant que base pour la production de semence semi-hybride, doivent garder une stabilité de production dans différents environnements et conditions. L'estimation est basée sur une analyse avec 18 marqueurs SSR (Simple Sequence Repeat) ou microsatellites dérivés de *M. sativa* et *M. truncatula* (TABLEAU 9).

Pour le même type de population (4S₂HDF₂), l'effet de la diversité génétique des 8 constituants S₂ d'origine, maximale chez le groupe C, est résulté significatif tant pour le nombre moyen d'allèles/locus que pour la distribution des fréquences des structures génotypiques (test χ^2) ; pour un niveau de diversité génétique similaire et maximale (groupes B et C), les 4S₂HDF₂ ont, comme attendu, une hétérozygotie supérieure aux familles 2S₂Syn3. Cependant, ces dernières, qui représentent les parents des semi-hybrides à 4 constituants, 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.

En général, il semble possible de pouvoir conclure que même des populations à nombre réduit de constituants et partiellement autofécondés peuvent maintenir des structures hétérozygotes en des proportions importantes, grâce à un emploi efficace de la diversité génétique, 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.).

TABLEAU 9 – Estimation du degré d'hétérozygotie des parents des semi-hybrides à 4 et 8 constituants.

Groupe	Type de population	No.	Structure génotypique				Hétérozygotie moyenne / famille
			mono	di	tri	tétra	
B	2S ₂ Syn3	6 (5 pl./fam.)	23,89	38,33	28,33	9,44	2,23 ± 0,13 b
C	S ₂ HDF ₂	8 (7 pl./fam.)	20,24	37,80	29,56	12,40	2,34 ± 0,07 a
D	S ₂ HDF ₂	8 (7 pl./fam.)	17,76	44,94	29,46	7,84	2,27 ± 0,09 b
E	S 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).

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 souches de germplasm (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" vers la sous-espèce *sativa* comme vers *falcata*.

Le problème le plus important, et le plus controversé, semble être comment gérer cette diversité génétique dans le processus d'élaboration des variétés. En effet, pour aboutir à des variétés performantes et homogènes, il est nécessaire de disposer de populations parentales de forte divergence. Cela pour deux raisons principales : a) la nécessité d'équilibrer l'effet de consanguinisation lié à l'utilisation d'un nombre réduit de constituants ; b) la possibilité d'étudier et utiliser les effets non additifs de dominance liés à l'aptitude spécifique à la combinaison au moyen du modèle semi-hybride. Cette partie de variabilité semble très importante dans l'expression de la vigueur des semi-hybrides à 4 constituants étudiés, et à la base des valeurs d'hétérosis qu'ils présentent et de l'avantage productif à l'égard de la synthétique correspondante. Bien que les résultats présentés doivent être confirmés et développés, il semble que deux facteurs ont joué principalement dans l'expression de ASC : l'effet de l'autofécondation et de la sélection dans l'amélioration des parents S_2 et la divergence des 4 parents. Est-ce qu'il est possible de mettre en évidence des effets de ASC d'importance similaire avec du matériel non consanguin ? On n'a pas de réponse expérimentale, mais on peut observer que, dans l'expérience de RIDAY et BRUMMER (2002), seulement les croisements interspécifiques *sativa* x *falcata* présentaient des valeurs de ASC et d'hétérosis significatives. Est-ce qu'il est envisageable de pousser plus loin la sélection sur la valeur propre par l'autofécondation et la sélection ? ROTILI (1976) ne rapporte pas des résultats positifs de la sélection en S_3 et S_4 par rapport à la S_2 et explique ce comportement par la perte de cohésion des linkats favorables après un certain seuil 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. Un problème important réside dans le fait que la présence d'interactions non additives ne présente pas une relation simple avec le degré de diversité génétique des parents, mais se configure plutôt comme une complémentarité, positive ou négative, entre linkats hétérogènes. Est-ce qu'il y a des moyens efficaces autres que le passage par le croisement diallèle pour l'estimation et la prévision des effets non additifs d'hétérosis ? Il nous semble que 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 ce jour, des résultats utilisables dans l'amélioration (RIDAY *et al.*, 2003). Une approche pourrait être envisagée par l'individuation des gènes des parents qui s'expriment d'une façon différentielle dans les croisements, susceptibles donc d'être impliqués dans les phénomènes d'hétérosis. Cela pourrait permettre de passer d'une approche "neutre" d'analyse moléculaire à une approche plus ciblée et potentiellement plus informative.

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., 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. (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., 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. (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.
- ROTILI P., GNOCCHI G., SCOTTI C., ZANNONE L. (1985): "Performance of 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.