

CIHEAM



Centre
International
de Hautes Etudes
Agronomiques Méditerranéennes

*International
Centre for
Advanced
Mediterranean Agronomic Studies*

Thèse / Thesis

requis pour
l'obtention du Titre

*submitted
for the Degree of*

Master of Science

**EVALUATION RETROSPECTIVE DE LA
SELECTION EFFECTUEE DANS UN
PROGRAMME D'AMELIORATION
D'ORGE PAR DES MARQUEURS
MOLECULAIRES**

Salima YOUSFI

Zaragoza, mars 2005

**Institut Agronomique Méditerranéen de
Mediterranean Agronomic Institut of
Zaragoza**



CIHEAM

Centre International de Hautes Etudes
Agronomiques Méditerranéennes
*International Centre for Advanced
Mediterranean Agronomic Studies*

Secrétariat Général / *General Secretary*

11, rue Newton
75116 PARIS
Tel.: (33-1) 53 23 91 00 – Fax: (33-1) 53 23 91 01
e-mail: secretariat@ciheam.org



Instituts Agronomiques Méditerranéens
Mediterranean Agronomic Institutes
(IAM)

Bari – Chania – Montpellier – Zaragoza

IAM - Bari
Via Ceglie 9
70010 Valenzano, Bari, Italy
Tel.: (39) 80 78 06 111 – Fax: (39) 80 78 06 206
e-mail: iamdir@iamb.it

IAM - Chania
P.O. Box 85
73100 Chania, Crete, Greece
Tel.: (30) 821 81 151 – Fax: (30) 821 81 154
e-mail: alkinoos@maich.gr

IAM - Montpellier
3191, route de Mende – BP 5056
34033 Montpellier Cedex 1, France
Tel.: (33-4) 67 04 60 00 – Fax: (33-4) 67 54 25 27
e-mail: iamm@iamm.fr

IAM - Zaragoza
Apdo. 202
50080 Zaragoza, Spain
Tel.: (34) 76 57 60 13 – Fax: (34) 76 57 63 77
e-mail: iamz@iamz.ciheam.org

1093504
CB 379936

Bib TC-2005-1

CENTRE INTERNATIONAL DE HAUTES ETUDES AGRONOMIQUES MEDITERRANEENNES
INSTITUT AGRONOMIQUE MEDITERRANEEN DE ZARAGOZA

**EVALUATION RETROSPECTIVE DE LA SELECTION EFFECTUEE
DANS UN PROGRAMME D'AMELIORATION D'ORGE
PAR DES MARQUEURS MOLECULAIRES**

Salima YOUSFI

Travail réalisé au Département d'Amélioration et de Production Végétale, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Zaragoza, sous l'encadrement conjoint des **Dr Ana M^a CASAS** et **M^a Pilar GRACIA**,

et soutenu publiquement le 15 mars 2005 devant le jury suivant:

- **Ignacio ROMAGOSA**, Département de Production Végétale et Science Forestière, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad de Lérida,
- **Pere ARUS**, Unité d'Amélioration Végétale, Institut Régional de Recherche et Technologie Agroalimentaires (IRTA), Cabriels (Barcelona),
- **Jesús MORENO**, Centre Régional de la Recherche Agronomique, La Coruña,
- **José Luis MOLINA**, Département de Production Végétale et Science Forestière, Institut Régional de Recherche et Technologie Agroalimentaires (IRTA), Lérida,
- **Dunixi GABIÑA**, Directeur Adjoint, Institut Agronomique Méditerranéen de Zaragoza.



R- 11.802

Dédicaces

Je remercie Dieu le tout puissant pour la force et le bien vouloir qu'il m'a consacré afin de mener ce travail à terme.

Ce travail est dédié à mes parents pour toute l'affection et le courage qu'ils n'ont cessé et ne cessent de me procurer.

Je dédie mon master également à mon mari, pour la tendresse qu'il me porte et qui n'a jamais cessé de m'encourager de loin pour terminer ce travail.

Un grand remerciement à toutes mes sœurs et à tous mes frères pour l'aide qu'ils m'ont portée de loin pour terminer mon Master.

Cet effort est également dédié à Pedro, Manuela et leur fille Lucia pour l'aide, la tendresse et la patience qu'ils m'ont donné durant tout le long du déroulement de mon travail, et qu'ils aient l'assurance du dévouement éternel.

Remerciements

A l'issue de ce travail j'aimerais exprimer mes remerciements et ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin pour sa réalisation.

A mes directeurs de thèse Dr. Ana Casas et Dr. Pilar Gracia, pour avoir accepté de m'encadrer. Je tiens à leur exprimer ma profonde gratitude pour leur aide, leurs orientations et conseils, qu'elles trouvent ici mes chaleureux remerciements.

Mes reconnaissances et ma sincère gratitude vont également au Dr. Ernesto Igartua qui a contribué significativement dans la réalisation de ce travail par ces conseils sincères, précieux et objectifs et son aide dans la réalisation des analyses statistiques et la finition de ce master. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude face à son entière disponibilité scientifique.

Je tiens à remercier également le Dr. José Manuel Lasa pour ces conseils cordiaux qui ont permis la finalisation de ce travail.

Mes sincères remerciements vont également à Ratiba, Samia, Manuela Andres, Victor et Alfonso pour l'aide qu'ils m'ont portée afin de terminer ce travail.

A tout le personnel du Département de Génétique, mon entière reconnaissance et gratitude pour leur sympathie, chaleur et gentillesse.

A toute l'équipe de l'IAMZ particulièrement le Directeur Luis Esteruelas, Emilio Moran, Ramzi Belkhodja et Antonio del Valle pour avoir confié en moi en m'offrant l'opportunité de réaliser ce master.

Mes remerciements vont aussi à Said, Hadad, Latifa, Mohamed, Widad et Hocine, pour m'avoir soutenu durant les moments difficiles par lesquelles je suis passée.

De même une grande reconnaissance et gratitude aux bibliothécaires de l'IAMZ, pour leur grande présence amicale et leur entière disponibilité.

A mon institution algérienne « INRAA » qui m'a élu à cette formation, qu'elle trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

SOMMAIRE

INDEX DES TABLEAUX	III
INDEX DES FIGURES	V
Resumen	VII
Summary	XI
I. INTRODUCTION	3
1.1. L'espèce <i>Hordeum vulgare</i> L	3
1.1.1. Origine et distribution	3
1.1.2. Taxonomie.....	3
1.1.3. Cytogénétique.....	3
1.2. L'amélioration de l'orge	4
1.2.1. L'histoire de l'amélioration de l'orge.....	4
1.2.2. Méthodes d'amélioration de l'orge	5
1.2.2.1. Sélection massale	6
1.2.2.2. Sélection généalogique.....	6
1.2.2.3. Le rétrocroisement.....	6
1.2.2.4. Induction de mutations	7
1.2.2.5. L'haploïdisation	7
1.2.2.6. Single Seed Descent (SSD)	7
1.2.2.7. Sélection assistée par marqueurs moléculaires	7
1.2.3. Choix des géniteurs	8
1.3. Marqueurs moléculaires	8
1.3.1. Principaux types de marqueurs moléculaires appliqués pour l'amélioration de l'orge	9
1.3.1.1. Marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	9
1.3.1.2. Marqueurs de types PCR.....	10
1.3.2. Utilisation des microsatellites pour l'évaluation des programmes de sélection.....	11
II. OBJECTIFS DE L'ETUDE	15
III. MATERIEL ET METHODES	19
3.1. L'évolution des fréquences parentaux.....	19
3.1.1. Plan d'amélioration	19
3.1.2. Matériel considéré	21
3.2. Etude moléculaire.....	23
3.2.1. Matériel végétal.....	23
3.2.2. Les microsatellites étudiés	25
3.2.3. Protocole de l'extraction de l'ADN	27
3.2.3.1. Extraction de l'ADN	27
3.2.3.2. Mesure de la concentration de l'ADN.....	28
3.2.3.3. Qualité de l'ADN	28

3.2.4. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	28
3.2.5. L'électrophorèse sur des gels d'acrilamide.....	29
3.2.6. Le séquenceur automatique.....	31
3.3. Traitements statistiques.....	31
3.3.1. Analyse des fréquences à travers les générations.....	31
3.3.2. Méthodes utilisés pour la sélection des allèles dans un programme d'amélioration .	32
3.3.3. L'analyse de variance.....	33
3.3.4. Similarité génétique.....	39
3.3.5. Indice de diversité génétique.....	39
IV. RESULTATS ET DISCUSSION.....	43
4.1. Effets de la sélection sur la subsistance des parents dans le programme d'amélioration.....	43
4.1.1. Organisation des croisements et contributions des parents tout le long du programme d'amélioration.	43
4.1.2. Définition des groupes de germplasm selon la connaissance préalable des génotypes.....	47
4.1.3. Effet de la sélection dans les différentes phases du programme d'amélioration	53
4.1.3.1. Sélection massale	54
4.1.3.2. Sélection généalogique.....	57
4.1.3.2.1. Effet de la sélection généalogique sur les groupes définis suivant les relations génétiques des génotypes	58
4.1.3.2.2. Effet de la sélection généalogique sur les types de variétés suivant leur histoire d'amélioration	60
4.1.3.2.3. Influence du nombre de rang des différentes variétés sur la sélection.....	61
4.1.3.2.4. Influence du mode de croissance des différentes variétés sur la sélection ..	61
4.1.4. Les meilleurs parents des quatre séries du programme d'amélioration	64
4.2. Analyse moléculaire	69
4.2.1. Diversité génétique.....	69
4.2.2. L'analyse des croisements.....	73
- Croisements incohérents	74
- Croisements à faible pourcentage d'allèles inconsistants	75
- Les croisements parfaits.....	75
4.2.3. Sélection des allèles dans un programme d'amélioration	76
4.2.3.1. Comportement de la ligne 4016 dans les croisements demis-frères	76
4 2 3 2 La ligne 4016 vis à vis des différents groupes de germplasm.....	82
V- CONCLUSIONS	87
Références bibliographiques	91
Annexes	99

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1. Parents des lignes F8 utilisées dans l'étude Moléculaire.....	24
Tableau 2. Les lignes F8 utilisés dans l'étude moléculaire.....	24
Tableau 3. Description des 48 microsattellites utilisés dans cette étude, récapitulation de la localisation chromosomique, le motif répétitif et la taille de chacun d'eux en paire de bases (pb).....	25
Tableau 4. Origine des microsattellites.....	26
Tableau 5. Récapitulation des distributions des parents suivant les différentes classifications du germplasma de l'orge.....	52
Tableau 6. Coefficients de détermination trouvés pour les différents rapports calculés entre les générations de l'analyse de variance.....	53
Tableau 7. Moyennes des ratios 1/3 pour les différents types de variétés.....	57
Tableau 8. Moyennes des ratios pour l'ensemble des groupes du Cluster.....	58
Tableau 9. Moyennes des ratios pour les différents types de variétés	60
Tableau 10. Moyennes des ratios pour les parents à deux rangs et ceux à six rangs.....	61
Tableau 11. Moyennes des ratios pour les différents parents suivant leur mode de croissance.....	61
Tableau 12. Moyennes des ratios des différents croisements suivant leur mode de croissance.....	62
Tableau 13 a. Les 20% meilleurs parents du programme d'amélioration pour la sélection visuelle.....	65
Tableau 13 b. Classement des parents du programme d'amélioration pour la sélection à base de rendement et la sélection totale.....	66
Tableau 14. Les croisements persistants jusqu' à la F8	68
Tableau 15. Nombre d'allèles et diversité génétique observée par 48 microsattellites dans 15 parents et 51 lignes F8 dérivées d'eux.....	70
Tableau 16. Hérité des microsattellites dans 51 lignes F8 par rapport aux parents....	73
Tableau 17. Test de distribution binomiale pour la transmission des allèles de la ligne parental 4016 à sa descendance F8 (croisements avec Barberousse, Plaisant, Iranis, Marianne, 4011, Candela et Pané).....	79

Tableau 18. Test de distribution binomiale pour la transmission des allèles de la ligne parental 4016 (Orria) à sa descendance F8 dans les différents bras des chromosome 3H et 4H.....	80
Tableau 19. Probabilité de la transmission des allèles de la ligne 4016 à la descendance des différents groupes de germplasmе dans trois régions chromosomiques.....	82
Tableau 20 . Taux de recombinaison des croisements parfaits	83

INDEX DES FIGURES

- Figure 1.** A, Données brutes du nombre de lignes sélectionnées des différentes générations pour les quatre séries étudiées. B, La transformation logarithmique et normalisation des données brutes pour une étude statistique plus précise..... 37
- Figure 2.** Représentation graphique de la contribution des 134 parents des quatre séries étudiées dans le programme d'amélioration pour les générations F1, F5, F8. Les parents des générations sont représentées par différentes couleurs suivant le type de variété..... 45
- Figure 3.** Dendrogramme résultant d'une analyse cluster UPGMA de 75 génotypes, dont 32 sont les parents des croisements inclus dans les quatre séries de notre étude..... 49
- Figure 4.** Distribution des fréquences des parents des quatre séries étudiées du programme d'amélioration pour la génération F1 et la F3. La ligne 1,1 indiquera un pourcentage similaire des parents dans les deux générations..... 55
- Figure 5.** Distribution des allèles dans les différents croisements contenant la ligne 4016 comme parent commun (demis frères)..... 77

Resumen

El programa de mejora público español de cebada tiene una de sus sedes en la Estación Experimental de Aula Dei, CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), en Zaragoza. Su objetivo principal es la obtención de nuevas variedades de cebada para las condiciones españolas.

En este estudio se va a evaluar retrospectivamente el efecto del resultado de la selección sobre los cruzamientos del programa de mejora efectuados en la Estación Experimental de Aula Dei. El análisis se centra en dos aspectos: el primero, un análisis estadístico de la composición de las generaciones del programa (en cuanto a supervivencia de cruzamientos y parentales) hasta la F8, y el segundo, el estudio molecular de un grupo de líneas avanzadas.

La primera parte del trabajo se efectuó atendiendo a los resultados de los parentales según su pertenencia a los distintos grupos de germoplasma establecidos en la cebada, con el fin de evaluar posibles diferencias entre ellos tras la selección efectuada desde la F3 hasta la F8. Para este estudio se tuvieron en cuenta cuatro series de ensayos, cuyos cruzamientos iniciales fueron efectuados entre 1991 y 1994. Este análisis nos permite ver las posibles diferencias de los diversos parentales en respuesta a la selección realizada. El estudio del efecto de la selección efectuada sobre los distintos tipos de variedades que existen en el programa, nos permitió constatar la diferencia en la supervivencia de las variedades según los criterios de selección utilizados en cada etapa del programa (selección visual o selección en base al rendimiento). Las variedades locales, comerciales y las líneas de mejora respondieron de manera diferente a los criterios de selección. Asimismo, este estudio nos permitió distinguir la diferencia del efecto de la selección, sobre cruzamientos realizados con genotipos con diferente hábito de crecimiento (invernal o primaveral). Al final, el estudio del efecto de la selección nos permitió detectar los mejores parentales del programa de mejora. Como conclusión principal, el estudio ha permitido conocer mejor el comportamiento de grupos de germoplasma y parentales determinados en el programa de mejora, lo que redundará en una mejor gestión futura del mismo.

Por otra parte, el estudio molecular se realizó con el fin de detectar posibles diferencias en la transmisión hasta la F8 de los alelos de los parentales, para 48 marcadores distribuidos por todos los cromosomas.

El análisis molecular de los parentales y las líneas F8, utilizando microsatélites, permitió confirmar que ocurrió un descenso en la diversidad genética entre los parentales y las líneas F8. El análisis molecular también permite analizar la transmisión de los alelos a la descendencia. Este análisis reveló la transmisión diferencial de ciertos alelos de uno de los parentales más exitosos del programa, la línea de mejora 4016 (que luego se convertiría en la variedad Orria), en comparación con los alelos de los otros parentales de las líneas F8. Al mismo tiempo, identificamos regiones cromosómicas en los brazos cortos de los cromosomas 3H y 4H, que presentaron un sesgo muy significativo en la transmisión de alelos, a favor de los de la línea 4016, frente a los de otros parentales de seis carreras. Un estudio más detallado permitirá explorar más a fondo las ventajas que esta línea está aportando al programa de mejora.

Résumé

Le programme d'amélioration Espagnol public dispose de un de ses sites à Saragosse, dans la Station Expérimentale de Aula Dei, CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas). Son objectif principal est l'obtention de nouvelles variétés d'orge adaptées aux conditions espagnoles.

Dans notre étude on va évaluer rétrospectivement le résultat de la sélection sur les différents croisements du programme d'amélioration de Aula Dei. L'analyse se focalise sur deux volets: le premier qui se caractérise par une analyse statistique de la composition des générations du programme jusqu'à la F8 (en prenant en compte la survie des croisements et parents), et un deuxième volets qui est l'étude moléculaire d'un certain groupe de lignes avancées.

La première partie du travail a été effectuée en tenant compte des résultats de l'appartenance des parents aux différents groupes de germplasm établis dans l'orge, afin d'évaluer de possibles différences entre eux, après une sélection effectuée de la génération F3 jusqu'à la F8. Pour cette étude on a pris en considération quatre séries d'essais, dont les croisements initiaux ont été effectués entre 1991 et 1994. Cette analyse nous permet de voir les possibles différences de la réponse à la sélection effectuée pour les divers parents. L'étude de l'effet de la sélection effectuée sur les différents types de variétés qui existent dans le programme, nous a permis de constater la différence dans la survie des variétés selon les critères de sélection utilisés dans chaque étape du programme (sélection visuelle ou sélection à base du rendement). Les variétés locales, commerciales et les lignes d'amélioration ont répondu de manière différente aux critères de sélection. De même, cette étude nous a permis de distinguer la différence de l'effet de la sélection, sur des croisements réalisés avec des génotypes de différent mode de croissance, (hivernales, printaniers ou mixtes). Finalement, l'étude de l'effet de la sélection nous a permis de détecter les meilleurs parents du programme d'amélioration. Comme conclusion principale, l'étude a permis de connaître mieux le comportement des groupes du germplasm des parents déterminés dans le programme d'amélioration, ce qui aboutira une future meilleure gestion de ce dernier.

D'autre part, l'étude moléculaire a été effectuée afin de détecter de possibles différences dans la transmission des allèles des parents à la descendance (F8), par le biais de 48 marqueurs répartis sur l'ensemble des chromosomes.

L'analyse moléculaire des parents et des lignes F8, en utilisant des microsatellites, a permis de confirmer qu'une diminution dans la diversité génétique s'est produite entre les parents et les lignes F8. L'étude moléculaire permet aussi d'analyser la transmission des allèles à la descendance. Cette analyse a révélé la transmission différentiel de certains allèles d'un des parents les plus fameux du programme, la ligne d'amélioration 4016 (qui s'est convertit par la suite à la variété Orria), en comparaison avec les allèles des autres parents des lignes F8. En même temps, nous identifions des régions chromosomiques dans les bras courts des chromosomes 3H et 4H, qui ont présenté un effet très significative dans la transmission d'allèles, en faveur de la ligne 4016, face à ceux de des autres parents de six rangs. Une étude plus approfondie permettra d'exploiter au maximum les avantages qu'apportera cette ligne pour un programme d'amélioration.

Summary

The Spanish public barley breeding programme has as its main objective to obtain barley cultivars for the Spanish growing conditions. It is carried out by four different Organizations, one of which is the Aula Dei Experimental Station, CSIC (Council for Scientific Research), in Saragosse.

In our study, we retrospectively evaluated the effect of selection on the progenies from different crosses of the breeding program carried out at Saragosse. The study has two different parts: a statistical analysis of parents and crosses survival through the generations from F2 up to F8, and a study of a group of advanced lines with molecular markers.

The first part of the study was carried out attending to the ascription of the parents to the classical germplasm groups defined in barley breeding. Survival of parents from generation F3 through F8 was evaluated. Four series of trials were used, whose initial crosses were carried out from 1991 to 1994. With this analysis, we were able to see if selection favoured more some parents than others. We could state the different behaviour of parents and germplasm groups depending on the selection criteria used over the different steps of the programme (visual selection, yield based selection). Local varieties, commercial cultivars and breeding lines responded differently to both types of selection criteria. Likewise, we could distinguish the difference of the selection effect on crosses done with genotypes having different growth habits (winter or spring growth). Finally, we were able to detect the best parents in the breeding program. In conclusion, this study improved the knowledge on the performance of parents and germplasm groups in the breeding programme, and will be useful to improve resource management of the programme in the future.

On the other hand, the molecular study of a set of advanced (F8) lines, for 48 microsatellite markers covering all seven chromosomes, revealed interesting facts about allelic diversity, and response to selection. A genetic diversity analysis comparing parents *vs.* progeny certified the existence of lower diversity in the F8 lines. The molecular analysis also revealed a biased transmission of alleles in certain crosses, especially these involving breeding line 4016 (which would evolve later on into cultivar Orria). Concurrently, we identified several chromosomal regions, on the short arms of chromosomes 3H and 4H, in which 4016 alleles were apparently selected over alleles contributed by other six-row parents. A more detailed study of these would allow further exploitation of the advantageous traits contributed by this line to the breeding programme.