

JOURNÉE D'INFORMATION SCIENTIFIQUE – BOVINS LAITIERS ET PLANTES FOURRAGÈRES

Optimiser la teneur en énergie de la luzerne par sélection génétique

SOLENE ROCHER¹, ANNICK BERTRAND¹, ANNIE CLAESSENS¹, MARIE-NOËLLE THIVIERGE¹.

^{1,3}Agriculture et agroalimentaire Canada (AAC), Centre de recherche et de développement de Québec, Québec
Solen.Rocher@canada.ca

Mots clés: *Medicago sativa*, valeur nutritive, ratio énergie/protéines, génétique moléculaire, gènes candidats.

Introduction

La valeur nutritive des fourrages est étroitement liée à la performance des ruminants. Une stratégie efficace pour améliorer cette valeur nutritive consiste à augmenter la teneur en énergie des fourrages. En augmentant la concentration en sucres non structuraux (NDSC = sucres solubles + amidon + pectine), il est en effet possible d'améliorer le ratio entre l'énergie fermentescible et les protéines rapidement dégradables, et ainsi d'améliorer la valeur nutritive des fourrages. La luzerne (*Medicago sativa* L.) est une légumineuse fourragère allogame particulièrement sensible à la dépression de consanguinité, ce qui affecte profondément les processus de sélection. De plus, la majorité des caractères d'intérêt en sélection sont des caractères complexes contrôlés par plusieurs gènes. La méthode de sélection récurrente développée par notre équipe permet de développer des populations améliorées sans affecter leur rendement, et s'est montrée efficace pour améliorer des caractères d'intérêt chez plusieurs espèces fourragères incluant la luzerne. Le développement de nouveaux cultivars par sélection phénotypique récurrente reste cependant un processus long et complexe. La génétique moléculaire, basée sur l'identification et l'analyse de polymorphismes de l'ADN ou de l'ARN, est un outil précieux pour mieux comprendre les caractères phénotypiques complexes. C'est également un outil particulièrement prometteur pour simplifier et accélérer l'amélioration variétale traditionnelle, notamment via le développement d'approches de sélection assistée par marqueurs moléculaires.

Les travaux menés par notre équipe ont montré que la concentration en NDSC chez la luzerne est fortement affectée par l'environnement et varie au cours de la journée (Tremblay *et al.*, 2014), ce qui limite les opportunités d'amélioration phénotypique de ce trait. Cette variabilité est particulièrement importante dans les feuilles en raison de leur activité photosynthétique. La digestibilité des feuilles étant élevée comparée à celle de l'ensemble de la plante, notre équipe a développé une méthode de sélection divergente basée sur la concentration en NDSC de la tige permettant d'obtenir des populations contrastées pour la concentration en NDSC. La stabilité de ce caractère a été évaluée dans une première phase de ce projet. Dans le volet moléculaire, nous avons utilisé ces populations issues de sélection divergente pour identifier des gènes répondant à la sélection phénotypique, et potentiellement impliqués dans la synthèse et l'accumulation de NDSC dans les tiges de luzerne.

Méthodologie

Production de populations contrastées pour leur teneur en sucres non structuraux dans les tiges : Les plants utilisés dans cette étude sont issus d'un cycle de sélection phénotypique pour la concentration en NDSC dans les tiges. La sélection a été effectuée parmi 500 plants du cultivar Akori évalués au champ. Au stade 10% floraison, la partie inférieure de chaque plant (entre 5-40 cm au-dessus du sol) a été prélevée, séchée puis effeuillée avant d'être broyée. Une analyse biochimique a été réalisée sur 75 échantillons pour développer une équation NIRS qui a été utilisée pour prédire la concentration en NDSC dans l'ensemble des échantillons, tel que décrit dans de précédents travaux (Nie *et al.* 2009). Deux groupes de génotypes présentant des concentrations en NDSC dans les tiges contrastées (20 [+] et 20 [-]) ont été identifiés et leur concentration en NDSC a été validée par analyses biochimiques. Les plants de chaque groupe ont ensuite été croisés entre eux pour produire des populations divergentes (NDSC+1 et NDSC-1). Les progrès phénotypiques obtenus chez ces populations divergentes ont été évalués en déterminant la concentration en NDSC dans les tiges par des prédictions NIRS basées sur l'analyse biochimique d'un sous-ensemble d'échantillons.

Identification de gènes candidats : Pour chaque population (NDSC0, NDSC+1 et NDSC-1), 24 plants ont été sélectionnés sur la base de la concentration en NDSC dans leurs tiges pour produire des groupes contrastés. Ces

génotypes ont été multipliés par bouturage (10 clones par génotypes). Les plants obtenus ont été mis à croître en conditions contrôlées (éclairage 16 heures/j à 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Température 20°C le jour/17°C la nuit) dans un dispositif à 5 blocs. Les échantillons ont été prélevés à deux reprises (en AM et PM) au stade 10% floraison comme suit : deux échantillons de tige ont été prélevés au niveau du 4^{ème} entre nœud de chaque clone (24 génotypes * 3 populations * 2 reps * 2 prélèvements (AM/PM) * 5 clones = 1440 échantillons) et broyées dans l'azote liquide. Des pools de 24 échantillons ont été constitués (3 populations * 2 reps * 2 prélèvements * 5 clones = 60 pools), et l'ARN a été extrait avant d'effectuer une synthèse de cDNA en utilisant la méthode décrite par Azevedo *et al.* (2003). Une analyse SRAP-cDNA, basée sur la méthode de Li and Quiros (2001), a ensuite été effectuée à l'aide de 46 combinaisons d'amorces SRAP. Les fragments polymorphes entre populations ou entre prélèvements ont été purifiés et séquencés. Après assemblage, les séquences ont été alignées sur le génome de référence de l'espèce modèle *Medicago truncatula* (Tang *et al.*, 2014) et un transcriptome de luzerne (O'Rourke *et al.*, 2015) afin d'identifier des homologies avec des gènes de référence.

Analyse d'expression de gènes candidats : Un sous-ensemble de gènes candidats a été sélectionné parmi les gènes identifiés sur la base d'informations disponibles dans la littérature pour une analyse approfondie. Des amorces qPCR spécifiques ont été synthétisées en utilisant les séquences de référence, et utilisées pour analyser l'expression de gènes candidats par RT-qPCR dans les pools de cDNA préparés pour l'analyse SRAP-cDNA selon la méthode décrite par Dube *et al.* (2013).

Résultats

Production de populations contrastées pour leur teneur en sucres non structuraux dans les tiges : Après un cycle de sélection phénotypique pour la concentration en NDSC dans les tiges, des populations contrastées pour la teneur en sucres non structuraux dans les tiges ont été obtenues. Une forte variabilité de la concentration en NDSC des tiges a été observée au cours de la journée et en fonction du stade de développement de la plante. Cependant, la population NDSC+1 a montré une concentration en NDSC supérieure à celle de la population initiale NDSC0, elle-même supérieure à celle des NDSC-1 quelques soient les conditions.

Identification de gènes candidats : Parmi les polymorphismes révélés à l'aide des 46 combinaisons d'amorces SRAP, 84 fragments différenciellement amplifiés entre les prélèvements (AM/PM) et/ou entre les populations (NDSC+/NDSC-) ont été prélevés et purifiés. L'ensemble des séquences obtenues ont été assemblées et 65 d'entre elles ont montré une homologie significative avec les séquences de référence de *M. truncatula* et de *M. sativa*, incluant 48 séquences homologues à des séquences annotées dans les bases de données qui ont permis d'identifier 37 gènes candidats. Parmi eux, 24 gènes candidats potentiellement impliqués dans la synthèse ou l'accumulation de NDSC ont été sélectionnés pour la suite des travaux.

Analyse d'expression de gènes candidats : L'analyse d'expression de gènes par RT-qPCR a confirmé que 20 des 24 gènes candidats sélectionnés sont différenciellement exprimés entre les prélèvements (AM/PM) dans au moins une des populations (NDSC-1/NDSC+1), incluant 18 gènes présentant des niveaux d'expression significativement différents entre les populations pour les deux prélèvements (AM/PM) (Tableau 1). Parmi les gènes identifiés, huit (8) gènes ayant répondu à la sélection étaient différenciellement exprimés entre les populations (NDSC-1/NDSC+1) seulement pour un des deux prélèvements, mettant en évidence l'effet important du moment d'échantillonnage dans l'expression de ces gènes.

Tableau 1: Niveau de signification des changements d'expression de gènes candidats en réponse à la sélection pour la teneur en sucres non structuraux dans les tiges (NDSC+/NDSC-) et/ou en fonction de l'heure de prélèvement (AM/PM). * P < 0.05; ** P<0.01; * P<0.005.**

Fonction	NSC- AM vs PM	NSC+ AM vs PM	AM NSC- vs NSC +	PM NSC- vs NSC +
ABC transporter B family protein	n.s.	***	n.s.	***
linker histone H1 and h5 family protein	*	*	n.s.	n.s.
CBL-interacting kinase	***	***	n.s.	n.s.
2-hydroxyisoflavanone dehydratase	***	***	n.s.	***
glycerol-3-phosphate transporter	***	***	n.s.	n.s.
fasciclin-like arabinogalactan protein 16 precursor	***	***	n.s.	n.s.
alpha-1,4-glucan-protein synthase [UDP-forming]-like protein	*	***	n.s.	***
phospholipase A1	***	***	n.s.	n.s.
Sec-independent protein translocase TatC	***	***	n.s.	n.s.
white-brown-complex ABC transporter family protein	***	***	**	n.s.
Serine/Threonine-kinase TOR	n.s.	**	n.s.	*
neutral/alkaline non-lysosomal ceramidase	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
centromere/microtubule-binding protein	*	***	n.s.	**
polyol transporter-like protein, putative	**	***	**	n.s.
salt stress response/antifungal domain protein	***	***	n.s.	n.s.
wound-responsive family protein	***	***	**	**
peptide/nitrate transporter plant	***	***	n.s.	n.s.
GDSL-like lipase/acylhydrolase	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
chromatin remodeling complex subunit	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
phototropic-responsive NPH3 family protein	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
cytochrome b559 subunit alpha	*	*	n.s.	n.s.
plastid movement impaired protein	*	*	n.s.	n.s.
DNA replication factor CDT1-like protein	**	**	n.s.	n.s.
L-isoaspartate O-methyltransferase	**	**	n.s.	n.s.
calmodulin-binding receptor-like cytoplasmic kinase	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Conclusions

Nos résultats montrent que la concentration en sucres non structuraux (NDSC) des tiges de luzerne est un caractère fiable qui peut être utilisé pour sélectionner des populations plus riches en énergie par sélection génétique. L'analyse moléculaire a permis d'identifier plusieurs gènes candidats appartenant à différentes voies métaboliques potentiellement impliquées dans le contrôle de ce caractère. Les différences d'expression de gènes observées entre populations indiquent que la sélection phénotypique a eu un effet au niveau moléculaire, confirmant l'intérêt de développer des outils moléculaires pour assister l'amélioration variétale. La majorité de ces gènes candidats présente une variation de leur expression au cours de la journée. La concentration en NDSC suit un rythme circadien similaire. Ceci suggère que les gènes identifiés sont impliqués dans la synthèse et l'accumulation des NDSC au cours de la journée. Ces gènes constituent des cibles particulièrement intéressantes pour l'amélioration. Des travaux complémentaires sont en cours pour mieux comprendre l'effet du moment d'échantillonnage sur l'expression de ces gènes, et leur lien avec la concentration en NDSC dans des génotypes individuels. L'analyse des populations que nous avons développées avec des outils moléculaires à haut débit nous permettrait une meilleure compréhension des bases génétiques et des voies de biosynthèse impliquées dans la synthèse et l'accumulation des NDSC, et une identification plus exhaustive des gènes candidats. L'identification de marqueurs ADN, stables et héréditaires, associés à ces gènes d'intérêt facilitera l'amélioration de ce caractère complexe, difficile et long à évaluer avec les méthodes traditionnelles.

Références

- Castonguay, Y., Bertrand, A., Michaud, R., Laberge, S. 2011. Cold-Induced Biochemical and Molecular Changes in Alfalfa Populations Selectively Improved for Freezing Tolerance. *Crop Science* 51, 2132-2144.
- Tremblay, G.-F., Morin, C., Bélanger, G., Bertrand, A., Castonguay, Y., Berthiaume, R., Allard, G. 2014. Silage Fermentation of PM- and AM-Cut Alfalfa Wilted in Wide and Narrow Swaths. *Crop Science* 54, 439-452.
- Nie, Z., Tremblay, G.-F., Belanger, G., Berthiaume, R., Castonguay, Y., Bertrand, A., Michaud, R., Allard, G., Han, J. 2009. Near-infrared reflectance spectroscopy prediction of neutral detergent-soluble carbohydrates in timothy and alfalfa. *Journal of Dairy Science* 92, 1702-1711.
- Azevedo, H., Lino-Neto, T., Tavares, R. 2003. An improved method for high-quality RNA isolation from needles of adult maritime pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 21, 333-338.
- Li, G., Quiros, C.F. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theoretical and Applied Genetics* 103, 455-461.
- Tang, H., Krishnakumar, V., Bidwell, S., Rosen, B., Chan, A., Zhou, S., Gentzbittel, L., Childs, K.-L., Yandell, M., Gundlach, H., Mayer, K.-F., Schwartz, D.-C., Town, C.-D. 2014. An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* 15, 312.
- O'Rourke, J., Fu, F., Bucciarelli, B., Yang, S., Samac, D., Lamb, J., Monteros, M., Graham, M., Gronwald, J., Krom, N., Li, J., Dai, X., Zhao, P., Vance, C. 2015. The *Medicago sativa* gene index 1.2: a web-accessible gene expression atlas for investigating expression differences between *Medicago sativa* subspecies. *BMC Genomics* 16, 502.
- Dube, M.-P., Castonguay, Y., Duceppe, M.-O., Bertrand, A., Michaud, R. 2013. SRAP Polymorphisms Associated to Cell Wall Degradability in Lignified Stems of Alfalfa. *Bioenergy Research* 6, 644-650.

Agriculture and
Agri-Food Canada

Agriculture et
Agroalimentaire Canada

Optimiser la teneur en énergie de la luzerne par sélection génétique

Solen Rocher, Annick Bertrand, Annie Claessens, Marie-Noëlle Thivierge

Grappe de recherche laitière

Recherche laitière :
pour un monde
en santé.

Centre de Recherche et Développement de Québec

Agriculture and Agri-Food Canada

Caractères à l'étude

Objectifs stratégiques d'AAC

Augmenter la
productivité agricole

Rendement

Dormance

Regain

Persistance

Tolérance au froid

Maladies racinaires

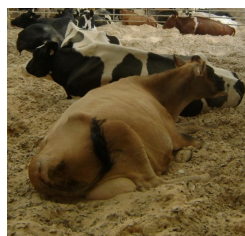
**Valeur
nutritive**

Concentration en énergie

Digestibilité

Valeur nutritive

- La **digestibilité** est liée à la composition de la paroi cellulaire:
 - pectine > hemicellulose > cellulose > lignine
 - Les sucres non structuraux sont rapidement dégradés dans le rumen
- **Energie**
 - Sucres structuraux (cellulose, hemicellulose, lignine)
 - Sucres non-structuraux (amidon, sucrose, fructans)



(Increasing the energy of Canadian forages fed to high producing dairy cows) 2015 – 2018

- 1- Améliorer le ratio énergie rapidement fermentescible / protéines rapidement dégradables de la luzerne via une sélection génétique pour les glucides non-structuraux (GNS) de la tige
- 2- Identifier les pratiques de gestion des cultures qui permettent de maximiser le rapport énergie rapidement fermentescible / protéines rapidement dégradables dans les fourrages
- 3- Développer un outil web d'aide à la décision procurant de l'information locale et facile d'accès concernant le temps optimal de fauche des cultures fourragères en tenant compte du rendement, de la digestibilité et des conditions climatiques



(Increasing the energy of Canadian forages fed to high producing dairy cows) 2015 – 2018

1- Améliorer le ratio énergie rapidement fermentescible / protéines rapidement dégradables [SS/PB, GNS/(A+B1)] de la luzerne via une sélection génétique pour les glucides non-structuraux (GNS) de la tige.

A- Développement de populations de luzerne à rendement élevé et à teneur en GNS élevée dans la tige.

B- Stabilité des GNS de la tige en fonction des conditions environnementales et du stade de développement.

C- Évaluation des populations sélectionnées pour une teneur en GNS élevée dans la tige.

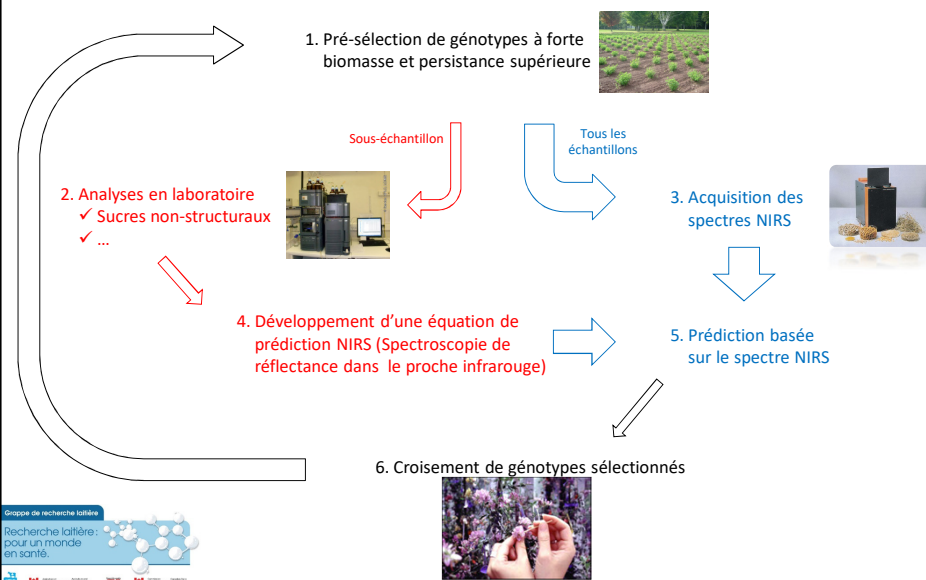
D- Identification de marqueurs moléculaires associés à une teneur en GNS élevée dans la tige.

Groupe de recherche laitière

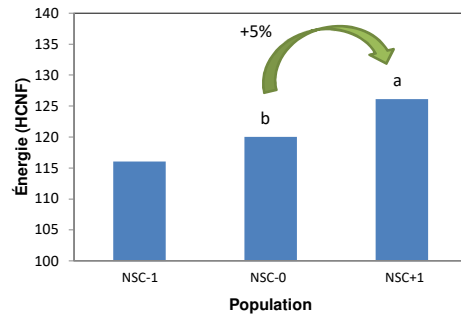
Recherche laitière :
pour un monde
en santé.



Améliorer la valeur nutritive par sélection phénotypique



Améliorer la valeur nutritive par sélection phénotypique

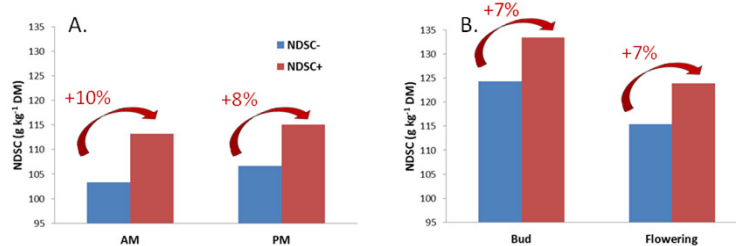


Sélection récurrente pour l'énergie

- Augmentation de la concentration en énergie (1 cycle de sélection = 5%)
- Aucun effet négatif sur le Rendement

La concentration en sucres non structuraux peut être améliorée par sélection phénotypique

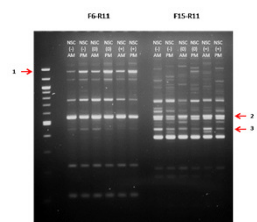
Améliorer la valeur nutritive par sélection phénotypique



- ✓ La concentration en NDSC dans les tiges varie:
 - A. au cours de la journée
 - B. en fonction du stade de développement
- ✓ Les populations sélectionnées (NDSC+ et NDSC-) diffèrent quelque- soit le prélèvement ou le stade de développement

Identification de marqueurs

- ✓ 3 populations : **NDSC0, NDSC-1, NDSC+1**
- ✓ Prélèvement d'échantillons: **AM et PM**
- ✓ Extraction d'ARN, synthèse de cDNA
- ✓ Analyse SRAP-cDNA (amplification PCR)
 - ✓ 46 combinaisons d'amorces testées

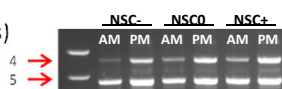


=> **84 fragments polymorphes** entre prélèvements (AM/PM) et/ou populations (NDSC-1/NDSC+1)

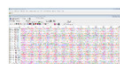


Identification de gènes candidats – SRAP-cDNA

- Séquençage (84 fragments purifiés)



- Analyse de séquence (Bioedit 7.2.5)



- Alignement sur les bases de données de référence

ADN Génome de *M. truncatula*



<http://www.medicagogenome.org/>

ARN Transcriptome de *M. sativa*



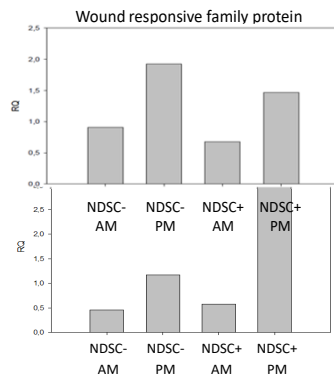
<http://plantgrn.noble.org/AGED/blasttranscript.jsp>

=> **24 gènes candidats sélectionnés**



Expression de gènes candidats - qPCR

- ✓ Validation de 20 gènes candidats (/24)
- ✓ Changement de niveaux d'expression pendant la journée
- ✓ Effet majeur du prélèvement (AM/PM) sur la visibilité des différences entre populations



Groupe de recherche laitière
 Recherche laitière
 pour un monde
 en santé.

Fonction	NDSC(-)		NDSC(+)		AM		PM	
	AM vs. PM	NDSC(-) vs. NDSC(+)	AM vs. PM	NDSC(-) vs. NDSC(+)	NDSC(-) vs. NDSC(+)	AM vs. PM	NDSC(-) vs. NDSC(+)	AM vs. PM
ABC transporter B family protein	n.s.	***	n.s.	***	n.s.	***	n.s.	***
Linker histone H3 and H5 family protein	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CBL-interacting kinase	***	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
2-hydroxyisoflavone dehydratase	***	***	n.s.	***	n.s.	***	n.s.	***
glucan-3-phosphate transporter	***	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Isotriazin-like arabinogalactan protein 16 precursor	***	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
alpha-1,4-glucan-protein synthase [UDP-forming]-like protein	*	***	n.s.	***	n.s.	***	n.s.	***
phosphatase A1	***	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Sec-independent protein translocase TatC	***	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
white-brown-complex ABC transporter family protein	***	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Serine/Threonine-kinase TOR	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	*
centromere/microtubule-binding protein	*	***	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	**
polyol transporter-like protein, putative	**	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
salt stress response/antifungal domain protein	***	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
wound responsive family protein	***	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
peptide/nitrate transporter plant	***	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
cytochrome b559 subunit alpha	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
plastid movement impaired protein	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
DNA replication factor CDT1-like protein	**	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
L-isopartate O-methyltransferase	**	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

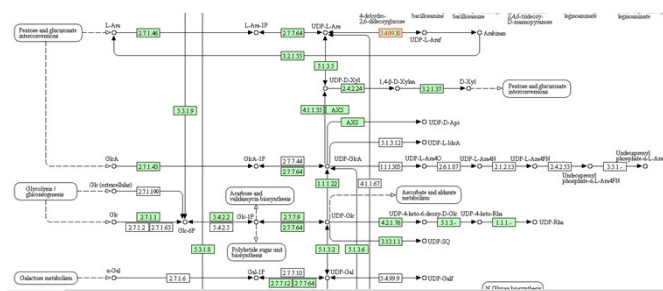
Expression de gènes candidats

alpha-1,4-glucan-protein synthase



KEGG <i>Arabidopsis thaliana</i> (thale cress): AT5G16510		Help
Entry	AT5G16510	CDS
Gene name	RGPS	T00041
Definition	(RefSeq) Alpha-1,4-glucan-protein synthase family protein	
KO	K13379	reversibly glycosylated polypeptide / UDP-arabinopyranose mutase [EC:2.4.1.- 5.4.99.30]
Organism	ath <i>Arabidopsis thaliana</i> (thale cress)	
Pathway	ath00520 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	
Brite	KEGG Orthology (KO) [BR:ath00001] 09100 Metabolism 09101 Carbohydrate metabolism 00520 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism AT5G16510 (RGPS) 09100 Brite Hierarchies 09101 Protein families: metabolism	

All links
Ontology (3)
KEGG BRTE (3)
Pathway (1)
KEGG PATHWAY (1)
Chemical substance (2)
KEGG COMPOUND (2)
Chemical reaction (2)
KEGG ENZYME (1)
KEGG REACTION (1)
Genome (1)
KEGG GENOME (1)
Gene (14)
KEGG ORTHOLOGY (1)
RefGene (4)
NCBI-PROTEIND (1)
UniGene (1)
AB010077 / 1



https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ath00520+AT5G16510

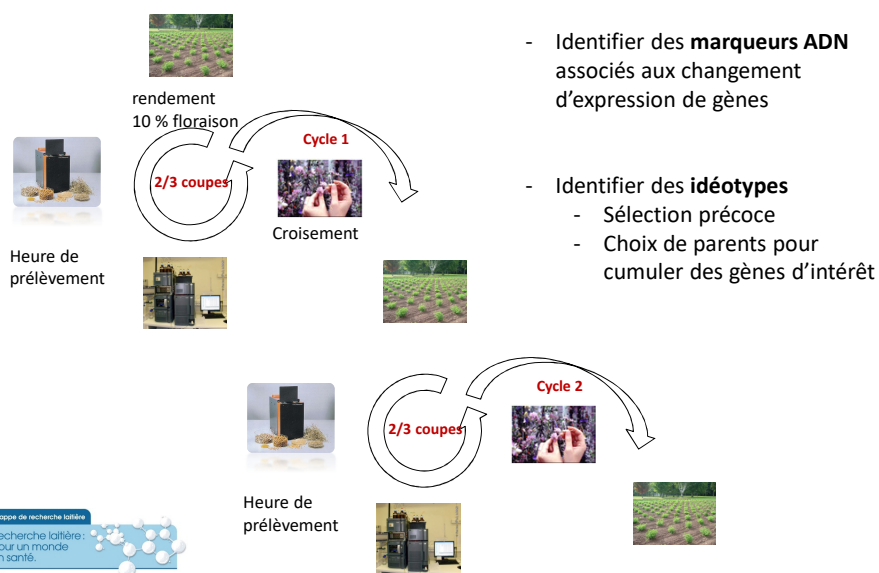
En résumé ...

- ✓ La concentration en sucres non structuraux (NDSC) des tiges de luzerne:
 - Peut être améliorée par sélection génétique,
 - Varie au cours de la journée et en fonction du stade de développement,
 - Est un caractère polygénique.
- ✓ Les populations issues de sélection divergente permettent d'identifier des gènes candidats pour la concentration en NDSC des tiges de luzerne.
- ✓ La plupart des gènes candidats sont validés par qPCR.
- ✓ Leur expression varie au cours de la journée.
=> polymorphisme ADN (stable) associé?

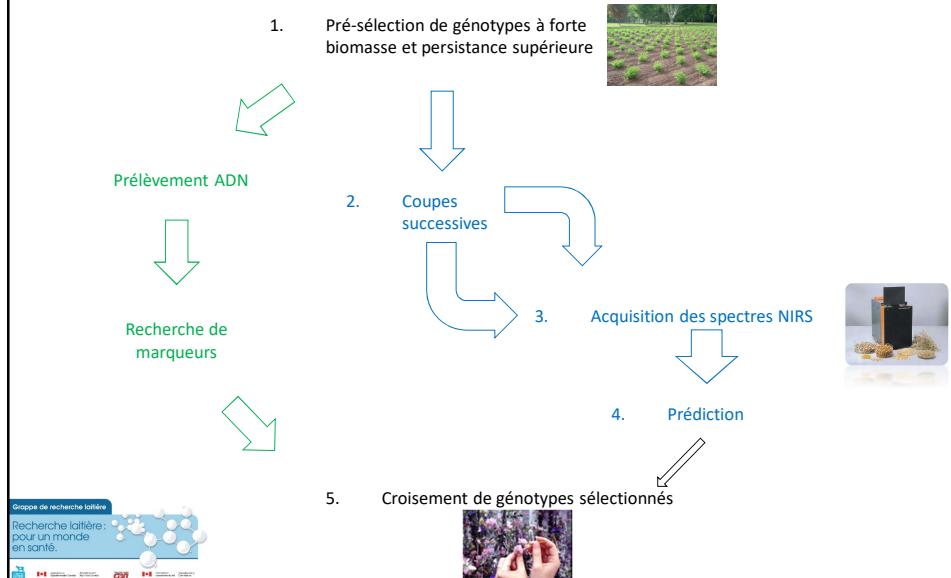
A quoi ça sert?



Sélection phénotypique



Sélection assistée par marqueurs



L'équipe

Chercheuses

Solen Rocher
Annie Claessens
Annick Bertrand
Marie-Noëlle Thivierge

Génétique moléculaire
Génétique et amélioration
Biochimie et physiologie végétales
Agronomie et écophysiologie



Assistants de recherche

Josée Michaud
Jean Cloutier
Marie-Claude Pépin
Josée Bourassa
Sandra Delaney
Chantal Lachance

Génétique moléculaire
Génétique moléculaire
Amélioration des plantes
Biochimie végétale
Biochimie végétale
Agronomie et écophysiologie

