

Diversité génétique des épeautres cultivés et des anciennes races locales

Étude révélée par analyse de microsatellites

P. Bertin¹⁻²

D. Grégoire¹

S. Massart¹

D. de Froidmont¹

Introduction

Selon la classification des blés (MacKey, 1966), l'épeautre [*Triticum aestivum* (L.) Thell. ssp. *spelta* (L.) Thell.] et le blé tendre [*Triticum aestivum* (L.) Thell. ssp. *vulgare* (Will.) MK.] représentent deux des six groupes qui constituent l'ensemble des blés hexaploïdes de génome AABBDD. L'épeautre est cultivé principalement sur des terres marginales en Allemagne, Suisse, Autriche et Belgique.

Les différences entre l'épeautre et le blé sont peu nombreuses mais bien marquées (Campbell, 1997). L'épeautre possède un rachis cas-

¹ Centre de recherches agronomiques de l'État, département de Lutte biologique et ressources phytogénétiques, chemin de Liroux 4, B-5030 Gembloux, Belgique.

² Université catholique de Louvain, département de Biologie appliquée et productions agricoles, unité d'Écologie des grandes cultures, place Croix du Sud, 2 bte 11, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

sant et son grain ne se décortique pas spontanément au battage, contrairement au blé. L'épeautre est généralement plus grand et possède des épis plus longs que le blé (Winzeler *et al.*, 1994). Sa croissance est plus vigoureuse en conditions défavorables (Riesen *et al.*, 1986 ; Rüegger *et al.*, 1990, 1993) et sa teneur en protéines est plus élevée (Schmid et Winzeler, 1990). Il est particulièrement adapté à l'alimentation animale et est actuellement apprécié pour la fabrication de produits du terroir.

Les principales limitations agronomiques de l'épeautre sont sa sensibilité à la verse et son faible rendement. Au cours des dernières décennies, la principale stratégie suivie pour améliorer l'épeautre a été de le croiser avec le blé. Cependant, les utilisateurs et améliorateurs recherchent actuellement des caractères plus typiques de l'épeautre. La généalogie des épeautres actuels laisse penser que leur base génétique est très étroite. L'utilisation des ressources génétiques en épeautre paraît attrayante pour son amélioration. Une meilleure connaissance de la diversité génétique de cette céréale est donc requise.

Chez le blé tendre, les microsattellites détectent plus de polymorphisme que les RFLP dans les études de biodiversité (Röder *et al.*, 1995). Le but du présent travail est de déterminer les potentialités des études de microsattellites développées chez le blé tendre pour déterminer le niveau de variabilité existant parmi les épeautres.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Dans un premier temps, 30 accessions d'épeautre et 9 de blé tendre ont été étudiées. Les épeautres étudiés représentent la plupart des cultivars disponibles et des lignées les plus prometteuses pour les régions où l'épeautre est habituellement cultivé. Ils proviennent de programmes d'amélioration menés en Allemagne, Suisse et Belgique. Dans un deuxième temps, 148 épeautres supplémentaires

ont été étudiés, pour la plupart d'anciennes races locales, provenant de différentes collections en Europe et aux USA.

Extraction de l'ADN

Les feuilles de plantules ont été maintenues une nuit à -70 °C, puis broyées et homogénéisées dans de l'azote liquide. Le tampon d'extraction (600 µl de 100 mM Tris pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoéthanol) a été ajouté et le mélange incubé à 100 °C pendant 10 mn, puis centrifugé à 14 000 tr/mn à 4 °C durant 15 mn. Le surnageant a été transféré dans deux volumes d'éthanol absolu (-20 °C) et 1/10 volume d'acétate d'ammonium 10M, incubé à -70 °C pendant 30 mn et centrifugé comme ci-dessus. L'ADN précipité a été séché à l'air, puis resuspendu dans 50 µl d'une solution Tris 10 mM - EDTA 1 mM. Après incubation dans 2 µl d'une solution de RNase à 10 mg/ml à 37 °C durant 15 mn, l'ADN a été finalement dilué 100 fois.

Microsatellites et amplification PCR

Les 23 microsatellites (Wheat Microsatellites) publiés par Plaschke *et al.* (1995) ont été analysés. Les amorces ont été synthétisées par Eurogentec, Belgique. L'amplification PCR a été réalisée selon la procédure décrite par Röder *et al.* (1995), avec toutefois les modifications suivantes : 0,5 U de *taq* polymérase (Pharmacia Biotech, Belgique), marquage d'une des amorces de chaque paire à l'extrémité 5' par la fluorescéine, 30 cycles PCR (thermocycleur Techne Cyclogene™ Dri-Block).

Électrophorèse

Les fragments amplifiés par PCR ont été détectés sur un séquenceur A.L.F. Express (Pharmacia). Les gels dénaturants ont été préparés avec du DNA/Page readysol 6 %, 7 M urée et 0,6 x TBE, Temed 0,088 % et persulfate d'ammonium 0,35 %. Un volume de 2,5 µl de produits PCR dénaturés a été chargé avec 5 µl de loading dye

(contenant 5 mg/ml de bleu dextrane et de la formamide 5 %) et des marqueurs internes de 60, 123, 193 et 250 pb. Les conditions de migration étaient 1 500 V, 50 mA, 34 W, 55 °C, le tampon de migration 0,6 x TBE ; l'intervalle d'échantillonnage était fixé à 2 s. La migration était terminée après 80 mn.

Analyse de données

La taille des fragments a été déterminée par le programme Allelinks, en prenant la taille de l'allèle séquencé de Chinese Spring comme référence (Plaschke *et al.*, 1995). Les distances génétiques (DG) basées sur les données microsatellites ont été calculées par la formule 1 - proportion d'allèles partagés (Bowcock *et al.*, 1994). Le dendrogramme a été construit en utilisant la méthode UPGMA dans le logiciel Phylip de J. Felsenstein.

Résultats

Analyse de 30 épeautres et 9 blés modernes

Application des microsatellites développés sur le blé tendre

Des produits d'amplification ont été obtenus avec chacun des 23 microsatellites testés. Cependant, plusieurs n'ont pas produit d'amplification claire et répétitive pour plusieurs génotypes de blé et d'épeautre. Pour d'autres, dont l'unité de répétition n'était que d'une paire de nucléotides, la détermination exacte de la taille des allèles s'est révélée malaisée. Seuls les 17 autres microsatellites ont été retenus pour les analyses ultérieures.

Allèles chez l'épeautre et le blé tendre

Chaque accession présente une composition allélique unique, à l'exception de la paire d'épeautres Sertel-Ostar. Un total de 113 allèles

différents a été trouvé, parmi lesquels 34 sont spécifiques d'une accession unique (30,1 %). Le nombre total d'allèles est de 88 chez l'épeautre et de 70 chez le blé, parmi lesquels 43 sont spécifiques de l'épeautre (48,9 %) et 25 spécifiques du blé (35,7 %). Au total, 60,2 % des allèles sont spécifiques d'un groupe (épeautre ou blé tendre).

Le nombre moyen d'allèles par (Wheat Microsatellites) est de $6,65 \pm 2,83$ (moyenne \pm déviation standard) et varie de 2 à 13, la valeur de PIC moyen est de $0,64 \pm 0,16$ et varie de 0,26 à 0,84. Pour plusieurs WMS, les valeurs de PIC diffèrent nettement entre l'épeautre et le blé. Des différences dans la distribution de fréquence de la taille des allèles entre blé et épeautre ont également été observées (fig. 1).

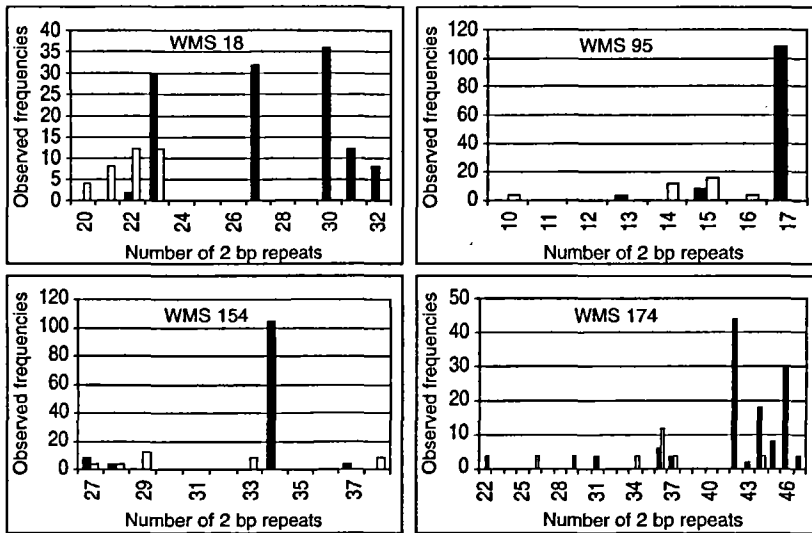


Figure 1
Distribution de fréquence des allèles chez le blé et l'épeautre aux loci WMS 18, 95, 154 et 174.

Distances génétiques intra et inter des groupes

La DG moyenne, deux à deux sur les 39 génotypes, est de $0,656 \pm 0,181$ et varie de 0 à 1. Les DG sont sensiblement plus faibles

parmi les épeautres ($0,573 \pm 0,172$) que parmi les blés ($0,706 \pm 0,14$), attestant de la faible variabilité génétique des cultivars modernes d'épeautres.

La distance moyenne, deux à deux entre chaque épeautre et chaque blé tendre, est de $0,782 \pm 0,113$. Ainsi, la distance moyenne entre les groupes est supérieure à la distance moyenne à l'intérieur de chaque groupe pris séparément, montrant que, malgré les nombreux croisements réalisés entre le blé et l'épeautre, les deux groupes restent distincts.

Dendrogramme

La première division dans le dendrogramme isole le blé « Chinese Spring » de l'ensemble des autres accessions. La division suivante sépare les 30 épeautres et le blé Renan des 7 blés tendres restants.

Dans le groupe des épeautres, Renan et trois épeautres les plus éloignées des autres – Schwabenkorn, 65313 et Balmegg – sont les premiers isolés. La division suivante dans le groupe des épeautres sépare les accessions belges et l'épeautre suisse Oberkulmer de toutes les autres accessions suisses. Les accessions allemandes (issues de croisements entre accessions suisses, belges, allemandes et autrichiennes) sont distribuées parmi ces deux groupes, le plus souvent en accord avec leur pedigree. Dans le groupe suisse, Altgold et son descendant direct 73.88.02 forment un groupe, de même que Ostro et ses descendants. Dans le groupe belge, la famille de Rouquin est la première isolée. Les autres accessions sont divisées en deux groupes : d'une part, la famille d'Hercule et d'autre part Oberkulmer et deux de ses descendants directs.

Nombre de loci testés

Afin de tester si le nombre de marqueurs utilisés est suffisant ou non, l'analyse a été effectuée plusieurs fois en éliminant successivement les WMS les moins polymorphes. La rétention des 10 WMS les plus polymorphes a révélé une composition unique en allèles pour chaque accession, à l'exception de la paire Sertel-Ostar, comme c'était le cas avec les 17 WMS. Elle n'a amené aucun changement majeur ni dans les DG ni dans le dendrogramme. La corrél-

lation entre les distances deux à deux obtenues avec 10 et 17 WMS (fig. 2) est élevée (0,91***).

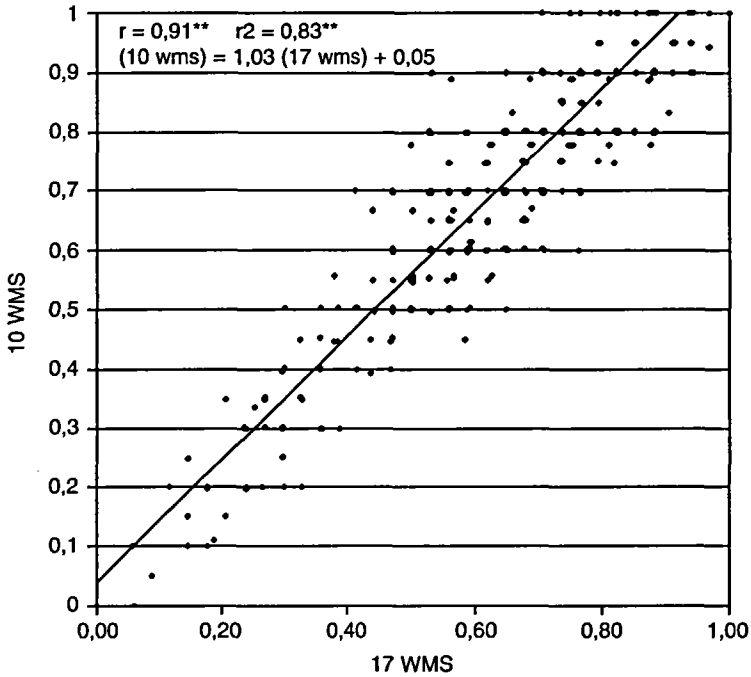


Figure 2
Diagramme de dispersion des relations
entre distances génétiques calculées pour 741 comparaisons
deux à deux entre 39 accessions de blé tendre et d'épeautre,
sur base de l'ensemble des 17 microsattellites
et des 10 microsattellites les plus polymorphes.

Étude des anciennes races locales

La détermination des distances génétiques et la construction du dendrogramme reprenant les 178 épeautres (30 cultivars et lignées avancées et 148 anciennes races locales) ont révélé que la diversité génétique était nettement supérieure parmi les races locales que parmi les épeautres modernes.

I Discussion

Potentialités des microsatellites du blé pour le génotypage de l'épeautre

Aucun problème particulier n'a été rencontré lors de l'application des WMS à l'épeautre. L'absence d'amplification chez certaines accessions s'est produite aussi bien sur des blés que sur des épeautres. Ces résultats contrastent fortement avec l'application des WMS à d'autres céréales telles que l'orge et le seigle (Röder *et al.*, 1995). Ces observations accréditent la vision du blé tendre et de l'épeautre comme deux sous-groupes d'une même espèce (MacKey, 1966 ; Campbell, 1997).

Des études antérieures ont démontré que les microsatellites révélaient plus de polymorphisme que n'importe quel autre marqueur chez le blé (Röder *et al.*, 1995 ; Plaschke *et al.*, 1995 ; Bryan *et al.*, 1997). La valeur de PIC obtenue dans l'étude présente pour le blé tendre – 0,64 – confirme cette observation.

Avec 17 loci, les profils alléliques générés permettent de différencier les 741 paires de génotypes, excepté Sertel-Ostar. Une très bonne discrimination génotypique a été obtenue en utilisant 7 microsatellites chez le soja (Rongwen *et al.*, 1995), 10 chez le riz (Garland *et al.*, 1999) et 11 chez l'orge (Russell *et al.*, 1997). Des DG et dendrogrammes ont été générés avec 10 microsatellites chez le riz (Garland *et al.*, 1999), 15 chez l'orge (Struss et Plieske, 1998) et 23 chez le blé tendre (Plaschke *et al.*, 1995).

De plus, notre étude a démontré que la réduction à 10 loci n'apportait aucune perte d'information notable, ni dans l'identification des génotypes, ni dans les DG, ni encore dans la construction du dendrogramme. Ce résultat prouve la validité du protocole utilisé et les potentialités des microsatellites pour le génotypage, la détermination des distances génétiques et la reconstruction de phylogénies.

Distance entre l'épeautre et le blé tendre

Dans cette étude, toutes les amorces mises au point pour le blé tendre ont fourni des produits d'amplification chez l'épeautre, accreditant l'idée que les différences entre ces deux groupes sont du niveau intraspécifique. Cependant, les DG entre accessions des deux groupes sont supérieures à celles d'un seul groupe. De plus, le dendrogramme généré par les données moléculaires sépare clairement les 30 épeautres de la majorité des blés. Des études antérieures avaient conduit à la même conclusion. Liu *et al.* (1990), Keller *et al.* (1999 a, b) et Messmer *et al.* (1999) ont observé un niveau élevé de polymorphisme de longueur de fragments de restriction entre blé tendre et races locales d'épeautre. Les deux groupes sont également séparés dans l'étude de Dvorak *et al.* (1998). Des différences ont également été observées entre des cultivars modernes d'épeautre et le blé tendre dans des études de marqueurs RFLP (Siedler *et al.*, 1994). Ceci suggère que, malgré l'utilisation fréquente de blé tendre dans les programmes d'amélioration de l'épeautre, les cultivars modernes d'épeautre restent distincts du blé tendre.

Conclusion

Nous démontrons ici l'utilité des microsatellites du blé tendre pour les études génétiques chez l'épeautre, les potentialités des distances génétiques basées sur la proportion d'allèles partagés pour la reconstruction de phylogénies dans un groupe de génotypes proches les uns des autres, l'étroitesse de la base génétique des cultivars modernes d'épeautre, et la plus grande diversité parmi les anciennes races locales. Cette approche peut être appliquée à l'étude des ressources génétiques en races locales d'épeautre, pour aider à la construction d'une « core collection » et pour servir de guide dans le choix de races locales en épeautre pour des programmes d'amélioration, afin d'élargir la base génétique de l'épeautre moderne.

Remerciements

Nous remercions Ir. A. Dekeyser (Centre de recherches agronomiques de l'État, Gembloux, Belgique), Dr. Ch. Kling (université d'Hohenheim, Landessaatzuchtanstalt, Hohenheim, Allemagne), Dr. M. Messmer et Dr. M. Winzeler (Station de recherches fédérale pour l'agroécologie et l'agriculture, groupe Amélioration du blé et de l'épeautre, Zürich, Suisse) pour la fourniture de graines et les informations utiles. Nous remercions Dr. MS Röder et Ir. L. Van Eylen pour les informations complémentaires concernant respectivement les microsattellites et les pedigree du blé. Nous remercions également Dr. G. Berben et Dr. J.M. Jacquemin (Centre de recherches agronomiques de l'État, Gembloux, Belgique) pour l'accès aux équipements. Cette recherche a été financée par l'Union européenne (FAIR3 CT96-1569).

Bibliographie

- Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL 1994 — High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsattellites. *Nature* 368 : 455-457.
- Bryan GJ, Collins AJ, Stephenson P, Orry A, Smith JB, Gale MD 1997 — Isolation and characterisation of microsattellites from hexaploid common wheat. *Theor Appl Genet* 94 : 557-563.
- Campbell KG 1997 — Spelt: agronomy, genetics, and breeding. *Plant Breed Rev* 15 : 187-213.
- Dvorak J, Luo MC, Yang ZL, Zhang HB 1998 — The structure of the *Aegilops tauschii* genepool and the evolution of hexaploid wheat. *Theor Appl Genet* 97 : 657-670.
- Garland SH, Lewin L, Abedinia M, Henry R, Blakeney A 1999 — The use of microsattelite polymorphisms for the identification of Australian breeding lines of rice (*Oryza sativa* L.) *Euphytica* 108 : 53-63.
- Keller M, Karutz Ch, Schmid JE, Stamp P, Winzeler M, Keller B, Messmer MM 1999 — a Quantitative trait loci for lodging resistance in a segregating wheat x spelt population. *Theor Appl Genet* 98 : 1171-1182.
- Keller M, Keller B, Schachermayr G, Winzeler M, Schmid JE, Stamp P, Messmer MM 1999 b — Quantitative trait loci for resistance against powdery mildew in a segregating wheat x spelt population. *Theor Appl Genet* 98 : 903-912.
- Liu Y, Mori N, Tsunewaki K 1990 — Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in wheat. I. Genomic DNA library construction and RFLP analysis in common wheat. *Jpn J Genet* 65 : 367-380.
- MacKey J 1966 — Species relationship in *Triticum*. Proc 2nd inter wheat genet symp 1963, Lund, Sweden. *Hereditas suppl.* 2 : 237-275

- Messmer MM, Keller M, Zanetti S, Keller B 1999 — Genetic linkage map of a wheat x spelt cross. *Theor Appl Genet* 98 : 1163-1170.
- Plaschke J, Ganai MW, Röder MS 1995 — Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 91 : 1001-1007.
- Riesen T, Winzeler H, Rügger A, Fried PM 1986 — The effect of glumes on fungal infection of germinating seed of spelt (*Triticum spelta* L.) in comparison to wheat (*Triticum spelta* L.). *J Phytopathology* 115 : 318-324.
- Röder MS, Plaschke J, König SU, Bömer A, Sorrells ME, Tankslet SD, Ganai MW 1995 — Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol Gen Genet* 246 : 327-333.
- Rongwen J, Akkaya MS, Bhagwat AA, Iavi U, Cregan PB 1995 — The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor Appl Genet* 90 : 43-48.
- Rügger A, Winzeler H 1993 — Performance of spelt (*Triticum spelta* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) at two different seeding rates and nitrogen levels under contrasting environmental conditions. *J Agronomy Crop Sci* 170 : 289-295.
- Rügger A, Winzeler H, Nösberger J 1990 — Studies on the germination behaviour of spelt (*Triticum spelta* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) under stress conditions. *Seed Sci Technol* 18 : 311-320.
- Russell J, Fuller J, Young G, Thomas B, Taramino G, Macaulay M, Waugh R, Powell W 1997 — Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. *Genome* 40 : 442-450.
- Schmid JE, Winzeler H 1990 — Genetic studies of crosses between common wheat (*Triticum aestivum* L.) and spelt (*Triticum spelta* L.). *J Genet Breed* 44 : 75-80.
- Siedler H, Messmer MM, Schachermayr GM, Winzeler H, Winzeler M, Keller B 1994 — Genetic diversity in european wheat and spelt breeding material based on RFLP data. *Theor Appl Genet* 88 : 994-1003.
- Struss D, Plieske J 1998 — The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theor Appl Genet* 97 : 308-315.
- Winzeler H, Schmid JE, Winzeler M 1994 — Analysis of the yield potential and yield components of F1 and F2 hybrids of crosses between wheat (*Triticum aestivum* L.) and spelt (*Triticum spelta* L.). *Euphytica* 74 : 211-218.