HAL
open science

DArTClimate : Développement d'outils moléculaires dédiés à l'amélioration des complexes d'espèces fourragers en réponse au changement climatique

Marc M. Ghesquière

To cite this version:

Marc M. Ghesquière. DArTClimate : Développement d'outils moléculaires dédiés à l'amélioration des complexes d'espèces fourragers en réponse au changement climatique. Séminaire AIP Bio-ressources 2010-2011, Institut National de Recherche Agronomique (INRA). US Etude du Polymorphisme des Génomes Végétaux (1279)., Feb 2013, Paris, France. 200 p. hal-02749059

HAL Id: hal-02749059

https://hal.inrae.fr/hal-02749059

Submitted on 3 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

année(s) AIP : 2011

responsable scientifique du projet : Marc Ghesquière
e-mail : Marc.Ghesquiere@lusignan.inra.fr

Coordonnées

Unité : URP3F Centre : Poitou-Charentes Département : GAP

Collaborations

UMR AGAP CIRAD-BIOS TA A108/03, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France

Nature du financement

Génotypage

Objet du financement

Espèce(s) concernée(s) : *Dactylis* sp. – *Festuca* sp. – *Lolium* sp. - *Medicago* sp

Titre du projet : Développement d'outils moléculaires dédiés à l'**A**mélioration des complexes d'espèces fourragers en **R**éponse au changement clima**T**ique (**DArTClimate**)

Résumé:

Introduction

Le projet a pour objectif de développer une ressource en marqueurs *DArT* (Diversity Array Technology) chez les quatre espèces fourragères d'importance économique majeure : une légumineuse, la luzerne (*M. sativa*) et trois graminées, dactyle (*D. glomerata*), fétuque élevée (*Festuca* sp.) et ray-grass (*Lolium sp.*). Ces espèces ont en effet des caractéristiques biologiques et génétiques qui n'ont pas permis l'émergence des outils moléculaires au même rythme que les principales espèces cultivées même si l'exploitation de la synténie avec des espèces modèles apparentées et séquencées aboutit actuellement à des avancées indéniables (Pfeifer et al. 2012).

Un effort de recherche concentré au niveau diploïde (*M. truncatula*, *L. perenne, F. pratensis*) conduit à abandonner le compartiment polyploïde de ces espèces, réduit à l'utilisation de polymorphismes de type *AFLP*, mais dont on connaît les limites en matière de portabilité des méthodes et transférabilité des résultats pour un approfondissement des déterminismes et/ou une utilisation partagée en amélioration.

Le développement d'un outil moléculaire robuste et à géométrie variable d'utilisation, autant dans la diversité des questions de recherche que dans celle du matériel végétal, paraissait donc indispensable. La *Diversity Array Technology* (*DArT*) initiée par A. Kilian (Jaccoud et al 2001) puis introduite sur la plateforme du CIRAD/Montpellier pour l'amélioration de nombreuses espèces tropicales polyploïdes et/ou «orphelines» en génomique, répondait précisément à ce cahier des charges. A ce jour, le polymorphisme *DArT* n'a été développé que chez le complexe *Festuca* / *Lolium*, 3 et 2 espèces (resp.), avec la production d'un micro-array (*DArTFest*) de 3 884 clones polymorphes sur un total de 7 680 clones, sans distinction toutefois de l'origine génomique de ceux-ci (Kopecký et al. 2009). Leur utilisation s'est limitée actuellement à de la cartographie sur 3 espèces et au niveau diploïde, *F. pratensis* et *L. multiflorum* (Bartoš et al 2011) et *L. perenne* (Tomaszewski et al 2012), et à la description de variétés hybrides *Festuca* x *Lolium* (*Festulolium*), (Kopecký et al 2011). Il est intéressant de noter que l'application du marquage *DArT* aux hybrides *Festulolium* est venue enrichir significativement des aspects de cartographie physique des chromosomes (Kopecký et al. 2009) et la caractérisation d'introgression en relation avec la tolérance au froid (Bartoš et al 2011), jusqu'à présent limités à une seule approche de cytogénétique moléculaire par hybridation génomique in-situ (*GISH*).

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Le matériel végétal des 4 espèces a été sélectionné au cours de l'année 2011 et depuis lors, maintenu par clonage à URP3F. Pour chaque espèce, la diversité a été échantillonnée de façon à couvrir, sinon toute la diversité des complexes d'espèces, au moins celle des sous-espèces compatibles en croisement et/ou d'intérêt pour l'amélioration ; c'est ainsi que l'ensemble de la série polyploïde de la fétuque élevée a été échantillonnée, de 2n=2x=14 à 2n=10=70 (Tab. 1). Dans le cas de populations spontanées, le choix s'est basé sur une diversité d'origine géographique, notamment entre type d'origine tempérée et méditerranéenne ayant divergé chez une même espèce (*D. glomerata* et *Festuca* sp.), et une diversité des obtenteurs dans le cas de variétés cultivées.

	Production de clones				Plaque test
	Espèce	Ploïdie	Nb pop/var.	Nb ind.	Nb ind.
Luzerne	*Medicago sativa sativa* L.	4x	9 variétés	21	21
	Medicago sativa falcata L.	4x	1 variété	2	1
			Total : 10	23	22
Dactyle	*Dactylis glomerata glomerata/hispanica* L.	4x	10 variétés	34	11 + 12
			22 populations	22	
			Total : 23	56	23
Fétuque	*Festuca pratensis* Hudson	2x	2 variétés	10	4 + 4
	Festuca arundinacea var. glaucescens Boiss.	4x	6 populations	15	15
	Festuca arundinacea var. genuina Schreb.	6x	8 variétés	8	
			6 populations	6	
	Festuca arundinacea var. atlantigena St. Yves	8x	2 populations	4	
	Festuca arundinacea var. letourneuxiana St. Yves	10x	6 populations	10	
			Total : 30	53	23
Ray-grass	*Lolium perenne* L.	2x	20 populations	20	6
		4x	4 variétés	4	4
	Lolium multiflorum Lam.	2x	5 variétés	10	
		4x	8 variétés	16	6 x 2
			Total : 37	50	22

Tab. 1 : Echantillonnage de la diversité inter- et intraspécifique pour la production de 15 360 clones chez 4 espèces fourragères et le test croisé espèce x marqueur (1 536 clones/espèce).

Extraction ADN

Pour chaque individu, environ 50 mg de matière fraîche de limbe foliaire sont prélevés puis séchés en présence de silicagel, 2 x 24 h, directement en plaque 96 et stockage à 4°C. Après broyage en plaque au broyeur à billes, l'extraction d'ADN est réalisée dans du tampon Tris 0.1 M pH 7.5 – NaCl 0.7 M - EDTA 0.05 M – CTAB 2% - Bisulfite 1% et RNAse à 10 µg/ml. La concentration des échantillons en ADN et sa qualité sont visualisées après dépôt de 2 µl par individu sur gel d'agarose à 0.8 % et électrophorèse. La concentration est ensuite ajustée de façon à envoyer à la plateforme du CIRAD 1 µg d'ADN par individu sous des concentrations variant de 25 à 100 ng/µl.

Préparation de la banque

Chaque échantillon d'ADN (100 ng) est d'abord restreint dans un tampon contenant 10 mM Tris OAc, 50 mM KOAc, 10 mM $Mg(OAc)_2$ et 5 mM DTT avec 2 unités de l'enzyme à coupure rare *Pst*I et 2 unités de l'enzyme à coupure fréquente *Taq*I (NEB, Beverly, USA). Les produits de restriction sont ligués à des adaptateurs *Pst*I (5'-CACGATGGATCCAGTGCA-3' ; 5'- CTGGATCCATCGTGCA-3') avec 2 unités de T4 DNA ligase (NEB). 1 µl de cette réaction est utilisé pour la préparation de 50 µl d'amplification PCR à l'aide d'amorces complémentaires de la séquence des adaptateurs (5'- GATGGATCCAGTGCAG -3'). Plusieurs conditions d'amplifications PCR ont été testées par 20 à 30 cycles afin d'obtenir un *smear* homogène et de faible

intensité. 5µl des produits de chaque amplification sont alors déposés sur gel d'agarose à 1.2% afin de contrôler la qualité des PCR. Les amplifications PCR ont été réalisées avec 20 cycles pour les échantillons de dactyle, fétuque et ray-grass, et 23 cycles pour la luzerne, afin de limiter le nombre de fragments redondants dans les représentations génomiques.
L'ensemble des 23 génotypes de Luzerne, 56 de Dactyle, 53 de Fétuque et 50 de Ray-grass ont été ensuite mélangés, espèce par espèce, afin de constituer les 4 représentations génomiques à partir du pool de 2 µl de chaque produit PCR, puis clonés dans le vecteur PCR 2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) et insérés dans E.Coli DH10Bα (Invitrogen, Carlsbad, California.USA). Les clones sont disposés en plaque de stockage 384 dans du 2YT avec 100 µg/ml d'ampicilline. Pour chacune des 4 banques, 15 360 clones ont été produits.

Test des 4 représentations et hybridation sur microarray.
1 536 clones parmi chacune des 4 représentations génomiques *Pst*I/*Taq*I, Luzerne, Dactyle, Fétuque et Ray-grass, ont été échantillonnés au hasard afin de constituer une puce DArT de 6 144 clones, sur lesquels ont été testés 90 individus choisis de façon équilibrée entre les 4 espèces (Tab. 1).
Les produits PCR préparés en duplicat (2 x 96 réactions) et suivant le même protocole de réduction de la complexité des génomes, sont précipités dans 1 volume d'isopropanol, lavés avec de l'éthanol 70%, séchés et resuspendus dans 2 µl d'eau. Après 3 minutes de dénaturation à 95°C, les échantillons sont marqués avec l'enzyme de Klenow polymerase I (NEB). Chaque réaction de marquage contient 1X de tampon 2 (NEB), 0.2 mM de chaque dNTP, des decamer (MWG), 0.1-mM Cy3-dUTP et/ou Cy5-dUTP (Amersham, NJ, USA) et 5 unités d'enzyme de Klenow. Ces réactions sont incubées 3h à 37°C.
Ces représentations marquées sont ensuite mélangées en proportion 50:5:1 à du tampon ExpressHyb (Clontech, CA, USA), 10 g/l d'ADN de sperme de hareng (Promega) et une préparation du fragment du polylinker du vecteur TOPO marqué au fluorochrome FAM servant de référence.
Apres dénaturation, l'ADN de chaque individu de la plaque test est hybridé sur le microarray ainsi préparé puis laissé toute une nuit à 62°C. Les lames sont lavées successivement dans 4 solutions de lavage (1X SSC, 0.1% SDS pendant 5 min, 1X SSC pendant 5 min, 0.2X SSC pendant 2 min et 0.02X SSC pendant 1 min), puis séchées.

Génotypage
Les lames hybridées sont ensuite scannés à l'aide d'un scanner Tecan LS300 reloaded (Grödig, Salzburg, Austria), sous 3 longueurs d'onde, 635 nm pour le fluorochrome Cy5, 532nm pour le fluorochrome Cy3 et 488 nm pour le FAM. Chacune de ces lames est analysée de façon individuelle à l'aide du logiciel DArTsoft 7.4 (Diversity Arrays Technology P/L, Canberra, Australia). Les marqueurs sont codés en ''1'' pour la présence du fragment dans la représentation génomique, ''0'' pour l'absence, et ''-'' lorsque le logiciel DArTsoft n'arrive pas à déterminer avec confiance la présence du marqueur (Wenzl et al. 2004). A chacun de ces marqueurs sont également associés des critères de qualité : le *call rate*, pourcentage d'individus à score validé ''0'' ou ''1'' - le *polymorphism information content* (PIC) calculé comme 2 $m_i(1-m_i)$ avec m_i, la fréquence des scores ''1'' pour le marqueur i dans la plaque test - la P et Q value, pourcentage de la variance totale inter cluster ''0'' vs ''1'' et enfin, le pourcentage de reproductibilité calculé à partir des échantillons présents en double.
Ces critères ne sont pas totalement indépendants de l'homogénéité des individus de la plaque test ni de l'origine génomique des marqueurs disposés sur le microarray. En particulier, un marqueur relativement rare parmi les individus de la plaque test pourra se voir affecté d'une faible valeur de P et donc être considéré comme peu fiable. Inversement, pour un échantillonnage d'individus plus homogène et/ou dont la fréquence du marqueur est plus élevée - en relation avec le fait que le marqueur soit ou non de même origine génomique que les individus à génotyper - celui-ci pourra remplir plus facilement les critères seuils de qualité.
Compte-tenu de la diversité en espèces des individus de la plaque test et de celle en origine génomique des marqueurs du microarray, le nombre de marqueurs atteignant les seuils minimum définis (P et Q > 75 % ; reproductibilité > 80 %) a été étudié soit pour l'ensemble des 90 individus du microarray, soit les 45 individus *Lolium* sp. + *Festuca* sp., soit encore, espèce par espèce tout en distinguant à chaque fois l'origine génomique des marqueurs. Pour chaque combinaison espèce x marqueurs, le nombre de marqueurs total satisfaisant les seuils de qualité et le nombre de marqueurs polymorphes ont été déterminés, et les critères classiques de diversité, calculés : score moyen individuel, variance entre marqueurs, variance totale entre individus et F_{st} moyen entre sous-espèces, populations ou variétés suivant le cas.

Résultats

Tri interspécifique des marqueurs

Le tri global des marqueurs sur le microarray s'est heurté à la très grande hétérogénéité des individus aussi bien entre les quatre espèces qu'au sein de chacune d'elles au travers de l'échantillonnage réalisé par la plaque test. C'est pourquoi, nous avons opté pour un tri des marqueurs espèce par espèce et en groupant éventuellement les individus *Lolium* sp. et *Festuca* sp. dans l'objectif d'exploiter conjointement les marqueurs des deux origines pour des questions d'hybridation interspécifique (Tab. 2). Le nombre de marqueurs triés de cette façon reflète clairement la phylogénie des espèces mais aussi la méthode de traitement du signal qui dépend en partie du niveau de diversité des individus sur la plaque test et donc de sa nature, variétale ou spécifique.

A mêmes valeurs de P et Q, le nombre de marqueurs retenus par espèce augmente ainsi avec le niveau de la variabilité génétique présente sur la plaque test, variétés (*M. sativa* et *D. glomerata*), espèces proches (*Lolium* sp.), espèces très distantes (*Festuca* sp.), (cf diagonale du tableau 2). Le nombre total de marqueurs d'origine *M. sativa* triés par les individus de la même origine reste cependant un peu faible dans la mesure où c'est la totalité des individus utilisés pour produire les marqueurs qui a été utilisée aussi, à une exception près, pour la plaque test.

	Origine des individus				
	M. sativa	*D. glomerata*	*Lolium* sp.	*Festuca* sp.	*Festuca* sp. + *Lolium* sp.
Nb individus	22	23	22	23	45
Origine des marqueurs :					
M. sativa	**122**	6	10	20	19
D. glomerata	6	**120**	62	130	95
Lolium sp.	7	64	**390**	421	**560**
Festuca sp.	8	49	172	**527**	**470**
Total	**143**	**239**	**634**	**1 098**	**1 144**

Tab. 2 : Nombre de marqueurs triés par espèce x origine génomique (P et Q > 75 % ; reproductibilité > 80 %) à partir d'une représentation équilibrée des espèces en individus (22 à 23 /espèce) et en marqueurs (1 536 /espèce).

De façon croisée (cf total marginal du tableau 2), l'espèce *M. sativa* apparaît très distante des trois espèces de graminées avec 122 marqueurs en provenance de *M. sativa* sur un total de 143 marqueurs. Le nombre de marqueurs *D. glomerata* retenus par les individus de la même espèce (120) est pratiquement le même que dans le cas de *M. sativa*, mais avec 64 et 49 marqueurs supplémentaires d'origine *Lolium* sp et *Festuca* sp. (resp.). Enfin, les individus *Lolium* sp. et *Festuca* sp. retiennent relativement un plus grand nombre, et croissant, de marqueurs de leur propre origine (390 et 527 resp.). Sans doute pour cette même raison de variabilité maximum présente sur la plaque test, les individus *Festuca* sp. hybrident aussi de façon croisée avec un plus grand nombre de marqueurs *Lolium* sp. que les individus *Lolium* sp. vis-à-vis des marqueurs *Festuca* sp. (421 vs 527 ; 172 vs 390). Si l'on trie enfin les marqueurs par les individus *Festuca* sp. et *Lolium* sp. conjointement, on voit que c'est un nombre total de marqueurs à peine augmenté par rapport à celui des individus *Festuca* sp. pris isolément (1 144 vs 1 098) et avec une représentation très équilibrée des deux sources génomiques de marqueurs (560 *Lolium* sp. vs 470 *Festuca* sp.).

Tri intraspécifique des marqueurs

Les critères de qualité des marqueurs ont pu être étudiés sur un ensemble plus homogène d'individus et la totalité d'une représentation génomique (7 680 marqueurs) grâce au génotypage de 446 individus issus de 3 populations de cartographie chez *M. sativa*. La reproductibilité de l'ensemble de la ressource en marqueurs dépasse 94 % et les valeurs de P et Q apparaissent très corrélées entre marqueurs. Cependant, P ou Q est corrélé de façon plus lâche avec le *call rate* (r= 0.48). Or, un *call rate* le plus élevé possible est recherché pour cartographier les marqueurs avec un maximum de précision, c'est-à-dire en utilisant tout l'effectif de la population. Tandis que l'on fixe habituellement P et Q > 80 % de variance entre clusters "0" vs "1", on peut admettre un seuil inférieur dans des échantillons d'individus à *PIC* maximum, comme chez des populations de cartographie où une majorité de marqueurs ségrégent suivant des

ratios 1:1, et moyennant qu'il soit compensé par un *call rate* plus élevé. Si l'on exprime cette double contrainte en calculant un index empirique comme la somme de P et du *Call rate*, on note que plus de la moitié de la ressource produite (4 000 marqueurs) peut être utilisée pour un index > 150, soit P ou/et le *call rate* > 75 % (Fig. 1).

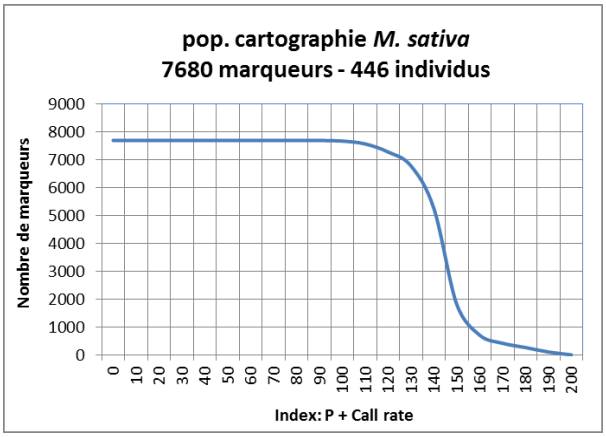

Fig.1

Cartographie

En plus des critères de qualité dans le traitement du signal des individus à génotyper, le nombre de marqueurs susceptibles d'être cartographiés dépend aussi du degré d'hétérozygotie des individus et du degré de liaison des marqueurs entre individus. Ceux-ci peuvent être estimés conjointement et de façon empirique par l'indice de dissimilarité entre paires d'individus chez une espèce. La distribution de cet indice entre les 231 paires possibles chez les 22 individus *M. sativa* utilisés pour la plaque test montre que de 0.25 à 0.55 (moyenne : 0.36) des marqueurs sont en situation de disjonction (Fig. 2) soit, si l'on tient compte du seuil de qualité précédent, qu'environ 0.36 x 4000 = 1440 marqueurs, ~18 % de la ressource totale, sont utilisables en moyenne pour de la cartographie. On peut noter au passage qu'il existe une certaine corrélation du score des individus entre marqueurs puisque sur la base du score moyen (0.571 ; Tab. 3) et d'une indépendance entre marqueurs, la dissimilarité attendue entre paires d'individu s'élève à 2*0.571*(1-0.571) = 0.490.

Cependant, il s'agit de valeurs maximum dans le cas d'une espèce autopolyploïde et d'un marquage dominant où seuls les marqueurs codés ''1'', de génotype simplex et, de plus, en couplage, peuvent être cartographiés avec précision. Pour un nombre de groupes de liaison de 8 chez *M. sativa*, on peut ainsi estimer que la ressource est susceptible d'aboutir à une cartographie jusqu'à 1440/2/8 = 90 marqueurs par groupe de liaison et pour chacun des parents, moyennant qu'un génotypage complémentaire de marqueurs codominants (microsatellites) en duplex (''1100'') permette de construire des cartes consensus entre les groupes de marqueurs *DArTs* simplex en couplage.

L'efficacité des marqueurs *DArT* en termes de cartographie peut être aussi exprimée de différentes façons. En utilisant le microarray *DArTFest* (7 680 clones produits dont 3 884 polymorphes), le test de la représentation génomique a résulté en 1 078 marqueurs polymorphes sur 2 257 marqueurs triés (47.8 %) chez *F. pratensis* contre 2 184 sur 2 761 (79.1%) chez *L. multiflorum* (Kopecký et al. 2009). Une cartographie chez chacune de ces espèces, au

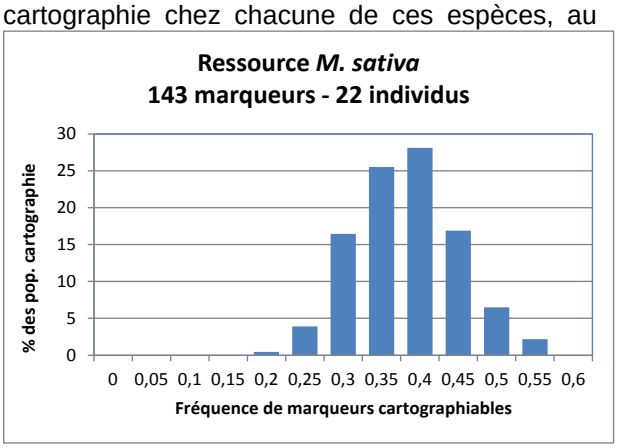

Fig. 2

niveau diploïde, a permis de positionner 149 marqueurs chez *F. pratensis* contre 530 chez *L. multiflorum* soit, 3.8 % et 13.6 % dans l'absolu (totalité des marqueurs polymorphes de la ressource) mais 6.6 % et 19.2 % (resp) en fonction du nombre de marqueurs triés dans chaque espèce ou encore, 13.8 % et 24.3 % (resp) en fonction du nombre de marqueurs polymorphes dans chaque espèce. Chez *L. perenne*, également diploïde, 329 marqueurs ont pu être cartographiés à partir du microarray *DArTFest*, donnant 8.4 % - 18.9 % et 23.2 % pour ces trois critères respectivement (Tomaszewski et al 2012). Excepté *F. pratensis* dont le polymorphisme significativement plus faible au sein du complexe *Festuca*/*Lolium* semble se confirmer ici, il semble raisonnable d'estimer le nombre de marqueurs *DArTs* susceptibles d'être

cartographiés au niveau diploïde à environ 25 % du nombre de marqueurs polymorphes chez l'espèce considérée.

Le nombre total de clones produits ici par espèce (15 680) doit permettre de compenser un plus faible potentiel de cartographie chez les espèces autopolyploïdes. Si le génotypage précède le choix des parents pour produire la population de cartographie, il peut être judicieux de choisir prioritairement les parents pour des marqueurs dont la fréquence dans l'espèce est < 0.5 pour augmenter l'échantillonnage de génotypes en simplex plutôt qu'en duplex.

Polymorphisme et diversité intra-spécifique

Avec le tri très stringent des marqueurs à l'aide de la plaque test, le taux de marqueurs polymorphes au sein de chaque espèce est proche de 100 % avec un score individuel moyen également proche de l'optimum (0.5) pour générer une variance totale maximum (0.25) (Tab. 3). La variance entre marqueurs reste faible à très faible, en particulier chez *Festuca* sp. (0.016), sans doute en raison du niveau interspécifique marqué de l'échantillonnage avec la présence de nombreux marqueurs spécifiques F. *pratensis* vs *F. glaucescens*.

	Espèces			
	M. sativa	*D. glomerata*	*Lolium* sp.	*Festuca* sp.
Nb individus	22	23	22	23
Nb marqueurs polymorphes	122	119	390	524
Score moyen	0.571	0.486	0.512	0.464
Variance entre marqueurs	0.053	0.043	0.046	0.016
Variance entre individus :				
totale	0.182	0.207	0.203	0.232
inter-variétés/espèces	0.112	0.047	0.063	0.196
F_{st} moyen	0.572	0.209	0.278	0.787
	(10 variétés)	(2 variétés)	(*L.m* vs *L.p*)	(*F.p* vs *F.g*)

Tab. 3 : Polymorphisme et structure de la diversité des 4 espèces vis-à-vis de leur ressource propre en marqueurs *DArTs* (1 536 clones par espèce triés à P et Q > 75 % et reproductibilité > 80 %)

C'est donc chez *Festuca* sp. que la valeur de F_{st} est la plus élevé (0.787) tandis que la différentiation interspécifique au sein de *Lolium* sp. est nettement plus faible (F_{st} = 0.278) en accord avec une plus grande proximité génétique des deux (sous-)espèces *L. multiflorum* et *L. perenne*. Il est intéressant de noter qu'au sein de *D. glomerata*, les deux variétés représentées sur la plaque test, l'une d'origine tempérée et l'autre de région méditerranéenne, montrent une valeur de F_{st} du même ordre de grandeur (0.209), et nettement supérieure aux valeurs rencontrées en moyenne entre variétés fourragères (F_{st} = 0.109 chez *L. perenne*). En revanche, la valeur 0.572 de F_{st} chez *M. sativa*, pour une variance totale relativement faible de 0.182, doit être largement surestimée par sous-échantillonnage des 10 variétés représentées (2 individus/variété en moyenne).

Comparaison entre microarrays

Il est également intéressant de comparer les critères de polymorphisme et de diversité de la ressource produite dans le cadre de l'AIP *DArTClimate* à ceux du microarray *DArTFest* publié par Kopecký et al. (2009) chez *Lolium* sp. et *Festuca* sp. (Tab. 4). Parmi les 7 680 clones produits, 3 884 (51 %) ont été trouvés polymorphes chez *DArTFest*, à la réserve près que 1 247 marqueurs n'ont donné de scores valides que chez deux espèces (*L. multiflorum* et *F. pratensis)* parmi les cinq ayant contribué à la ressource génomique. Il semble que la production de clones en mélangeant l'ADN de toutes les espèces pour ce microarray a entrainé une surreprésentation en marqueurs de ces deux espèces dont le génome est en effet proche et aussi déjà représenté chez l'espèce amphiploïde *F. arundinacea* issue d'hybridation *F. pratensis* x *F. glaucescens*. Si l'on écarte ces marqueurs, ce qui revient à appliquer un call rate > 80 % chez les 166 individus utilisés comme plaque test, le taux de polymorphisme tombe à 34 % (2 637 /7 680) des marqueurs produits, valeur identique à celle observée à partir du microarray *DArTClimate* avec les 45 individus *Lolium* sp. et *Festuca* sp. (1 030 /3 072). Cette correction faite, les deux microarrays coïncident pour montrer que le taux de polymorphisme au sein de *Lolium* sp. est de l'ordre de 16 à 18 % pour 5 à 8 % chez *Festuca* sp. L'ensemble des critères de diversité restent également très proches entre les deux microarrays avec une variance totale un peu plus élevée pour le microarray *DArTClimate* (0.202 vs 0.190), pour une variance

interspécifique pratiquement inchangée (0.146 vs 0.147). A cette échelle de diversité, le F_{st} moyen global reste dominé par la différenciation entre *Lolium* sp vs *Festuca* sp., (0.704 à 0.723), du même ordre de grandeur qu'au sein de *Festuca* sp. entre *F. pratensis* et *F. glaucescens.*(0.787).

	Microarray			
	DArTFest		*DArTClimate*	
Nb individus		166		45
Nb marqueurs produits/testés		7 680		3 072
Nb marqueurs polymorphes :				
total	2 637 (+1 247) = 3 884	(51 % - 34 %)	1 030	(34 %)
L. multiflorum	1 370 (+778) = 2 158	(28 % - 18 %)	539	(18 %)
L. perenne	1 406	(18 %)	506	(16 %)
F. pratensis	649 (+429) =1 078	(14 % - 8 %)	151	(5 %)
F. glaucescens	630	(8 %)	201	(7 %)
F. arundinacea	512	(7%)	-	-
Score moyen		0.454		0.415
Variance entre marqueurs		0.058		0.040
Variance entre individus :				
totale		0.190		0.202
interspécifique		0.147		0.146
F_{st} moyen		0.723		0.704
		(5 espèces)		(4 espèces)

Tab. 4 : Polymorphisme et diversité chez *Lolium* sp. et *Festuca* sp. comparés entre microarrays. Sur 7 680 clones produits toute origine génomique confondue pour le microarray *DArTFest*, 3 884 marqueurs ont été observés polymorphes dont 2 637 à *call rate* > 80 % et 1 247 donnant des scores valides seulement chez *L. multiflorum* et *F. pratensis* (778 et 429 marqueurs polymorphes supplémentaires resp.).

Spécificité des marqueurs

La précaution de produire le microarray *DArTClimate* en identifiant l'origine génomique des marqueurs permet d'en étudier l'impact sur les critères de polymorphisme et de diversité suivant que le signal est traité de façon homogène ou non, c'est-à-dire espèce par espèce ou conjointement (Tab. 5 et 6). De façon générale, les critères de diversité intraspécifique sont très conservés entre origines de marqueur lorsqu'on traite séparément les individus de chaque espèce (2 colonnes de gauche des tableaux). Les individus *Lolium* sp. ont un score moyen un peu plus faible (0.444 vs 0.512) lorsqu'ils sont génotypés avec des marqueurs *Festuca* sp. ; de la même façon, la différenciation interspécifique au sein de *Festuca* sp. paraît atténuée lorsqu'ils sont génotypés avec des marqueurs d'origine *Lolium* sp. (0.748 vs 0.787). Un génotypage conjoint des individus des deux espèces tend à dégrader les critères de diversité toute origine confondue des marqueurs: augmentation du score moyen, de la variance entre marqueurs, diminution de la variance totale et interspécifique, mais qui est à contrebalancer avec l'augmentation du nombre de

Génotypage	Spécifique *Lolium* sp.		Conjoint avec *Festuca* sp..
Nb d'individus	*22*		45
Origine des marqueurs	*Lolium*	*Festuca*	*Lolium + Festuca*
Nb marqueurs triés	390	172	1 030
Nb marqueurs polymorphes	390	172	711
Score moyen	0.512	0.444	0.540
Variance entre marqueurs	0.046	0.046	0.080
Variance entre individus :			
totale	0.203	0.201	0.168
interspécifique	0.063	0.065	0.045
F_{st} moyen (*Lm* vs *Lp*)	0.278	0.290	0.210

Tab. 5 : Structure de la diversité chez *Lolium* sp. après génotypage spécifique ou conjoint (*Lolium* sp. + *Festuca* sp.) des individus et suivant l'origine génomique des marqueurs (P et Q > 75 % ; reproductibilité > 80 % ; ressource de 1 536 clones par espèce).

Génotypage	Spécifique *Festuca* sp		Conjoint avec *Lolium* sp.
Nb d'individus	*23*		45
Origine des marqueurs	*Festuca*	*Lolium*	*Lolium + Festuca*
Nb marqueurs triés	527	421	1 030
Nb marqueurs polymorphes	524	421	713
Score moyen	0.464	0.459	0.462
Variance entre marqueurs	0.016	0.018	0.027
Variance entre individus :			
totale	0.232	0.230	0.221
interspécifique	0.196	0.182	0.181
F_{st} moyen (*Fp* vs *Fg*)	0.787	0.748	0.746

Tab. 6 : Structure de la diversité chez *Festuca* sp. après génotypage spécifique ou conjoint (*Lolium* sp. + *Festuca* sp.) des individus et suivant l'origine génomique des marqueurs (P et Q > 75 % ; reproductibilité > 80 % ; ressource de 1 536 clones par espèce).

marqueurs polymorphes, et notamment de la part de l'espèce la moins différenciée, *Lolium* sp. C'est sur le nombre total de marqueurs polymorphes observés après un génotypage conjoint que se différencie le plus nettement *Lolium* sp vs *Festuca* sp : les individus *Lolium* gagnent du polymorphisme à être génotypés avec l'espèce *Festuca* sp, nettement plus différenciée (711 vs 390 + 172 marqueurs) ; inversement, les individus *Festuca* sp. perdent des marqueurs polymorphes lorsqu'ils sont génotypés conjointement avec les individus *Lolium* sp. (713 vs 524 + 421).
Ces comparaisons montrent que la diversité génétique évaluée ne change pas fondamentalement de nature suivant l'origine génomique des marqueurs utilisés dès lors que ceux-ci remplissent les seuils minimum de qualité. Cette utilisation croisée possible entre origine des marqueurs et individus, au moins chez *Lolium* sp. et *Festuca* sp., permet d'augmenter le nombre de marqueurs utilisables pour des situations particulières : augmentation de la diversité intraspécifique chez *F. pratensis* au moyen de marqueurs *Lolium*, renforcement de la différenciation entre sous-espèces *Lolium* sp. par des marqueurs *Festuca*…
La question du génotypage conjoint d'individus d'espèces différentes sur microarrays DArT ne se pose pas en règle générale mais est bien sous-jacente à l'étude quantitative de l'introgression chez les hybrides *Festulolium*. Dans le cas d'hybrides *Festuca* x *Lolium* amphiploïdes, l'utilisation de microarrays équilibrés en marqueurs de génomes des deux espèces parentales semble le plus judicieux. Dans le cas de populations très avancées en générations de rétrocroisement, il pourrait être plus efficace d'utiliser des microarrays génome-spécifique pour quantifier une introgression de l'espèce donneuse à faible, voire très faible, fréquence. Comme le montrent les résultats de la plaque test, la notion de spécificité entre *Lolium* sp. et *Festuca* sp., et à ce niveau génomique, reste toujours un peu illusoire quand on voit qu'un tiers des marqueurs développés dans chaque espèce donne un polymorphisme valide chez l'autre espèce. Toujours est-il que l'identification de l'origine génomique des marqueurs chez *DArTClimate* vis-à-vis de *DArTFest* apporte une nouvelle perspective pour tenter de quantifier dans l'absolu les relations interspécifiques dans le complexe *Festuca*/*Lolium* ou le degré d'introgression chez du matériel végétal dont la généalogie n'est pas (ou plus) connue.

Discussion
Encore au stade des premières analyses, la ressource qui a été développée chez les 4 espèces fourragères, ne s'annonce pas moins prometteuse. Le volume de marqueurs produits (15 360 par espèce), la possibilité d'en emprunter de façon croisée au moins entre les 3 espèces de graminées, les taux de polymorphisme et les scores moyens observés montrent que l'on se trouve dans une situation optimale chez ces espèces, aussi bien pour une évaluation fine de la variabilité génétique dans de multiples contextes, *in natura* et pour l'amélioration, que pour saturer des cartes de liaison, notamment au niveau tétraploïde.

Comme le suggère son titre, le projet *DArTClimate* chez les espèces fourragères est motivé par la perspective du changement climatique. L'application de cette nouvelle ressource en marqueurs va s'articuler au travers de projets fédérés au sein du Metaprogramme ACCAF/Climagie (2012-2015) - *Analysis and valorisation of intra- and inter-specific agro-ecological strategies to adapt grassland communities to climate change: plant breeding and ecological intensification* :

- Réponse génétique Tempéré vs Méditerranéen aux scénarios de changement climatique chez les deux espèces de graminées dactyle et fétuque élevée (suite du projet VALIDATE/ANR 2008-2010)

- Cartographie chez *M. sativa* (Thèse A. Maamouri INRA/région 2011-13) en relation avec l'aptitude à l'association graminée-légumineuse ;
- Cartographie chez *D. glomerata* et déterminisme génétique de la dormance estivale ;
- Mesure de l'introgression *F. glaucescens* dans *Lolium* sp. chez des populations de back-cross primaire en relation avec la tolérance à la sécheresse ;

Les possibilités de séquençage des marqueurs DArT n'ont pas été exploitées dans le cadre de cet AIP mais pourront l'être dès qu'on voudra approfondir le déterminisme des polymorphismes mis en évidence précédemment. Des aspects méthodologiques comme le génotypage à partir de bulks d'ADN ou même d'extractions d'ADN d'individus en mélange pourront être aussi expérimentés pour adapter au mieux le coût du génotypage aux questions posées (cf Kopecký et al 2011).
A plus long terme, il serait hautement souhaitable de développer un microarray DArT chez une autre section polyploïde dans le genre *Festuca* regroupant les espèces à feuilles fines et de grand intérêt pour des utilisations non fourragères et notamment en gazon.

Références

Bartoš J, Sandve S.R, Kölliker R, Kopecký D, Christelová P, Stočes S, Østrem L, Larsen A, Kilian A, Rognli O.A, Doležel J (2011) Genetic mapping of DArT markers in the *Festuca–Lolium* complex and their use in freezing tolerance association analysis. Theor Appl Genet 122:1133–1147.
doi: 10.1007/s00122-010-1518-z

Jaccoud D, Peng K, Feinstein D, Kilian A (2001) Diversity Arrays: a solid-state technology for sequence information independent genotyping. Nucleic Acids Res 29:e25

Kopecký D, Bartoš J, Lukaszewski A.J, Baird J.H, Černoch V, Kölliker R, Rognli O.A, Blois H, Caig V, Lübberstedt T, Studer B, Shaw P, Doležel J, Kilian A (2009) Development and mapping of DArT markers within the *Festuca - Lolium* complex. *BMC Genomics*, 10:473.
doi: 10.1186/1471-2164-10-473

Kopecký D, Bartoš J, Christelová P, Černoch V, Kilian A, Doležel J (2011) Genomic constitution of *Festuca* x *Lolium* hybrids revealed by the *DArTFest* array. Theor Appl Genet 122:355–363.
doi 10.1007/s00122-010-1451-1

Pfeifer M, Martis M, Asp T, Mayer K.F.X, Lübberstedt T, Byrne S, Frei U, Studer B (2012) The perennial ryegrass GenomeZipper – targeted use of genome resources for comparative grass genomics. Plant Physiology Preview. Published on November 26, 2012 (doi:10.1104/pp.112.207282)
(http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/lolium/index.jsp.)

Tomaszewski C, Byrne SL, Foito A, Kildea S, Kopecký D, Doležel J, Heslop-Harrison J.S, Stewart D, Barth S (2011) Genetic linkage mapping in an F2 perennial ryegrass population using DArT markers. Plant Breeding 131: 345-349.

Wenzl P, Carling J, Kudrna D, Jaccoud D, Huttner E, Kleinhofs A, Kilian A (2004) Diversity Arrays Technology (DArT) for wholegenome profiling of barley. Proc Nat Acad Sci USA 101:9915–9920.

Coût total du projet
Financement AIP : 40 k€
Autres Financements (qui ? combien ?) :

Principaux résultats obtenus et applications envisageables :
Publications, matériels, ressources, BD, …

Outre les ressources originales en marqueurs *DArTs* des 4 espèces développées par le *CIRAD*, les Etablissements Jouffray-Drillaud, accueillis à l'URP3F dans le cadre d'une Plateforme d'Innovation Variétale (PTIV), ont développé une ressource propre en ray-grass d'Italie (*L. multiflorum*).

Les publications se limitent pour l'instant à des communications de résultats obtenus chez les hybrides *L. multiflorum x F. glaucescens* (2n=4x=28) développés par l'Unité à partir du microarray *DArTFest* et à l'annonce de la nouvelle ressource *DArTClimate* au *MBFT* symposium de Salt Lake City en 2012. Les tout premiers résultats utilisant le nouveau microarray seront communiqués au meeting de la Section *EUCARPIA* espèces fourragères en Serbie en mai 2013 :

Ghesquière M, Durand JL, Bourgoin T, Huttner E, Kilian A (2013) **Using DArT markers in *Festuca* x *Lolium* breeding** In: S. Bart, D. Milbourne (eds.), *Breeding Startegies for sustainable Forage and Turf Grass Improvement*, Proceedings of the 29th Eucarpia Fodder Crops and Amenity Grasses Section Meeting, Dublin, Ireland, Sept. 4 – 8, 2011, Springer Science+Business Media, Dordrecht (NL), pp 121-129. (DOI 10.1007/978-94-007-4555-1_15)

Ghesquière M, Barre P, Durand JL, Julier B, Litrico I, Maamouri A, Mournet P, Risterucci AM, Sampoux JP, Vignes H (2012) **Construction of a DArT marker resource for better adapted forage crops to climate change,** 7th International Symposium on Molecular Breeding of Forage and Turf, Salt Lake City, UT (USA), June 4 - 7, 2012. Abstract.

Ghesquière M, Barre P, Durand JL, Litrico I, Sampoux JP, Mournet P, Volaire F (2013) **Genetic response to climate scenarios within *Dactylis* and *Festuca* of temperate vs Mediterranean origin**. *Quantitative traits breeding for multifunctional grasslands and turf,* 30th Eucarpia Fodder Crops and Amenity Grasses Section Meeting, Vrnjačka Banja, Serbia**,** May 12 - 16, 2013. soumis.