



**HAL**  
open science

# Création et caractérisation de marqueurs SSR pour la fétuque rouge traçante - *Festuca rubra* subsp. *Rubra* - et étude de diversité génétique

Mélodie Vivès

## ► To cite this version:

Mélodie Vivès. Création et caractérisation de marqueurs SSR pour la fétuque rouge traçante - *Festuca rubra* subsp. *Rubra* - et étude de diversité génétique. Sciences agricoles. 2015. dumas-01217363

**HAL Id: dumas-01217363**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01217363>**

Submitted on 19 Oct 2015

**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.



AGROCAMPUS  
OUEST

CFR Angers

CFR Rennes



RUTGERS

School of Environmental  
and Biological Sciences

Année universitaire : 2014-2015

Spécialité : Horticulture

Spécialisation : HORVAL

### Mémoire de Fin d'Études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

## CREATION ET CARACTERISATION DE MARQUEURS SSR POUR LA FETUQUE ROUGE TRAÇANTE - *FESTUCA RUBRA* SUBSP. *RUBRA* – ET ETUDE DE DIVERSITE GENETIQUE

Par Mélodie VIVES



**Soutenu à Angers**

**le 25 septembre 2015**

**Devant le jury composé de :**

Président : Caroline WIDEHEM

Expert : Guillaume DAVERDIN

Maître de stage : Stacy BONOS

Enseignant référent : Vanessa SOUFFLET-FRESLON

*Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST*



### **Confidentialité :**

Non  Oui si oui :  1 an  5 ans  10 ans

Pendant toute la durée de confidentialité, aucune diffusion du mémoire n'est possible<sup>(1)</sup>.

A la fin de la période de confidentialité, sa diffusion est soumise aux règles ci-dessous (droits d'auteur et autorisation de diffusion par l'enseignant).

Date et signature du maître de stage<sup>(2)</sup> :

Stacy Bonos the 25/09/2015

### **Droits d'auteur :**

L'auteur<sup>(3)</sup> autorise la diffusion de son travail

Oui  Non

Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement(4)

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

la diffusion papier et électronique du mémoire (joindre dans ce cas la fiche de conformité du mémoire numérique et le contrat de diffusion)

Date et signature de l'auteur :

### **Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant :**

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé

Oui  Non

Si non, seul le titre du mémoire apparaîtra dans les bases de données.

Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement(4)

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

la diffusion papier et électronique du mémoire

Date et signature de l'enseignant :

(1) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation d'AGROCAMPUS OUEST s'engagent à respecter cette confidentialité.

(2) Signature et cachet de l'organisme

(3).Auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études

(4) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option)) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé



## REMERCIEMENTS

---

Les Etats-Unis sont un pays attachant grâce à leurs habitants. J'ai eu la chance de côtoyer des personnes incroyables, qui ont fait de ce stage une expérience inoubliable que ce soit au niveau scientifique, humain ou personnel.

Je souhaite premièrement remercier tout le cadre enseignant et pédagogique d'Agrocampus Ouest Angers, pour m'avoir accompagnée dans ces années d'études et aidée à construire mon projet professionnel. Je tiens à remercier plus particulièrement ma tutrice Dr. Vanessa Soufflet-Freslon pour sa disponibilité, ses réponses précises et détaillées et ses remarques pertinentes qui m'ont permis d'écrire ce mémoire. Merci également à Dr. Agnès Grapin, responsable de l'option Horticulture Ornementale et VALorisation, pour l'organisation du semestre qui a été très enrichissant.

Je remercie ma maître de stage Dr. Stacy Bonos qui a rendu cette expérience possible et m'a donné l'opportunité de réaliser ce projet de recherche dans sa totalité. Sa confiance et son aide précieuse m'ont permis d'atteindre mes objectifs et de donner le meilleur de moi-même.

J'aimerais spécialement remercier Dr. Josh Honig pour son expertise scientifique et sa disponibilité à répondre à mes (nombreuses) questions. Grâce à ses encouragements et ses explications précises, j'ai pu aborder avec confiance, des problématiques scientifiques qui me semblaient inaccessibles.

Dr. William Meyer pour son point de vue professionnel qui m'a permis de toujours garder à l'esprit que les projets de recherche sont directement liés aux entreprises et doivent être applicables et appliqués.

Un merci très ému à mes collègues et amis Jen, Chrissy et Vinnie qui m'ont intégrée dans leur équipe, n'ont pas hésité à interrompre leur travail pour répondre à mes questions, m'ont soutenue, m'ont conseillée, m'ont fait beaucoup rire et ont tout simplement été les meilleurs pendant ces six mois.

Merci à ma famille, mes parents, mon frère, ma sœur et mes amis qui, même avec six heures de décalage horaire, ont été présents et m'ont soutenue jusqu'au bout. Je tiens à remercier particulièrement Jessica, Leslie et Adam pour la relecture en français et en anglais, et leur soutien quotidien précieux.

## TABLE DES MATIERES

---

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Intégration des fétuques fines à l'industrie du gazon américaine pour répondre au nouveau marché des pelouses à faible entretien.....</b>	<b>3</b>
<b>I. L'industrie du gazon : chiffres, produits et acteurs .....</b>	<b>3</b>
A. Quelques chiffres sur les gazons aux Etats-Unis .....	3
B. Classification des produits.....	3
1. Classification par type de climat .....	3
2. Classification technique .....	3
3. Classification par usage .....	4
4. Classification par type de marché .....	4
C. La filière gazon et ses acteurs.....	5
<b>II. De nouveaux objectifs pour les sélectionneurs : vers des gazons à faible entretien .....</b>	<b>6</b>
A. Impacts des gazons traditionnels sur l'environnement.....	6
B. Les attentes des particuliers : moins d'arrosage et moins de tontes.....	6
C. Les attentes des producteurs de semences : rendement et résistance aux maladies.....	7
<b>III. Les fétuques fines comme espèces majeures des gazons à faible entretien .....</b>	<b>7</b>
A. Faible représentation des fétuques fines au sein du marché du gazon .....	7
B. Adaptation des fétuques fines aux milieux pauvres, secs et salins.....	7
1. Classification taxonomique.....	7
2. Description botanique .....	7
3. Les cinq espèces et sous-espèces de fétuques fines d'importance agronomique .....	7
C. La fétuque rouge traçante et ses particularités .....	9
1. La fétuque rouge traçante : une des sous-espèces les plus performantes des fétuques fines .....	9
2. L'adaptation aux sols à forte salinité.....	9
3. Endophytes et résistance aux pathogènes .....	10
<b>IV. Les techniques moléculaires appliquées à l'amélioration des espèces pour le gazon .....</b>	<b>11</b>
A. Marqueurs moléculaires et utilisation en amélioration des plantes .....	11
1. Les principaux marqueurs moléculaires .....	11
2. Applications en amélioration des plantes .....	14
D. Les connaissances moléculaires acquises sur les fétuques fines .....	15
1. Niveau de ploïdie.....	15
2. Marqueurs .....	16
3. Séquences .....	16
<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>17</b>
<b>I. Séquençage nouvelle génération et assemblage du génome .....</b>	<b>17</b>
A. Matériel végétal utilisé .....	17
B. Extraction d'ADN .....	17
C. Séquençage nouvelle génération et assemblage du génome .....	17
<b>II. Création des marqueurs SSR.....</b>	<b>17</b>
A. Détection des motifs SSR et des amorces.....	17
B. Développement des marqueurs SSR .....	18
<b>III. Caractérisation des marqueurs SSR .....</b>	<b>18</b>



A. Matériel végétal utilisé .....	18
B. Extraction d'ADN .....	19
C. PCR et électrophorèse par capillarité .....	19
D. Analyse des données.....	19
<b>IV. Etude de diversité génétique.....</b>	<b>20</b>
A. Matériel végétal utilisé .....	20
B. Extraction d'ADN, PCR et électrophorèse par capillarité.....	20
C. Analyse des données.....	20
<b>Résultats et Interprétations.....</b>	<b>22</b>
<b>I. Informations sur le génome de <i>Festuca rubra</i> subsp. <i>rubra</i> .....</b>	<b>22</b>
<b>II. Marqueurs microsatellites pour <i>Festuca rubra</i> subsp. <i>rubra</i> .....</b>	<b>22</b>
<b>III. Diversité des ressources génétiques du programme d'amélioration des fétuques fines.....</b>	<b>22</b>
A. Marqueurs SSR .....	22
B. AMOVA.....	22
C. Arbre phylogénétique .....	23
1. Validation de l'arbre .....	23
2. Arbre, pédigrée et sélectionneurs .....	23
3. Informations sur les accessions .....	24
D. Résultats de l'algorithme bayésien.....	24
1. Détermination du nombre optimal de populations.....	24
2. Résultats pour K=3 .....	47
1. Résultats pour K=12 .....	25
<b>Discussion et Perspectives .....</b>	<b>27</b>
<b>I. Discussion de la méthode.....</b>	<b>27</b>
A. Validation de l'arbre phylogénétique .....	27
B. Méthode de regroupement : UPGMA vs Neighbor Joining .....	27
C. Algorithmes du Neighbor Joining et bayésien : comparaison des résultats.....	27
D. Détermination du nombre optimal de populations : Ln P(D) vs Delta K .....	28
E. Nouvelles techniques de génotypage : marqueurs SSR vs marqueurs SNP .....	28
<b>II. Discussion des résultats .....</b>	<b>29</b>
A. Les collections d'Europe sont-elles des fétuques rouges traçantes ?.....	29
B. Mise en perspective des résultats par rapport à d'autres espèces végétales.....	29
<b>III. Application des résultats au programme d'amélioration .....</b>	<b>30</b>
A. Une faible diversité du germplasma.....	30
B. Des marqueurs SSR pour identifier les espèces et sous-espèces de fétuque fine.....	31
C. Aide au choix des variétés dans les mélanges pour gazon .....	31
<b>IV. Perspectives de recherche.....</b>	<b>31</b>
A. Application des empreintes génétiques pour l'identification de variétés et la protection variétale	31
B. Développement de marqueurs pour les autres espèces et sous-espèces de fétuques fines .....	32
<b>Conclusion.....</b>	<b>33</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>34</b>
<b>Sitiographie.....</b>	<b>38</b>

## LISTE DES TABLEAUX & FIGURES

---

<b><i>Tableau 1 : Chiffres sur l'industrie du gazon aux Etats-Unis. Eléments de comparaison avec la France et l'industrie du maïs.....</i></b>	<b><i>3</i></b>
<b><i>Tableau 2a : Description des principales espèces pour les gazons de climat froid et tempéré. ....</i></b>	<b><i>3</i></b>
<b><i>Tableau 2b : Principales espèces pour les gazons de climat chaud. ....</i></b>	<b><i>3</i></b>
<b><i>Figure 2 : La filière gazon, acteurs et produits. ....</i></b>	<b><i>5</i></b>
<b><i>Figure 3 : Parts de marché des principales espèces de gazon en France entre 1998 et 2003. ....</i></b>	<b><i>7</i></b>
<b><i>Figure 4 : Parts de marché des principales espèces de gazon utilisées par les ménages en 2003 dans le New Jersey.....</i></b>	<b><i>7</i></b>
<b><i>Figure 5 : Parts de marché des principales espèces de gazon utilisées par les golfs en 2003 dans le New Jersey. ....</i></b>	<b><i>7</i></b>
<b><i>Figure 6 : Parts de marché des principales espèces de gazon utilisées pour les cimetières en 2003 dans le New Jersey.....</i></b>	<b><i>7</i></b>
<b><i>Figure 7 : Classification taxonomique des fétuques fines.. ....</i></b>	<b><i>7</i></b>
<b><i>Figure 8a : Illustration de la morphologie des graminées. ....</i></b>	<b><i>8</i></b>
<b><i>Figure 8b : Illustration de la préfoliation et du floret de fétuques fines. ....</i></b>	<b><i>8</i></b>
<b><i>Figure 9 : Comparaison des fétuques fines aux autres espèces pour gazon pour différents traits agronomiques. ....</i></b>	<b><i>8</i></b>
<b><i>Tableau 3a : Comparaison des fétuques fines sur le type de plante, la hauteur, la présence d'endophyte et la tendance à développer du chaume.....</i></b>	<b><i>9</i></b>
<b><i>Tableau 3b : Comparaison des fétuques fines sur la qualité, la vigueur au semis, la résistance au fil rouge et la tolérance à la salinité. ....</i></b>	<b><i>9</i></b>
<b><i>Figure 10 : Schéma de fonctionnement des marqueurs SSR.....</i></b>	<b><i>13</i></b>
<b><i>Tableau 5 : Niveaux de ploïdie des fétuques fines.....</i></b>	<b><i>15</i></b>
<b><i>Tableau 6a : Description des populations utilisées dans l'étude de diversité génétique.. ..</i></b>	<b><i>18</i></b>
<b><i>Tableau 6b : Description des populations utilisées dans l'étude de diversité génétique. ...</i></b>	<b><i>19</i></b>
<b><i>Tableau 7 : Informations sur les 22 marqueurs SSR obtenus et leurs caractéristiques. ....</i></b>	<b><i>19</i></b>
<b><i>Figure 11 : Distribution de la variance moléculaire intra et inter-populations. ....</i></b>	<b><i>42</i></b>
<b><i>Figure 12 : Variance moléculaire par population .....</i></b>	<b><i>22</i></b>
<b><i>Figure 13 : Valeurs DeltaK en fonction de K. ....</i></b>	<b><i>22</i></b>
<b><i>Figure 14 : Valeurs Ln P(D) en fonction de K.....</i></b>	<b><i>22</i></b>

<b><u>Figure 15</u> : Arbre phylogénétique des 37 cultivars de féтуque fine. ....</b>	<b>23</b>
<b><u>Figure 16</u> : Répartition des populations par individu pour K=3. ....</b>	<b>24</b>
<b><u>Figure 17</u> : Répartition des populations par individu pour K=12 ....</b>	<b>25</b>
<b><u>Tableau 8</u> : Applicabilité des marqueurs SSR aux espèces et sous-espèces de féтуques fines. .....</b>	<b>31</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

**AFLP:** Amplified Fragment Length Polymorphisms  
**AMOVA:** Analysis of Molecular VAriance  
**AOSCA:** Association of Official Seed Certifying Agencies  
**COV:** Certificat d'Obtention Végétale  
**CTBT:** Cooperative Turfgrass Breeders Test  
**DNA:** Desoxyribo Nucleic Acid  
**cDNA:** Complementary DNA  
**EPA:** Environmental Protection Agency  
**EST (markers):** Expressed Sequence Tags  
**GBS:** Genotyping By Sequencing  
**GNIS:** Groupement National Interprofessionnel des Semences  
**GRIN:** Germplasm Resources Information Network  
**INRA:** Institut National de Recherche Agricole  
**ITS:** Internal Transcribed Spacer  
**NCBI:** National Center for Biotechnology Information  
**NTEP:** National Turfgrass Evaluation Program  
**NTSYS:** Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System  
**pb:** Paire de bases  
**PCR:** Polymerase Chain Reaction  
**PVP:** Plant Variety Protection  
**QTL:** Quantitative Trait *Locus*  
**RFLP:** Random Fragment Length Polymorphism  
**RAPD:** Random Amplified Polymorphic DNA  
**RNA:** Ribo Nucleic Acid  
**mRNA:** Messenger RNA  
**rRNA:** Ribosomal RNA  
**SNP:** Single Nucleotide Polymorphism  
**SSR:** Single Sequence Repeat  
**SWOT:** Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats  
**UPGMA:** Unweighed Pair Group Method with Arithmetic Mean  
**UPOV:** Union pour la Protection des Obtentions Végétales  
**USDA:** United States Department of Agriculture

## LEXIQUE

---

*Les définitions suivantes sont tirées de Palomar College Genetics Glossary of Terms, Wageningen University, Wyoming University, Oregon State University et University of California.*

**Adaptateur d'ADN** : En génie moléculaire, un adaptateur est une courte molécule d'ADN double-brin synthétisée pour lier les terminaisons de deux autres molécules d'ADN.

**ADN sonde** : Un ADN sonde est un fragment d'ADN de taille variable (entre 100 et 1000 pb) marqué radio-activement.

**Allèle** : Un allèle est une version différente d'un même gène ou d'un même *locus*. Les allèles pour un caractère donné occupent la même position sur les chromosomes homologues.

**Amorce** : Une amorce est un court brin d'ADN qui sert comme point de démarrage pour la synthèse d'ADN.

**AMOVA** : L'analyse de la variance moléculaire est une méthode statistique qui permet d'étudier les variations moléculaires au sein d'une espèce ou de populations en évaluant les relations entre individus par analyse multidimensionnelle (Excoffier *et al.*, 1992).

**Arbre phylogénétique** : Un arbre phylogénétique est un diagramme à branches montrant les relations d'évolution entre plusieurs entités, basé sur les similarités ou différences de caractéristiques phénotypiques ou génotypiques. Les individus regroupés ont un ancêtre commun récent.

**Corrélation cophénétique**: En biostatistiques, la corrélation cophénétique mesure la fidélité de représentation d'un arbre phylogénétique par rapport à la matrice des distances qui a permis de construire cet arbre.

**Cytométrie en flux** : La cytométrie en flux est une technique biophysique impliquant un rayon laser focalisé sur un flux de fluide contenant des cellules en suspension, analysées par un appareil de détection électronique.

**Distance génétique** : La distance génétique est la mesure de la divergence génétique entre des espèces, des populations ou des individus. Des populations qui ont beaucoup de gènes similaires ont de faibles distances génétiques ce qui indique qu'elles sont fortement apparentées et ont un ancêtre commun récent.

**Endophyte** : Un endophyte est un symbiote, souvent une bactérie ou un mycète, qui vit à l'intérieur d'une plante pendant au moins une partie de son cycle, sans causer de maladie apparente.

**Electrophorèse** : L'électrophorèse est la dispersion relative de particules à travers un fluide sous l'influence d'un champ électrique uniforme.

**Empreintes génétiques** : Les empreintes génétiques sont une technique moléculaire basée sur l'étude de l'ADN utilisée pour identifier des individus.

**Enzyme de restriction** : Une enzyme de restriction est une enzyme qui coupe l'ADN au niveau d'un site de reconnaissance appelé site de restriction.

**Erosion du sol** : L'érosion du sol est la disparition de la couche superficielle du sol par l'eau ou le vent.

**Gazon à faible entretien** : Un gazon à faible entretien est un gazon qui ne nécessite pas ou peu d'arrosage, de tontes, de fertilisation, de désherbage et d'application de pesticides et fongicides.

**Gène** : Un gène est une unité d'information génétique positionnée à un *locus* spécifique sur un chromosome. Physiquement, c'est une séquence de nucléotides.

**Germplasma** : Le germplasma est l'ensemble des ressources génétiques d'une espèce ou d'un genre animal ou végétal conservé pour l'amélioration des lignées végétales ou animales et la préservation de la biodiversité.

**Hétérozygote** : Un organisme diploïde est hétérozygote pour un gène lorsque ses cellules contiennent deux allèles différents pour ce gène.

**Homozygote** : Un organisme est homozygote pour un gène lorsque ses cellules contiennent un seul et même allèle pour ce gène.

**Îlot de chaleur** : Un îlot de chaleur urbain est une surface urbaine significativement plus chaude que ses régions rurales voisines, causé par les activités humaines.

**Ligule** : Une ligule est une extension du limbe foliaire souvent verticale et membraneuse.

**Locus, loci** : Terme latin signifiant 'endroit', un *locus* est une partie d'ADN à un endroit particulier d'un chromosome.

**Marqueur génétique** : Un marqueur génétique est un indicateur utilisé pour évaluer la variation génétique entre ou parmi des populations. Le marqueur peut-être basé sur l'observation de traits phénotypiques, de protéines ou de segments d'ADN.

**Méiose** : La méiose est un type de division cellulaire qui réduit le nombre de chromosomes de moitié. Ce processus apparaît dans toutes les cellules sexuelles eucaryotes.

**Marqueur codominant** : Un marqueur codominant est un marqueur pour lequel les deux allèles sont exprimés lorsqu'ils sont présents chez un individu hétérozygote. Par conséquent, les individus hétérozygotes sont distinguables avec des marqueurs codominants ce qui permet de déterminer les génotypes et la fréquence allélique à un *locus*.

**Marqueur dominant** : Un marqueur dominant est un marqueur pour lequel homozygotes et hétérozygotes ne sont pas distinguables.

**Niveau de ploïdie**: Le niveau de ploïdie est le nombre de lots de chromosomes au sein d'un organisme. Chaque lot est désigné par  $n$  : un lot est  $n$  (haploïde), deux lots sont  $2n$  (diploïde), trois lots sont  $3n$  (triploïdes), etc.

**Oreillettes** : Les oreillettes sont de courts appendices, souvent en forme de griffe, situés à la base des limbes foliaires. Les différentes formes d'oreillettes sont souvent des éléments clés pour identifier les graminées.

**PCR**: La Polymerase Chain Reaction est une technique de biologie moléculaire permettant de multiplier quelques molécules d'ADN en millions de copies.

**Plus A** : Le phénomène "plus-a" est caractérisé par une bande additionnelle (ou un pic) au-dessus de la longueur « réelle » de l'allèle, due à l'activité de la transférase terminale de la polymérase qui ajoute des molécules d'adénines aux produits de PCR.

**Polymorphisme** : Le polymorphisme est l'existence de nombreuses formes de séquences d'ADN pour un *locus* au sein d'une population.

**Potentiel osmotique** : Le potentiel osmotique est le potentiel des molécules d'eau à diffuser depuis un milieu hypotonique (beaucoup d'eau, peu de solutés) vers un milieu hypertonique (peu d'eau, beaucoup de solutés) à travers une membrane perméable.

**Ruissellement de surface** : Le ruissellement de surface est un flux d'eau sur la surface terrestre lors de tempêtes, de fontes des glaces ou d'autres flux. C'est la première cause d'érosion du sol.

**SSR chloroplastique** : Un marqueur chloroplastique consiste en une répétition de 8 à 15 motifs nucléotidiques. Il existe deux principales différences entre les microsatellites des chloroplastes et du noyau. Premièrement, les chloroplastes sont issus d'un seul parent (maternel). Deuxièmement, le chromosome chloroplastique est non-recombinant ; tous les *loci* sont donc liés.

**Tallage** : Le tallage est la production de tiges après la formation de la tige initiale à partir de la graine.

## AVANT-PROPOS

---

*Les objectifs de mon stage de fin d'études réalisé au sein du département de Biologie et Pathologie des Plantes de l'Université de Rutgers, New Jersey, ont été définis selon des problématiques majoritairement liées au contexte des Etats-Unis. Néanmoins, certains enjeux communs à la France permettent d'établir des comparaisons. Dans ce mémoire, je présenterai le contexte américain qui explique les choix de démarche et d'objectifs de stage. Je m'appliquerai également à mettre en parallèle des éléments du contexte français lorsque cela est possible. Ainsi, j'espère enrichir ce rapport et permettre au lecteur de comprendre le contexte et les enjeux des Etats-Unis et de savoir quels points sont transposables à la France.*



## INTRODUCTION

---

Aux Etats-Unis comme en France, plus de la moitié de la population vit en milieu urbain. L'urbanisation est croissante dans la plupart des pays du monde. En 2010, 80.7% de la population américaine vit en zone urbaine (US Census, 2010) et 79% pour la France en 2014 (Banque Mondiale de Données, 2014).

Les impacts négatifs du milieu urbain sur la santé ont été démontrés à plusieurs reprises. En 1989, Dockery *et al.* mettent en évidence l'augmentation du taux de maladies respiratoires chez les enfants vivant en ville à forte pollution. En 2011, Lederbogen *et al.* publient un article dans la revue scientifique *Nature* démontrant les risques neurologiques de la vie en ville.

L'urbanisation étant toujours en progression, les gouvernements cherchent des solutions pour améliorer le bien-être et les conditions de vie des urbains. De nombreuses études prouvent l'effet positif du végétal en ville sur la santé par réduction du stress et par augmentation des activités physiques et des moments de détente (Ulrich, 1984 ; Laforzezza *et al.*, 2009). Conscients de ces nombreux avantages, les urbains français déclarent dans une enquête que la qualité du cadre de vie, en termes de proximité et d'état des espaces verts, est plus importante que la proximité des commerces, ou l'accessibilité en transports en commun (VALHOR, 2014).

Ces espaces végétalisés ont également des impacts environnementaux très positifs. Le phénomène d'îlots de chaleur\*, principalement attribuable au cadre bâti urbain, peut être diminué par le verdissement à petite et à grande échelle (Giguère, 2009 ; Oke *et Cleugh*, 1987; Voogt *et Oke*, 2003). Les surfaces végétalisées peuvent également jouer un rôle majeur dans l'évacuation des eaux et la diminution de l'érosion des sols (Gyssels *et al.*, 2005).

Les espaces végétalisés sont donc essentiels et de plus en plus développés par les mairies. Parallèlement, les gérants d'espaces verts doivent faire face à de nombreuses contraintes apparues récemment, en France comme aux Etats-Unis. La prise de conscience des problématiques environnementales, notamment concernant l'utilisation des pesticides et fertilisants, a provoqué de nombreuses restrictions et interdictions (Ecophyto 2018, Loi Labbé, listes de restriction EPA (Environmental Protection Agency), *etc.*). Lorsqu'ils sont mal utilisés, ces produits peuvent polluer les nappes phréatiques et certains éléments, comme le phosphore ou les nitrates, peuvent causer des problèmes de santé et perturber les écosystèmes voisins (Hallberg, 1989).

Les espaces engazonnés sont concernés par ces enjeux de par les surfaces qu'ils occupent, leurs coûts d'entretien et de main d'œuvre élevés et leurs multiples fonctions au sein des espaces verts (repos, détente, pique-nique, jeux, sport, paysage, *etc.*) (GNIS, Groupement National Interprofessionnel des Semences, 2013). D'autre part, les pelouses des particuliers sont aussi soumises à des restrictions d'eau en été et d'usage de fertilisants contenant du phosphore (Massachusetts State, 2015 ; Miller, 2012). La fréquence de tonte, l'arrosage en été, la fertilisation, l'élimination des adventices, la prévention des pathogènes, sont des étapes essentielles au maintien d'un gazon mais qui ont également un impact important sur l'environnement et qu'il faut donc viser à diminuer au long terme.

C'est dans ce contexte que les sélectionneurs développent des variétés qui ne nécessitent pas ou peu d'entretien. Le centre de recherche et d'expérimentation pour le gazon de Rutgers University possède les programmes de sélection les plus importants des



Etats-Unis. Afin de répondre aux enjeux précédemment énoncés, un programme d'amélioration des fétuques fines (*Festuca spp.*) a été initié dans les années 1970. Le genre *Festuca*, originaire d'Europe, comprend cinq espèces communément utilisées pour le gazon (fétuque rouge traçante, fétuque rouge semi-traçante, fétuque rouge gazonnante, fétuque durette et fétuque ovine), caractérisées par leur adaptation aux milieux secs, pauvres et à forte salinité (Ruemmele *et al.*, 2003). Actuellement peu utilisées dans les mélanges pour gazon, ces espèces sont néanmoins très prometteuses pour les espaces coûteux ou difficiles à entretenir. Ces espèces n'ayant pas ou peu été étudiées dans le passé, certaines caractéristiques sont à améliorer comme la résistance aux maladies (le « dollar spot » ou brûlure en plaques *Sclerotinia homoeocarpa*, le « brown patch » ou la plaque brune rhizoctone *Rhizoctonia solani*, le « red thread » ou maladie du fil rouge *Laetisaria fuciformis*) et la résistance à l'arrachement et au piétinement (Bonos *et al.*, 2006 ; Ruemmele *et al.*, 2003).

En 1996, des prélèvements en Europe ont été initiés afin d'améliorer la diversité de la collection. Depuis, de nombreuses variétés ont été brevetées et commercialisées. Aujourd'hui le programme prend plus d'importance du fait d'une meilleure sensibilisation du public et des producteurs aux problèmes environnementaux ainsi qu'un besoin collectif d'espaces verts esthétiques et agréables.

Dans le but d'optimiser et d'améliorer ses connaissances sur sa collection, le programme de sélection de Rutgers University sur les fétuques fines décide d'utiliser les outils de génétique moléculaire et de donner naissance à ce projet portant principalement sur l'étude de la fétuque rouge traçante – *Festuca rubra* subsp. *rubra*.

Les outils moléculaires tels que les marqueurs sont déjà très utilisés pour les espèces alimentaires comme le blé (*Triticum spp.*), le maïs (*Zea mays*) ou le riz (*Oryza spp.*). De nos jours, les coûts de matériels diminuant, ces techniques sont accessibles pour d'autres industries. Ces outils de génotypage permettent une connaissance approfondie, rapide et objective des individus.

Le projet consiste dans un premier temps en la détection de marqueurs microsatellites (ou SSR, Simple Sequence Repeats) par séquençage partiel du génome puis leur caractérisation. Dans un second temps, une étude de diversité génétique a été réalisée sur un panel de 37 variétés-populations contenant 29 fétuques rouges traçantes, 1 fétuque rouge gazonnante, 2 fétuques ovines, 5 fétuques durettes et 2 fétuques semi-gazonnantes.

Dans une première partie nous étudierons la filière gazon et ses programmes d'amélioration, puis dans une deuxième partie nous exposerons les matériels et méthodes utilisés pour répondre au sujet. Dans une troisième partie nous aborderons les résultats obtenus pour dans une dernière partie les discuter et développer les perspectives de futurs travaux associés.

Tableau 1 : Chiffres sur l'industrie du gazon aux Etats-Unis. Eléments de comparaison avec la France et l'industrie du maïs. Sources : (1). Milesi *et al.*, 2005. (2). USDA, 2012. (3). Haydu *et al.*, 2002. (4). Statisca, 2015. (5). UFS Semenciers, 2015. (6). GNIS, 2015. (7). Agreste, 2015. *Les années des données ne sont pas nécessairement les mêmes, bien que proches. Ces données sont à titre indicatif afin de donner un ordre de grandeur.*

	USA	France
<b>Surfaces totales de gazon</b>	163 800 km <sup>2</sup> <sup>(1)</sup>	10 000 km <sup>2</sup> <sup>(5)</sup>
<b>Surfaces cultivées pour les graines</b>	3 074 km <sup>2</sup> <sup>(2)</sup>	48.9 km <sup>2</sup> <sup>(6)</sup>
<b>Surfaces cultivées pour le gazon en plaques</b>	1 300 km <sup>2</sup> <sup>(2)</sup>	
<b>Chiffre d'affaires total (au stade de production)</b>	\$1.6 milliards <sup>(3)</sup>	177 millions € <sup>(6)</sup>
<b>Surfaces maïs</b>	353 748 km <sup>2</sup> <sup>(2)</sup>	17 000 km <sup>2</sup> <sup>(7)</sup>
<b>Chiffre d'affaires maïs (production)</b>	\$62 milliards <sup>(4)</sup>	

Tableau 2a : Description des principales espèces pour les gazons de climat froid et tempéré. Source : adapté de Flint *et al.*, 2015 et Casler *et Duncan*, 2003.

CLIMAT FROID ET TEMPERE			
NOM COMMUN FR	NOM SCIENTIFIQUE	NOM COMMUN US	PRINCIPALES CARACTERISTIQUES
<b>Pâturin des prés</b>	<i>Poa pratensis</i>	Kentucky Bluegrass	Espèce la plus commune aux Etats-Unis Tolérance à l'ombre moyenne Arrosage fréquent en été pour conserver esthétique Fertilisation fréquente Très belle texture fine et couleur vert foncé
<b>Pâturin annuel</b>	<i>Poa annua</i>	Annual Bluegrass	Supporte tonte très rase Utilisé pour greens de golf Très belle texture fine et homogène
<b>Ray-grass anglais</b>	<i>Lolium perenne</i>	Perennial Ryegrass	Espèce très commune Faible tolérance à l'ombre Implantation au semis très rapide, très vigoureux, résiste au piétinement et à l'arrachement Très belle texture fine et couleur vert foncé
<b>Agrostis</b>	<i>Agrostis sp.</i>	Bentgrass	Supporte tonte très rase Utilisé pour les greens de golf Besoins en irrigation et arrosage très forts
<b>Fétuque élevée</b>	<i>Festuca arundinacea</i>	Tall Fescue	Résiste aux endroits partiellement ombragés Très bonne tolérance à la chaleur, très vigoureux Bonne résistance aux maladies Texture des feuilles assez grossière
<b>Fétuques fines</b>	<i>Festuca sp.</i>	Fine Fescues	Résiste aux endroits ombragés Aime sols pauvres et drainés Résiste aux conditions de sécheresse Faible résistance à la chaleur et au piétinement Texture très fine, gazons denses et vert foncé

Tableau 2b : Principales espèces pour les gazons de climat chaud. Source : adapté de Flint *et al.*, 2015 et Casler *et Duncan*, 2003.

CLIMAT CHAUD		
NOM COMMUN FR	NOM SCIENTIFIQUE	NOM COMMUN US
<b>Chiendent pied-de-poule</b>	<i>Cynodon dactylon</i>	Common Bermudagrass
<b>Bouteloua dactyloides</b>	<i>Buchloe dactyloides</i>	Buffalograss
<b>Kikuyu</b>	<i>Pennisetum clandestinum</i>	Kikuyugrass
<b>Faux kikuyu, Chiendent de bœuf, Stenotaphrum</b>	<i>Stenotaphrum secundatum</i>	St Augustinegrass
<b>Zoysia du Japon</b>	<i>Zoysia japonica</i>	Zoisyagrass
<b>Alfombra</b>	<i>Dichondra micrantha</i>	Dichondra

# INTEGRATION DES FETUQUES FINES A L'INDUSTRIE DU GAZON AMERICAINE POUR REpondre AU NOUVEAU MARCHÉ DES PELOUSES A FAIBLE ENTRETIEN

---

## Définition

Le gazon est une surface densément semée en majorité de graines de graminées en raison de leur « aptitude naturelle à former des populations étendues et denses. Le tallage, phénomène spécifique aux graminées, entraîne la densification du tapis végétal par la création de touffes serrées. Par ailleurs, les graminées supportent les coupes rases et fréquentes contrairement à la plupart des dicotylédones, et sont capables de pousser dans des conditions de climats et de milieux très différentes. » (GNIS, 2015).

Dans cette partie, nous présenterons dans un premier temps la filière gazon aux Etats-Unis et les nouveaux objectifs que les obtenteurs doivent satisfaire. Ceci nous permettra d'introduire les caractéristiques des fétuques fines et de montrer en quoi elles peuvent répondre parfaitement à ces objectifs. Enfin, nous exposerons en quoi les outils moléculaires peuvent aider les obtenteurs dans ce contexte.

## I. L'INDUSTRIE DU GAZON : CHIFFRES, PRODUITS ET ACTEURS

### A. QUELQUES CHIFFRES SUR LES GAZONS AUX ETATS-UNIS

L'industrie du gazon a une forte importance dans l'économie agricole des Etats-Unis. Tous les Etats sont producteurs bien que l'Oregon possède les plus grandes surfaces de culture. L'ensemble de la filière dégage un chiffre d'affaires de \$56 milliards, dont \$1.6 dus à la production (USDA, 2012). Comme illustré dans le [Tableau 1](#), les surfaces totales de gazon et le chiffre d'affaires en production sont environ 10 fois supérieurs à la France. L'industrie du gazon est toutefois nettement inférieure à celle du maïs.

### B. CLASSIFICATION DES PRODUITS

Il existe plusieurs classifications des produits végétaux de l'industrie du gazon. Chacune d'elle permet d'aborder un point de vue différent (botanique, technique, usager et marché) afin de cerner la complexité de la filière.

#### 1. Classification par type de climat

La classification se divise en deux types d'espèces : les espèces de climat froid à tempéré (cool season type grasses) et les espèces de climat chaud (warm season type grasses) (Flint *et al.*, 2009 ; Casler *et Duncan*, 2003) . Le [Tableau 2a](#) décrit les différentes espèces de climat froid et tempéré et leurs propriétés. Le [Tableau 2b](#) énumère les espèces de climat chaud (bien que les descriptions ne soient pas développées puisque ces espèces ne concernent pas la zone étudiée par le programme d'amélioration).

#### 2. Classification technique

Le gazon est commercialisé soit sous forme de semences, soit sous forme de plaques ou rouleaux. Le gazon en sacs de semences est un mélange d'espèces permettant de répondre aux caractéristiques du terrain à semer. Chaque espèce ayant des qualités et défauts différents, leur combinaison permet d'obtenir des gazons bien adaptés. La préparation du terrain doit être réalisée rigoureusement afin d'obtenir une texture du sol très



Figure 1 : Production de gazon en plaque. Source : Université de Rhode Island, 2015.

fine en surface pour que l'implantation réussisse. Les principales causes d'échec du semis sont la sécheresse, la chaleur ou le froid. L'apparition de mauvaises herbes au moment du semis est également un risque (Mason, 2015).

Le gazon en plaques ou en rouleaux (*Figure 1*) est commercialisé sous forme de « rouleaux » de gazon déjà développé. Le rouleau contient à la fois le sol et les graminées enracinées. L'avantage principal est la rapidité d'implantation et le résultat instantané. Le risque principal est la mauvaise reprise si les conditions d'humidité ne sont pas respectées. De plus, le coût du gazon en plaque est nettement supérieur par rapport aux mélanges de semences (Mason, 2015).

### **3. Classification par usage**

On classe généralement les gazons en quatre catégories d'usages (GNIS, 2015).

#### **Les pelouses d'ornement**

Elles mettent en valeur les maisons, les bâtiments et autres sites prestigieux. Le gazon doit donc être fin, dense et homogène. Le niveau d'entretien (arrosage, fertilisation, tonte, désherbage, ...) est très élevé.

#### **Les pelouses de détente et d'agrément**

Ce sont les pelouses présentes dans les parcs ou les jardins des particuliers. Le gazon doit donc être fin, dense et résister au piétinement modéré. Le niveau d'entretien est assez élevé.

#### **Les pelouses sport**

Les pelouses de sport ont des propriétés bien particulières. Elles doivent être très esthétiques, résister au piétinement et à l'arrachement et supporter des tontes très fréquentes. Le niveau d'entretien est très élevé.

#### **Les pelouses de couverture**

Ce sont les pelouses des espaces en zone urbaine qui ne doivent pas nécessiter beaucoup d'entretien (bords de route, parcs d'activités, ...). Le gazon doit donc être facile à installer, supporter un entretien faible et accepter des conditions peu favorables. Le niveau d'entretien est faible.

### **4. Classification par type de marché**

Selon le Centre de Rutgers pour les Sciences du Gazon (Rutgers Center for Turfgrass Science), il existe deux types de marchés : le premier regroupe les entreprises qui ne sont pas les destinataires finaux du produit (actes d'achat et de vente), le deuxième comprend les entreprises ou particuliers qui sont les destinataires finaux du produit (acte d'achat) (Govindasamy *et al.*, 2007).

*Les chiffres utilisés dans la classification suivante sont ceux du New Jersey publiés par Govindasamy *et al.* en 2007.*

#### **Entreprises (ne sont pas les destinataires finaux)**

Producteurs de gazon en plaques : ce sont en majorité des entreprises en BtoB avec une faible proportion faisant du commerce au détail (environ 20% pour le New Jersey). Ce marché est dépendant du conditionnement de son produit : la vente en plaque nécessite un arrosage permanent. Il est donc soumis aux restrictions d'eau qui ont lieu en cas de périodes

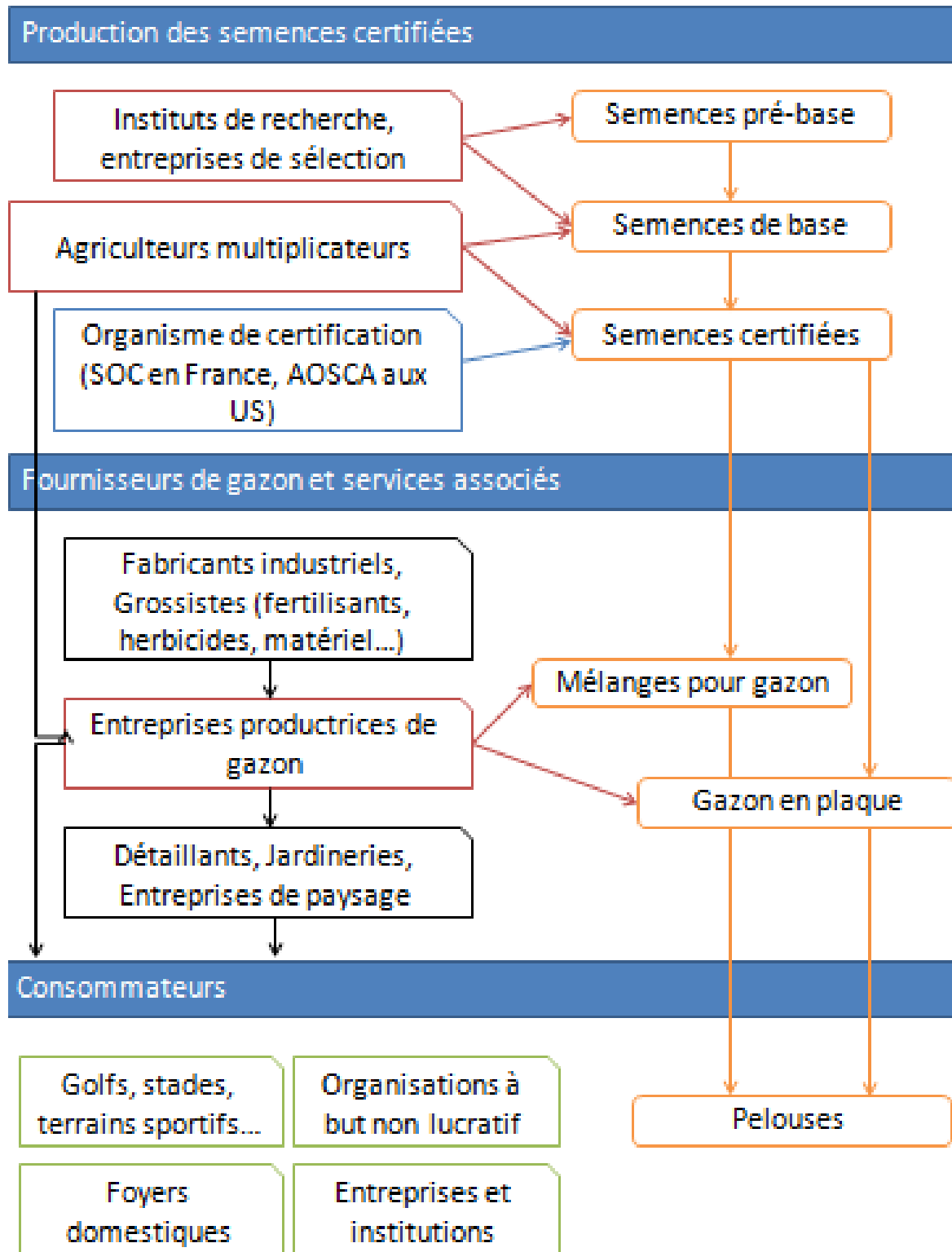


Figure 2: La filière gazon, acteurs et produits. Orange : chaîne produit ; cadres rouges : entreprises de sélection et/ou production ; cadre bleu : organisme de contrôle ; Cadre noir : entreprises sans activité de production ; cadre vert : consommateurs. Source : adapté et synthétisé à partir des données de l'AOSCA et de Haydu et al., 2002.



de sécheresse. Les espèces principalement utilisées sont le pâturin des prés et la fétuque élevée (Govindasamy *et al.*, 2007).

Entreprises de services paysagers : ce sont majoritairement des petites et moyennes entreprises commerçant à 70% avec les particuliers et à 30% avec les entreprises. Elles sont également dépendantes des restrictions en eau et des législations relatives à l'emploi des pesticides. Les pelouses mises en place sont à 65% issues de semis et à 35% du gazon en plaque. Les espèces principales utilisées sont le ray-grass anglais, le pâturin des prés et la fétuque élevée (Govindasamy *et al.*, 2007).

### **Destinataires finaux (entreprises ou particuliers)**

Golfs et terrains sportifs : les terrains de golf sont majoritairement constitués de pâturin des prés, de pâturin annuel et d'agrostis. Les golfs sont à 60% privés, à 30% publics et à 10% semi-privés. Ils sont principalement demandeurs de variétés résistantes à la sécheresse, au piétinement et à l'arrachement ainsi qu'aux maladies (Haydu *et al.*, 2012 ; Govindasamy *et al.*, 2007).

Organisations à but non lucratif : écoles, collèges, universités, églises, cimetières, établissements publics, espaces verts publics, *etc.* Aux Etats-Unis, les cimetières sont totalement engazonnés et représentent donc une surface non négligeable. Le ray-grass anglais et le pâturin des prés sont les espèces les plus présentes. Le point commun de ces organisations est le faible budget et donc une nécessité de réduire les coûts d'entretien au maximum (peu de tontes, peu d'arrosage ou de fertilisation, bonne résistance aux maladies) tout en maintenant un gazon esthétique (Haydu *et al.*, 2012 ; Govindasamy *et al.*, 2007).

Pelouses des foyers domestiques : en moyenne, la surface de pelouses de maisons individuelles est 0.32 acres soit 1 295m<sup>2</sup>. Le pâturin des prés et le ray-grass anglais sont les espèces les plus communes, bien que plus de 60% des foyers ne sache pas quelle espèce est semée. Les problèmes les plus rencontrés sont les mauvaises herbes, l'arrosage et les insectes ravageurs (Haydu *et al.*, 2012 ; Govindasamy *et al.*, 2007).

Entreprises et institutions : aéroports, résidences, hôtels, jardins d'agrément privés, sièges d'entreprises, *etc.* Leur point commun est la volonté d'esthétisme pour soigner l'image de l'entreprise ou de l'institution (Haydu *et al.*, 2012 ; Govindasamy *et al.*, 2007).

## **C. LA FILIERE GAZON ET SES ACTEURS**

Le schéma de la filière gazon (*Figure 2*) illustre les relations entre les acteurs et les produits avec lesquels ils sont en interaction. La production des semences est réalisée par des entreprises qui effectuent la plupart du temps la multiplication et la distribution. La certification des semences est sous la responsabilité de l'AOSCA (Association of Official Seed Certifying Agencies) ; les brevets de protection des variétés PVP (Plant Variety Protection) sont attribués par l'USDA (United States Department of Agriculture).



## **BILAN**

L'industrie du gazon a une forte importance économique aux Etats-Unis. Les nombreuses espèces de graminées à gazon possèdent des propriétés différentes qui permettent de composer des mélanges adaptés à tous les besoins. Chaque destinataire final a des attentes particulières en fonction de son budget, des normes, de l'image qu'il souhaite renvoyer et du temps consacré à l'entretien du gazon.

## **II. DE NOUVEAUX OBJECTIFS POUR LES SELECTIONNEURS : VERS DES GAZONS A FAIBLE ENTRETIEN\***

Comme toute entreprise, les sélectionneurs doivent prendre en compte les attentes de leurs clients afin de déterminer leurs objectifs. Cependant, leur client est « double » puisque leurs consommateurs directs sont les producteurs qui ont eux-mêmes pour clients les consommateurs finaux (entreprises de paysage, jardineries, ménages, *etc.*). Il convient donc de bien étudier l'ensemble de ces besoins avant de définir les objectifs de sélection.

### **A. IMPACTS DES GAZONS TRADITIONNELS SUR L'ENVIRONNEMENT**

Les pelouses présentent à la fois des avantages et des inconvénients quant à leur impact sur l'environnement. Les surfaces engazonnées peuvent réduire l'érosion du sol\* et les ruissellements de surface\* (Krenitsky *et al.*, 1998), diminuer les effets d'îlots de chaleur en ville (Takebayashi *et Moriyama*, 2009), être des puits de carbone (Qian *et al.*, 2010) ainsi que fournir des aires de récréation esthétiques et agréables pour la population et nécessaires à la cohésion sociale (Beard *et Green*, 1994).

Néanmoins, les pratiques associées à la culture du gazon ont leur part de responsabilité dans la pollution des nappes phréatiques par utilisation excessive de fertilisants et pesticides. L'arrosage intensif en été est également préjudiciable (Milesi *et al.*, 2005; Robbins *et Birkenholtz*, 2003). Dans certains Etats des Etats-Unis, des restrictions d'eau et d'utilisation de fertilisants contenant du phosphore ont été établies (Massachusetts State, 2015 ; Miller, 2012). Ces mesures risquent fortement d'être adoptées dans le pays entier et renforcées, du fait de la disponibilité décroissante des ressources naturelles. L'ensemble de ces éléments appuie la nécessité de développer des gazons à faible impact sur l'environnement.

### **B. LES ATTENTES DES PARTICULIERS : MOINS D'ARROSAGE ET MOINS DE TONTES**

Peu d'études ont été menées directement sur les attentes des particuliers concernant leur pelouse. En 2012, Yue et Watkins développent une enquête sur 116 foyers du Minnesota ayant pour but de cerner les attentes des consommateurs et plus précisément de connaître le poids de l'esthétisme vs les caractéristiques d'entretien. Les résultats ont montré que la caractéristique « faibles besoins en arrosage » était un critère significativement déterminant dans l'acte d'achat. Les consommateurs sont également concernés par la fréquence de tonte (Yue *et al.*, 2012).

Une autre enquête également menée dans le Minnesota sur 942 foyers, montre l'importance d'un gazon de qualité pour avoir une bonne image auprès de ses voisins. Ceci

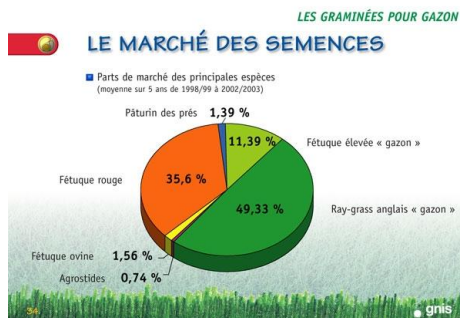


Figure 3 : Parts de marché des principales espèces de gazon en France entre 1998 et 2003. Source : GNIS pédagogie, 1998-2003.

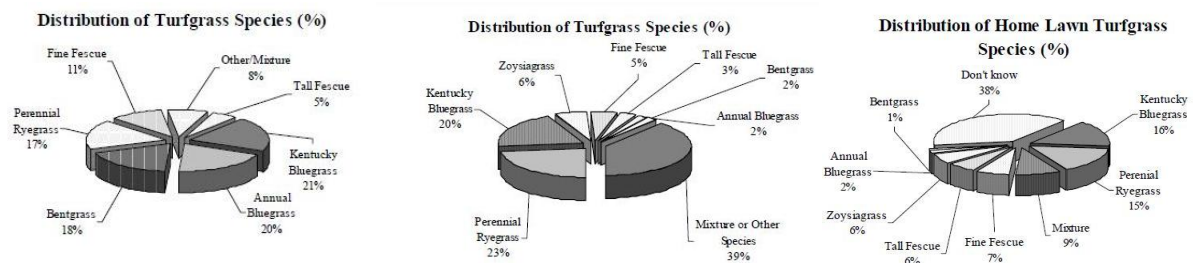


Figure 4 : Parts de marché des principales espèces de gazon utilisées par les ménages en 2003 dans le New Jersey. Source : Haydu et al., 2003.

Figure 5 : Parts de marché des principales espèces de gazon utilisées par les golfs en 2003 dans le New Jersey. Source : Haydu et al., 2003.

Figure 6 : Parts de marché des principales espèces de gazon utilisées pour les cimetières en 2003 dans le New Jersey. Source : Haydu et al., 2003.

Famille : Poaceae

Sous-famille : Fustucoideae

Tribu : Festuceae

Genre : *Festuca* L.

Sous-genre : *Festuca*

Section : *Festuca*

Groupe *Festuca rubra*

*F. heterophylla* Lamarck

*F. rubra* L.

ssp. *commutata* (Thuill.) Nyman

ssp. *litoralis* (G.F.W Meyer) Auquier

ssp. *rubra* Gaudin

Groupe *Festuca ovina*

*F. filiformis* Pourret

*F. idahoensis* Elmer

*F. ovina* L. spp. *Hirtula* (Hackel ex Travis) M. Wilkinson

*F. trachyphylla* (Hackel) Krajina

*F. valesiaca* Schleicher ex Gaudin

Figure 7 : Classification taxonomique des fétuques fines. Source : Stace et al., 1992.

implique notamment l'utilisation de fertilisants pour obtenir des gazons bien verts (Martini *et al.*, 2015).

Face aux restrictions d'eau croissantes, les ménages ont plus tendance à acheter des gazons aux faibles besoins en arrosage. Cependant, ces propriétés ne doivent pas nuire à l'esthétisme de la pelouse qui reflète l'image du particulier auprès de ses voisins.

### **C. LES ATTENTES DES PRODUCTEURS DE SEMENCES : RENDEMENT ET RESISTANCE AUX MALADIES**

Les caractéristiques agronomiques des variétés que les agriculteurs décident de produire sont les éléments clés de leur choix. Le rendement est le premier critère puisqu'il influence directement la rentabilité de l'exploitation agricole. Du fait de l'augmentation des restrictions d'utilisation de pesticides, fongicides et insecticides, les variétés résistantes ou tolérantes aux maladies du gazon telles que la brûlure en plaques ou la plaque brune rhizoctone sont très importantes (Bonos, 2006).

## **BILAN**

La prise de conscience des impacts environnementaux négatifs des produits chimiques utilisés pour l'entretien des gazons ainsi que les nouvelles attentes des consommateurs et des producteurs mènent à l'apparition d'un nouveau marché : les gazons à faible entretien. Les graminées les plus communes sont (aux Etats-Unis) le pâturin des prés et le ray-grass anglais. Ces deux espèces procurent des pelouses très esthétiques mais aux besoins en fertilisants et arrosage très importants. Afin de satisfaire ce nouveau marché, le programme d'amélioration des espèces de gazon de Rutgers University décide de d'étendre son programme à d'autres espèces telles que les fétuques fines.

## **III. LES FETUQUES FINES COMME ESPECES MAJEURES DES GAZONS A FAIBLE ENTRETIEN**

### **A. FAIBLE REPRESENTATION DES FETUQUES FINES AU SEIN DU MARCHÉ DU GAZON**

En France, les fétuques fines sont le second groupe d'espèces utilisées pour le gazon (**Figure 3**) avec 35.6% de fétuques rouges et 1.6% de fétuque ovine. Aux Etats-Unis, elles sont moins communément utilisées, quel que soit le type de marché en question (**Figures 4 à 6**).

### **B. ADAPTATION DES FETUQUES FINES AUX MILIEUX PAUVRES, SECS ET SALINS**

Le genre *Festuca* comprend près de 450 espèces que l'on trouve dans les régions tempérées du globe, allant jusqu'aux tropiques et au sommet des montagnes (Clayton *et Renvoize*, 1986). La domestication du groupe d'espèces de fétuques fines (*Festuca* spp.) a été initiée au XVIème siècle pour les terrains de golf (Beard, 1973).

#### **1. Classification taxonomique**

La classification des fétuques fines a souvent été remise en cause. En 1992, Stace *et al.* répartissent les espèces de fétuques fines selon deux groupes : *Festuca rubra* et *Festuca ovina*. La classification actuelle des fétuques fines est présentée en **Figure 7**.

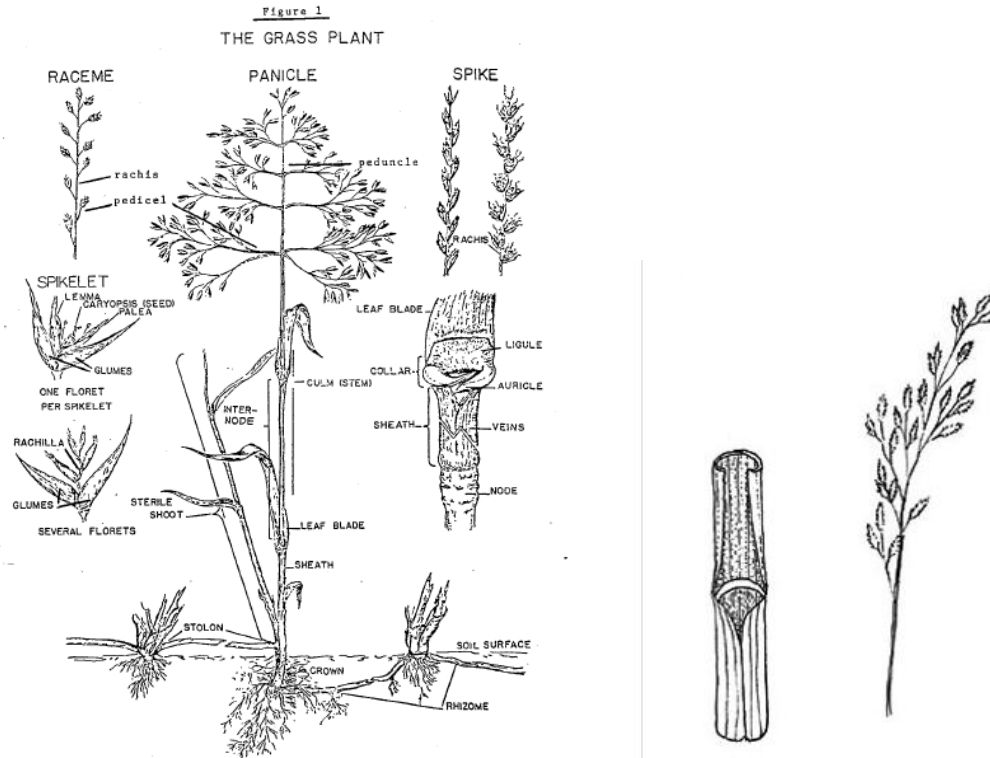


Figure 8a : Illustration de la morphologie des graminées. Source : Nowosad et al., 1936.

Figure 8b : Illustration de la préfoliation et du floret de fétuques fines. Source : Nowosad et al., 1936.

<p><b>Establishment Rate</b></p> <p>Fast</p> <p>↑</p> <p>↓</p> <p>Slow</p>	<p>Perennial ryegrass</p> <p>Tall fescue</p> <p><b>Pine fescue</b></p> <p>Creeping bentgrass</p> <p>Colonial bentgrass</p> <p>Kentucky bluegrass</p>	<p><b>Disease Potential</b></p> <p>High</p> <p>↑</p> <p>↓</p> <p>Low</p>	<p>Creeping bentgrass</p> <p>Colonial bentgrass</p> <p><b>Fine fescue</b></p> <p>Kentucky bluegrass</p> <p>Perennial ryegrass</p> <p>Tall fescue</p>	<p><b>Fertility Requirement</b></p> <p>High</p> <p>↑</p> <p>↓</p> <p>Low</p>	<p>Creeping bentgrass</p> <p>Colonial bentgrass</p> <p>Kentucky bluegrass</p> <p>Perennial ryegrass</p> <p>Tall fescue</p> <p><b>Fine fescue</b></p>
<p><b>Leaf Texture</b></p> <p>Coarse</p> <p>↑</p> <p>↓</p> <p>Fine</p>	<p>Tall fescue</p> <p>Perennial ryegrass</p> <p>Kentucky bluegrass</p> <p>Colonial bentgrass</p> <p>Creeping bentgrass</p> <p><b>Pine fescue</b></p>	<p><b>Wear Resistance</b></p> <p>Good</p> <p>↑</p> <p>↓</p> <p>Poor</p>	<p>Tall fescue</p> <p>Perennial ryegrass</p> <p>Kentucky bluegrass</p> <p><b>Fine fescue</b></p> <p>Creeping bentgrass</p> <p>Colonial bentgrass</p>	<p><b>Heat Tolerance</b></p> <p>Best</p> <p>↑</p> <p>↓</p> <p>Worst</p>	<p>Tall fescue</p> <p>Creeping bentgrass</p> <p>Kentucky bluegrass</p> <p>Colonial bentgrass</p> <p><b>Fine fescue</b></p> <p>Perennial ryegrass</p>
<p><b>Shoot Density</b></p> <p>High</p> <p>↑</p> <p>↓</p> <p>Low</p>	<p>Creeping bentgrass</p> <p>Colonial bentgrass</p> <p><b>Fine fescue</b></p> <p>Kentucky bluegrass</p> <p>Perennial ryegrass</p> <p>Tall fescue</p>	<p><b>Shade Tolerance</b></p> <p>Good</p> <p>↑</p> <p>↓</p> <p>Poor</p>	<p><b>Fine fescue</b></p> <p>Colonial bentgrass</p> <p>Tall fescue</p> <p>Creeping bentgrass</p> <p>Kentucky bluegrass</p> <p>Perennial ryegrass</p>	<p><b>Drought Tolerance</b></p> <p>Good</p> <p>↑</p> <p>↓</p> <p>Poor</p>	<p><b>Fine fescue</b></p> <p>Tall fescue</p> <p>Kentucky bluegrass</p> <p>Perennial ryegrass</p> <p>Colonial bentgrass</p> <p>Creeping bentgrass</p>

Figure 9 : Comparaison des fétuques fines aux autres espèces pour gazon pour différents traits agronomiques. Source : Florida Gateway University, adapté de Turgeon, 1980.

## **2. Description botanique**

Les fétuques font partie de la famille des graminées et sont donc des monocotylédones. Les fétuques fines se distinguent des autres graminées par l'absence d'oreillette\*, un limbe foliaire très fin, légèrement replié vers l'intérieur, une ligule\* courte et membraneuse et une préfoliation pliée, comme présenté en [Figures 8a](#) et [8b](#). (Nowosad *et al.*, 1936).

## **3. Les cinq espèces et sous-espèces de fétuques fines d'importance agronomique**

5 types de fétuques fines sont utilisés dans la filière gazon : (USDA GRIN, 2015)

- Fétuque rouge traçante - Strong creeping red fescue - *Festuca rubra subsp. rubra*
- Fétuque rouge gazonnante - Chewing's fescue - *Festuca rubra subsp. commutata*
- Fétuque rouge semi traçante - Slender creeping red fescue - *Festuca rubra subsp. litoralis* (G.F.W Meyer) Auquier
- Fétuque durette - Hard fescue - *Festuca trachyphylla*
- Fétuque ovine - Sheep's fescue - *Festuca ovina*

Ces 5 types sont originaires d'Europe et d'Asie (Ruemmele *et al.*, 2003).

### **Identification et caractéristiques botaniques**

Ces 5 espèces et sous-espèces sont très difficiles à différencier visuellement les unes des autres. Une clé d'identification basée sur les traits morphologiques a été établie par Aiken *et al.* (1990), Markgraf-Dannenberg (1980) et Wilkinson *et Stace* (1991). Les critères sont basés sur l'observation des jeunes pousses, de leur taille, de la présence ou absence de rhizomes, des ligules et sur l'observation des ovaires et caryopses. Sur le terrain, ces observations sont très laborieuses et peuvent être fortement influencées par l'environnement et donc biaiser l'identification.

### **Caractéristiques agronomiques**

Leurs principaux atouts sont leur feuillage très fin (moins d'1mm de largeur) et très esthétique (Beard, 1973), leur adaptation au climat tempéré, à la sécheresse, à l'ombre et aux sols pauvres et acides (pH entre 5.5 et 6.5) (Beard, 1973 ; Ruemmele *et al.*, 2003). Plusieurs auteurs ont montré que les fétuques fines sont de très bonnes espèces pour des gazons à faible entretien (Beard, 1973 ; Meyer et Funk, 1989). Certaines fétuques fines possèdent des endophytes\* leur conférant des propriétés de résistance aux maladies (Bonos *et al.*, 2005 ; Clarke *et al.*, 2006).

Leurs principales faiblesses sont qu'elles sont peu tolérantes à la chaleur, aux sols peu drainés et à une fertilisation forte en azote. Leur résistance au piétinement et à l'arrachement est faible et certaines sont sensibles à de nombreuses maladies (fil rouge, brûlure en plaques, plaque rhizoctone).

L'ensemble de leurs caractéristiques agronomiques comparées aux espèces pour gazon de climats tempéré et froid est résumé en [Figure 9](#).

### **Conservation**

Le ministère de l'agriculture des Etats-Unis possède un service de conservation nommé GRIN, Germplasm Resources Information Network. Il est chargé de conserver les



Tableau 3a : Comparaison des fétuques fines sur le type de plante, la hauteur, la présence d'endophytes et la tendance à développer du chaume. Source : résumé des données NTEP 1984 – 1998.

ESPECE	TYPE DE PLANTE	HAUTEUR PLANTE (CM)	PRESENCE D'ENDOPHYTES	TENDANCE A DEVELOPPER DU CHAUME*
<i>Festuca rubra subsp. commutata</i>	Touffe	91	oui	Forte
<i>Festuca rubra subsp. rubra</i>	<b>Rhizome</b>	<b>&lt;76</b>	<b>oui</b>	<b>Modérée</b>
<i>Festuca rubra subsp. litoralis</i>	Rhizome	<76	non	Forte
<i>Festuca ovina</i>	Touffe	<45	non	Modérée
<i>Festuca trachyphylla</i>	Touffe	<91	oui	Modérée

Tableau 3b : Comparaison des fétuques fines sur la qualité, la vigueur au semis, la résistance au fil rouge et la tolérance à la salinité. 1-9 = note de performance relative aux USA. 1 : mauvaise performance, 9 : excellente performance. <sup>1</sup>Rendement en graines/livre. Source : résumé des données NTEP 1984 – 1998.

ESPECE	RENDEMENT <sup>1</sup>	QUALITE	VIGUEUR AU SEMIS	RESISTANCE AU FIL ROUGE	TOLERANCE A SALINITE (MMHOS)
<i>Festuca rubra subsp. commutata</i>	365 000	5.9	5.9	6.7	6
<i>Festuca rubra subsp. rubra</i>	<b>400 000</b>	<b>5.5</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>14</b>
<i>Festuca rubra subsp. litoralis</i>	450 000	4	5.6	6.9	22
<i>Festuca ovina</i>	680 000	3.7	3	8.3	<3
<i>Festuca trachyphylla</i>	500 000	6.1	5.1	8.1	<3



ressources génétiques nécessaires à l'amélioration des plantes. Actuellement, l'état de conservation des fétuques fines aux Etats-Unis est le suivant :

- Fétuque rouge traçante - *Festuca rubra subsp. rubra* : 41 accessions
- Fétuque rouge gazonnante - *Festuca rubra subsp. commutata* : 49 accessions
- Fétuque rouge semi traçante - *Festuca rubra subsp. litoralis* (G.F.W Meyer)  
Auquier : 2 accessions
- Fétuque durette - *Festuca trachyphylla* : 18 accessions
- Fétuque ovine - *Festuca ovina* : 173 accessions

En France, les ressources génétiques sont placées sous la responsabilité du Bureau des Ressources Génétiques. Les espèces du genre *Festuca* sont majoritairement collectionnées au sein de l'INRA de Lusignan.

### C. LA FETUQUE ROUGE TRAÇANTE ET SES PARTICULARITES

La fétuque rouge traçante possède les caractéristiques générales des fétuques fines : adaptation aux sols pauvres et à forte salinité et résistance à la sécheresse. Elle possède également des particularités qui justifient une étude plus approfondie de l'espèce.

#### 1. La fétuque rouge traçante : une des sous-espèces les plus performantes des fétuques fines

Les [Tableaux 3a](#) et [3b](#) permettent d'avoir une vue d'ensemble sur ces éléments et montrent que la fétuque rouge traçante possède le maximum de propriétés intéressantes :

- La présence de rhizomes permet une meilleure implantation et de meilleures chances de reprise lors de grandes chaleurs ou de grands froids.
- Leur hauteur moyenne permet des tontes moins fréquentes.
- Certaines possèdent des endophytes qui leur confèrent une meilleure résistance aux maladies et aux insectes.
- Elles ont une tendance modérée à développer du chaume, le gazon a donc une meilleure durabilité.
- La vigueur au semis est importante et permet une meilleure implantation.
- Grâce à une forte tolérance à la salinité, elles sont adaptées aux bords de chaussées et aux milieux détériorés.
- Elles possèdent un rendement et une qualité globale corrects.

#### 2. L'adaptation aux sols à forte salinité

Un sol à forte salinité c'est-à-dire contenant beaucoup de sels minéraux (sodium, potassium, magnésium, calcium, chlore, sulfate, carbonate et bicarbonate) peut être causé par une roche mère déjà riche en minéraux, par l'eau de mer pour les zones littorales proches du niveau de la mer, par les sels de déneigement en hiver ou encore par l'eau d'irrigation qui contient des sels. Une salinité inférieure à 3g/L est considérée nulle. Une salinité supérieure à 12 g/L est considérée comme très forte (European Commission, 2015). Pour la majorité des plantes, le stress causé par une forte salinité entraîne un ralentissement de la croissance, voire un arrêt et un dessèchement de la plante dus à la modification du potentiel osmotique\* des feuilles (Koyro, 2006). Selon l'USDA, la perte de rendement à cause d'une forte salinité apparaît sur 30% des surfaces irriguées aux Etats-Unis. En Europe, environ 1 à 3 millions d'hectares ont une forte salinité.

Trouver des espèces et variétés capables de survivre dans ces conditions est donc primordial non seulement pour les surfaces de production de nourriture mais également

Tableau 4 : Forces Faiblesses Opportunités et Menaces pour la fétuque rouge traçante.  
Source : Mélodie Vivès.

<b>FORCES</b>	<b>FAIBLESSES</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- résistante à la sécheresse.</li> <li>- très belle apparence.</li> <li>- résistante aux forts taux de salinité.</li> <li>- certains cultivars ont des endophytes qui permettent la résistance à certaines maladies, sans besoin de produits chimiques.</li> <li>- très adaptée aux sols pauvres.</li> <li>- impacts positifs sur l'environnement (évacuation des eaux, diminution érosion, puis de carbone,...).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- sensible à la chaleur.</li> <li>- sensible aux sols peu drainés.</li> <li>- sensible au piétinement et à l'arrachement.</li> <li>- généralement sensible aux maladies.</li> <li>- comme encore peu améliorée, son rendement est assez faible.</li> </ul>
<b>OPPORTUNITES</b>	<b>MENACES</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- les consommateurs désirent des gazons qui nécessitent peu d'arrosage et peu de tontes, mais qui restent esthétiques.</li> <li>- les producteurs désirent des variétés résistantes aux maladies et qui répondent aux nouvelles régulations d'eau et d'emploi des produits chimiques.</li> <li>- l'urbanisation entraîne un besoin fort en espaces verts en ville.</li> <li>- les normes sont de plus en plus strictes sur l'impact environnemental des pratiques culturales.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- les consommateurs ne savent pas quelles espèces sont présentes dans les mélanges.</li> <li>- peu de cultivars sont facilement accessibles par les consommateurs.</li> <li>- les fétuques fines sont peu produites et sont une espèce mineure des mélanges pour gazon.</li> <li>- les producteurs désirent des cultivars à fort rendement.</li> </ul>

pour les surfaces perturbées par les activités humaines et non cultivées. Les capacités d'adaptation aux sols pauvres et très salins de la féтуque rouge traçante, notamment en bord de chaussée, ont été prouvées à plusieurs reprises (Brown *et Gorres*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2013), la rendant très intéressante à étudier. Le [Tableau 3b](#) montre que la féтуque rouge traçante est la deuxième sous-espèce la plus résistante à la salinité (après la féтуque semi-traçante).

### **3. Endophytes et résistance aux pathogènes**

Les endophytes sont des organismes (bactéries ou champignons) qui accomplissent tout ou partie de leur cycle à l'intérieur d'une plante, de manière symbiotique ou neutre. En 1999, Yue *et al.* montrent que l'inoculation artificielle d'endophytes sur des féтуques peut accroître la toxicité des plantes pour certains insectes ravageurs. En 2005, Bonos *et al.* étudient les effets des endophytes sur la maladie du fil rouge. Ils observent que certaines souches d'endophytes réduisent de façon significative la sévérité de la maladie. En 2006, Clarke *et al.* mesurent la sévérité de la brûlure en plaque ainsi que la densité et la qualité du gazon de féтуques inoculées et de féтуques non inoculées par des endophytes. Les résultats mettent en évidence que les féтуques rouges traçantes inoculées présentent une suppression de la maladie et une meilleure densité de gazon. Chacune des études précédemment citées spécifie que l'interaction hôte-endophyte est très forte, ce qui signifie qu'un endophyte particulier peut avoir de forts effets en présence d'un génotype, et aucun effet en présence d'un autre génotype. Enfin, Johnson-Cicalese *et al.* (2000) montrent que les plantes inoculées transmettent l'endophyte à leur descendance. Cependant, l'endophyte peut être perdu lors de mauvaises conditions de stockage des graines.

La suppression des maladies du fil rouge et de la brûlure en plaque montre le potentiel des endophytes. Ils peuvent constituer une stratégie de contrôle des maladies fongiques comme alternative à l'utilisation de fongicides. Comme les endophytes sont transmis à chaque génération, les obtenteurs sont très intéressés par les variétés qui possèdent ces endophytes. Néanmoins, d'autres projets de recherche sont nécessaires pour comprendre leurs mécanismes et les préserver lors du stockage des semences.

Afin de résumer le contexte et les caractéristiques de la féтуque rouge traçante précédemment exposés et de justifier l'étude de ces espèces, un tableau des forces, faiblesses, opportunités et menaces a été réalisé ([Tableau 4](#)).

#### **BILAN**

Les féтуques fines ont de bonnes performances dans les milieux pauvres, salins et secs. Certaines féтуques rouges traçantes possèdent des endophytes qui aident à supprimer les maladies du fil rouge et de la brûlure en plaque. Ces caractéristiques les rendent parfaitement adaptées aux gazons à faible entretien, bien que certains traits doivent faire l'objet d'un programme d'amélioration (rendement, résistance à d'autres maladies, etc.). Les récents progrès en sélection des plantes ont été permis entre autres par l'utilisation des biotechnologies comme les marqueurs moléculaires. Déjà appliquées au pâturin des prés et au ray-grass anglais, ces techniques ont prouvé leur efficacité et font donc l'objet de cette étude pour la féтуque rouge traçante.



## IV. LES TECHNIQUES MOLECULAIRES APPLIQUEES A L'AMELIORATION DES ESPECES POUR LE GAZON

Le programme d'amélioration des espèces pour gazon de Rutgers University a été mis en place dans les années 1960, par le Dr. C Reed Funk. Depuis, plus de 400 cultivars de gazon ont été brevetés et plus de 15 000 individus ont été ajoutés au germplasm\* grâce à des collections en Europe et en Asie (Honig, 2011). Contrairement à d'autres espèces d'importance alimentaire comme le maïs ou le blé, peu de travaux de génétique ont été réalisés sur le gazon avant les années 1990. Selon Zhang *et al.* (2006), deux des principales raisons expliquant cette absence sont 1. beaucoup de graminées à gazon sont génétiquement complexes car polyploïdes, 2. la plupart des caractéristiques d'intérêt agronomique sont contrôlées par plusieurs gènes\* (caractère quantitatif).

Par volonté d'améliorer et d'accélérer les programmes, le centre de recherche appliquée au gazon de Rutgers développe les premiers travaux de génétique moléculaire sur ces espèces. En 2001, Kubik *et al.* utilisent des marqueurs SSR (Simple Sequence Repeat) pour différencier des cultivars de ray-grass anglais. En 2010, Honig *et al.* publient 88 marqueurs SSR pour le pâturin des prés et d'autres travaux montrant l'utilité des marqueurs moléculaires en amélioration des plantes. Dans la continuité de ces travaux, le centre de recherche de Rutgers lance un nouveau projet de marqueurs moléculaires pour la fétuque fine.

### A. MARQUEURS MOLECULAIRES ET UTILISATION EN AMELIORATION DES PLANTES

Les marqueurs génétiques\* représentent les différences entre des organismes uniques, populations, espèces, *etc.* Les marqueurs génétiques ne représentent pas obligatoirement un gène correspondant à un caractère d'intérêt. Les marqueurs occupent une position dans le génome, sur un chromosome, et peuvent donc apparaître sous le nom de '*loci*' (Collard *et al.* 2005).

Il existe selon Collard *et al.*, trois types de marqueurs génétiques :

1. Morphologiques ou visuels : traits phénotypiques tels que la couleur de fleur, la taille de la graine, la résistance à une maladie, *etc.*
2. Biochimiques : protéines ou enzymes.
3. ADN ou moléculaires : différences dans la séquence d'ADN.

*L'ensemble des informations sur les marqueurs moléculaires est une synthèse des données issues de Gupta et al., 1999, Zhang et al., 2006, Samouelian et Gaudi, 2009, GNIS, 2015 et Honig, 2011.*

#### 1. Les principaux marqueurs moléculaires

La description suivante des marqueurs n'est pas exhaustive pour deux raisons. La première est que les techniques de biotechnologies évoluent constamment et de nouveaux marqueurs sont créés chaque année. La seconde est que le but de cette description est de comparer les marqueurs les plus utilisés et de comprendre quels choix sont les plus judicieux en fonction des objectifs.

Gupta *et al.* (1999) proposent une classification de l'ensemble des marqueurs moléculaires utilisables, en trois catégories.



## 1. Les marqueurs basés sur l'hybridation de brins d'ADN

### **RFLP : Polymorphisme\* de Longueur de Fragments de Restriction**

Cette technique utilise des enzymes de restriction (endonucléases) pour cliver l'ADN en fragments de tailles variables. Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse\*, transférés sur une membrane (Southern Blot) et hybridés avec l'ADN sonde (marqué radioactivement).

- |   |   |
|---|---|
| <p>Avantages :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Codominant* : permet de différencier homozygotes* et hétérozygotes*</li><li>• Forte reproductibilité</li></ul> | <p>Inconvénients :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Besoins d'ADN de qualité et en quantités importantes</li><li>• Temps de manipulation importants</li><li>• Technicité forte (très longue procédure)</li></ul> |
|---|---|

## 2. Les marqueurs basés sur la PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR\* est une réaction impliquant l'enzyme appelée polymérase qui permet la réplique de l'ADN. La PCR permet d'amplifier une région précise de l'ADN contenue entre deux séquences-amorces. A partir de quelques molécules d'ADN, la PCR permet d'obtenir une multitude de copies de la région ciblée de l'ADN.

### **RAPD : ADN Polymorphe Amplifié au Hasard**

La technique consiste à utiliser des amorces de 10pb (paire de bases) de séquence arbitraire. L'amplification PCR, réalisée en températures basses, génère de nombreux fragments et des altérations de séquences des amorces peuvent apparaître.

- |  |   |
|--|---|
| <p>Avantages :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Connaissance de la séquence ciblée pour générer des fragments d'ADN non nécessaire</li><li>• Applicabilité à n'importe quel organisme</li><li>• Faibles quantités d'ADN nécessaires</li><li>• Pas d'éléments radio-actifs</li><li>• Simple interprétation des résultats</li></ul> | <p>Inconvénients :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Faible reproductibilité et chances d'erreurs dans la phase d'amplification PCR</li></ul> |
|--|---|

### **AFLP : Polymorphisme de Longueur des Fragments d'Amplification**

Cette technique consiste à "découper" l'ADN grâce à des enzymes de restriction puis à ajouter des « adaptateurs\* » (marquage radioactif ou fluorescent) de part et d'autre du fragment d'ADN ainsi que quelques paires de bases entre l'adaptateur et le fragment d'ADN. Les amorces pour la PCR sont créées afin d'être complémentaires du site de reconnaissance de l'enzyme de restriction\*, de l'adaptateur et des paires de bases ajoutées.

## Les marqueurs microsatellites

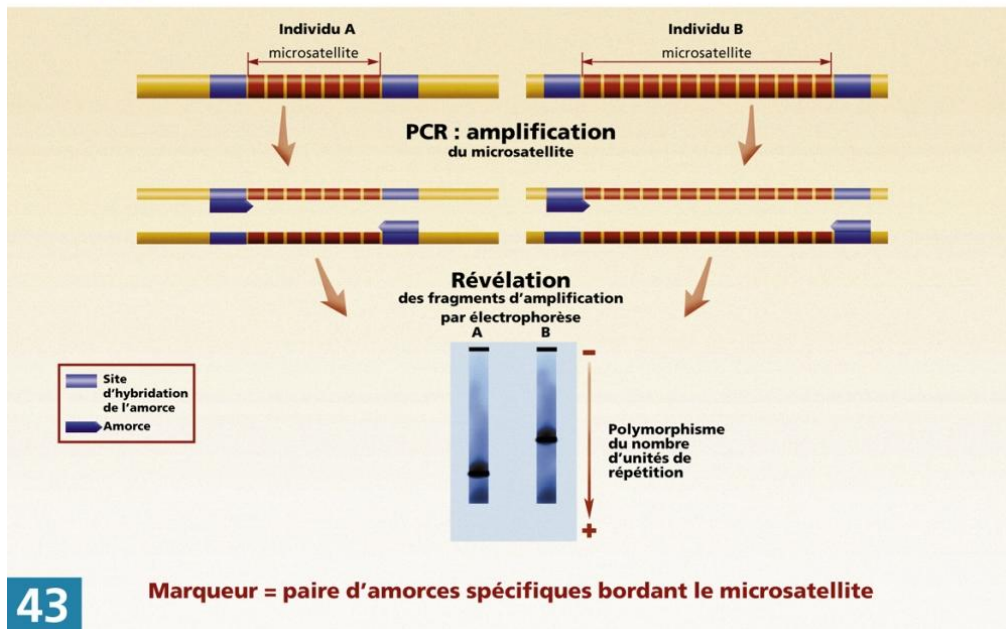


Figure 10 : Fonctionnement des marqueurs SSR. Source : GNIS, 2015.



Avantages :

- Connaissance de la séquence ciblée pour générer des fragments d'ADN, non nécessaire
- Applicabilité à n'importe quel organisme
- Assez fort niveau de polymorphisme détecté par réaction
- Reproductibilité importante

Inconvénients :

- Technicité supérieure par rapport aux RAPD
- Marqueur dominant\* (ne permet pas de distinguer homo et hétérozygotes)
- Nécessité de marquages radioactifs ou fluorescents

### **SSR : Marqueurs microsatellites ou Simple Sequence Repeats**

Les marqueurs SSR sont une séquence de paires de bases répétées au sein de l'ADN ; la longueur du motif de répétition est de 1 à 6 paires de bases. On s'y réfère par la notation  $(GA)_n$  où les nucléotides entre parenthèse représentent le motif répété et n, le nombre de fois qu'il est répété.

Les *loci*\* des marqueurs SSR ont une forte fréquence de mutation ( $10^{-6} - 10^{-2}$  mutations par *locus* par génération). Ceci conduit à un fort taux de polymorphisme, majoritairement dû à un changement du nombre de répétitions du motif. Chaque microsatellite est bordé par des séquences uniques qui lui sont propres ; ces séquences constituent les amorces pour la réaction de PCR. Les fragments d'amplification sont ensuite révélés par électrophorèse sur gel ou par capillarité (**Figure 10**).

Avantages :

- Marqueurs codominants (sauf pour polyploïdes)
- Répartition dans tout le génome
- Forte reproductibilité
- Une fois les amorces créées et testées, très faciles à utiliser

Inconvénients :

- Création des amorces : connaître la séquence, synthétiser les amorces et les tester pour évaluer le polymorphisme associé au *locus*.

### **3. Les marqueurs basés sur la comparaison de séquences de parties d'ADN**

#### **SNP : Polymorphisme Mononucléotidique**

Les polymorphismes mononucléotidiques sont définis comme le changement d'une paire de base dans la séquence d'ADN. Il existe deux types de changements : les transitions et les transversions. Les mutations de transition sont de purine à purine (Adénine et Guanine) ou de pyrimidine à pyrimidine (Cytosine et Thymine). Les mutations de transversion sont de purine à pyrimidine ou de pyrimidine à purine, impliquant les quatre types de bases azotées. Il existe de nombreuses techniques associées à la détection de SNP que nous ne développerons pas ici puisque les SNP ne sont pas utilisés dans cette étude.



## **BILAN**

Une fois développés et caractérisés, les marqueurs SSR sont très faciles à utiliser et reproductibles. Ils permettent d'obtenir des résultats très rapides directement applicables par les sélectionneurs, pour des coûts raisonnables. Pour ces raisons, ils font l'objet de cette étude.

### **2. Applications en amélioration des plantes**

Les différentes applications des marqueurs moléculaires pour l'amélioration des plantes peuvent être classées en 3 catégories (Ribaut *et al.*, 2002).

#### **1. Caractérisation du matériel génétique (germplasme) et empreintes génétiques\***

Il existe de nombreux intérêts de la caractérisation du matériel génétique d'un programme d'amélioration (Lee, 1995) :

- Gérer les collections (acquisitions, entretien, caractérisation).
- Déterminer le degré de représentativité du pool de gènes de la collection par rapport au milieu naturel.
- Eviter des coûts d'entretien excessifs dus à des doublons ou accessions similaires.
- Etablir un motif de distribution écotopographique pour guider le développement de futurs prélèvements dans les milieux d'origine.
- Connaître les relations génétiques au sein du matériel existant.
- Caractériser des liens de parenté et la diversité génétique afin de créer un gain génétique lors de futurs croisements.
- Protéger des variétés : brevets, COV en Europe (Certification d'Obtention Végétale), PVP aux Etats-Unis (Plant Variety Patent).

#### **2. Identification et caractérisation des régions du génome impliquées dans l'expression du caractère d'intérêt**

### **Cartes génétiques**

Les cartes génétiques permettent de représenter la disposition des gènes ou des marqueurs sur les chromosomes. Elles sont obtenues en étudiant une population en ségrégation pour le caractère d'intérêt. Cette population est généralement issue du croisement de lignées parentales élites sélectionnées par l'obtenteur pour leurs caractères d'intérêt. Les propriétés de ségrégation des gènes sont utilisées pour analyser la génération obtenue par croisement des parents. Des tests statistiques simples permettent de décider si deux marqueurs sont indépendants ou non (c'est-à-dire s'ils sont ségrégués indépendamment ou non lors de la méiose), ils forment alors un groupe de liaison. Il est ensuite possible d'attribuer chaque groupe de liaison à un chromosome. Lorsque le nombre de marqueurs utilisés est suffisamment élevé, le nombre de groupes de liaison correspond au nombre de chromosomes.

Tableau 5: Niveaux de ploïdie des fétuques fines. Source : David R. Huff and Antonio J. Palazzo, 1998

<b>ESPECE</b>	<b>CHROMOSOMES</b>	<b>NIVEAU DE PLOÏDIE</b>
<b><i>Festuca rubra subsp. commutata</i></b>	2n=6X=42	Hexaploid
<b><i>Festuca rubra subsp. rubra</i></b>	2n=8X=56	Octoploid
<b><i>Festuca rubra subsp. litoralis</i></b>	2n=6X=42	Hexaploid
<b><i>Festuca ovina</i></b>	2n=4X=28	Tetraploid
<b><i>Festuca trachyphylla</i></b>	2n=6X=42	Hexaploid

## **Analyse QTL**

Il existe deux types de caractères d'intérêt : qualitatif ou quantitatif. Les caractères d'intérêt qualitatifs sont dirigés par un seul gène. Ces caractères sont « faciles » à manipuler pour les sélectionneurs puisqu'un seul gène les gouverne. Les caractères quantitatifs (rendement, taille, qualité des fruits, etc.) sont le résultat de l'action de plusieurs gènes qui interagissent entre eux. Il est quasiment impossible de localiser l'ensemble des gènes impliqués pour un caractère quantitatif. Il est néanmoins possible de définir une région du génome impliquée dans l'apparition du caractère : ce sont les QTL Quantitative Trait *Loci*. En comparant les résultats de phénotypage pour un caractère d'intérêt et les résultats d'empreintes par marqueurs (préalablement positionnés sur une carte génétique), il est possible de déterminer statistiquement si ces marqueurs sont corrélés au phénotype d'intérêt. Grâce aux QTL, il est possible d'associer une valeur agronomique aux zones des cartes génétiques.

### **3. Sélection assistée par marqueurs**

#### **Construction de génotypes**

Grâce à la connaissance des QTL associés aux caractères d'intérêt, les génotypes peuvent être étudiés précocement et les caractères d'intérêt détectés avant leur apparition sur le phénotype.

Par exemple, certains arbres mettent plus de dix ans à fleurir pour la première fois. Grâce aux QTL, le tissu peut être collecté après germination et les génotypes peuvent être caractérisés pour le trait en question. Ainsi les cycles de sélection sont raccourcis et les coûts de maintien des collections diminués.

#### **Introgression de gènes**

Un scénario de sélection classique est le suivant : un génotype A possède de nombreux traits intéressants sauf pour un caractère (par exemple la résistance à une maladie) ; un génotype B n'a pas beaucoup de caractères intéressants mais est résistant à cette maladie. Les sélectionneurs réalisent alors un croisement de A par B puis font un rétrocroisement de la descendance avec le meilleur parent (parent A). Même si l'on réalise un grand nombre de rétrocroisements, la lignée receveuse portera toujours une partie indésirable du parent B. Les marqueurs moléculaires permettent de réduire le temps de caractérisation des individus puisqu'ils ne nécessitent pas d'attendre l'expression phénotypique du caractère d'intérêt. A chaque génération, les plantes qui possèdent ce trait sont sélectionnées sur la base des marqueurs moléculaires.

## **D. LES CONNAISSANCES MOLECULAIRES ACQUISES SUR LES FETUQUES FINES**

### **1. Niveau de ploïdie**

Le niveau de ploïdie\* est très important à la fois pour différencier des espèces très proches visuellement et comme base de travail pour des recherches en génétique. En 1998, Huff et Palazzo appliquent la méthode de cytométrie en flux\* aux fétuques fines. Cette méthode consiste à mettre les cellules végétales une par une en présence d'un rayon laser pour mesurer l'intensité de fluorescence qui correspond à la quantité d'ADN présente. Les résultats obtenus montrent un très fort taux de ploïdie chez les fétuques fines ([Tableau 5](#)).



## **2. Marqueurs**

A l'heure actuelle, peu de marqueurs génétiques sont développés pour les fétuques fines. Selon le NCBI National Center for Biotechnology Information, 1863 marqueurs EST sont disponibles (Expressed Sequence Tags). Ce sont des séquences d'ADN générées par le séquençage de clones d'ADNc correspondant à un ARNm. Ce ne sont pas des marqueurs moléculaires puisqu'ils représentent seulement une séquence, qui peut par la suite être utilisée pour la recherche de marqueurs (Gupta *et al.*, 1999). De plus, en septembre 2014, Craütlein *et al.* développent 14 marqueurs microsatellites chloroplastiques\* pour l'espèce *Festuca rubra*.

## **3. Séquences**

Selon le NCBI, aucun projet de séquençage du génome de *Festuca rubra*, *Festuca ovina* ou *Festuca trachyphylla* n'a été publié.

### **BILAN**

Le contexte de demande de gazons à faible entretien amène à se pencher sur l'étude d'espèces actuellement peu utilisées pour la réalisation de gazons. Les propriétés des fétuques fines coïncident avec ces attentes bien que certains critères doivent être améliorés. Aujourd'hui, grâce aux biotechnologies, les programmes d'amélioration peuvent être optimisés et accompagnés par des études génétiques. Cette étude a pour but de donner des premiers éléments de connaissances moléculaires sur cette espèce pour l'instant peu étudiée. Elle permettra la création de marqueurs SSR qui pourront être utilisés pour de futures études ainsi qu'une étude de diversité génétique sur 37 cultivars de fétuques fines.





## MATERIEL ET METHODES

---

### I. SEQUENÇAGE NOUVELLE GENERATION ET ASSEMBLAGE DU GENOME

#### A. MATERIEL VEGETAL UTILISE

L'individu utilisé pour le séquençage est un génotype expérimental issu de la collection de Rutgers University Center for Turgrass Science (A10534), de la sous-espèce *Festuca rubra* subsp. *rubra*. Le choix d'utiliser une seule sous-espèce à séquencer pour la création des marqueurs (par opposition au séquençage de plusieurs espèces de fétuques fines, puis obtention d'une séquence consensus) a été fait en accord avec les objectifs suivants : obtenir un polymorphisme suffisamment important au sein de la sous-espèce *Festuca rubra* subsp. *rubra* pour distinguer des génotypes issus d'une même variété-population.

#### B. EXTRACTION D'ADN

Environ 20 feuilles de 4 cm ont été prélevées sur l'individu A10534, puis gelées instantanément dans l'azote liquide afin de permettre une meilleure conservation de l'ADN. Le tissu a été broyé dans un mortier avec un pilon, préalablement refroidis à l'azote liquide. Le broyat a ensuite été réparti dans quatre tubes différents.

Afin d'obtenir des quantités et qualités suffisantes pour le séquençage, une extraction d'ADN utilisant le détergent cationique CTAB (bromure d'hexadécyltriméthylammonium) a été réalisée (Doyle *et* Doyle, 1987). La quantité et la qualité de l'ADN ont ensuite été mesurées (2  $\mu$ L) par dosage au spectrophotomètre NanoDrop (*Thermo Scientific NanoDrop<sup>TM</sup>2000*) pour chacun des quatre tubes. Les trois tubes ayant les meilleures qualités et plus fortes concentrations ont été retenus pour le séquençage.

#### C. SEQUENÇAGE NOUVELLE GENERATION ET ASSEMBLAGE DU GENOME

Le protocole Illumina TruSeq Nano DNA Library Prep Guide a été suivi conformément aux instructions du fabricant pour préparer la librairie d'ADN avec une zone d'insertion de 550 pb. L'assemblage du génome a été réalisé par le service bioinformatique de Rutgers University. Brièvement, la librairie a été séquencée sur une MiSeq Illumina en utilisant le réactif V3 Illumina avec la configuration suivante : 2x300 bp paired-end. Un rendement de 50 162 364 séquences a été obtenu, qui ont ensuite été filtrées en fonction de leur qualité et de leur adaptateur donnant 32 163 607 séquences utilisées pour l'assemblage. L'assemblage a donné 627 077 séquences contigües dont la longueur médiane est  $N_{50}=430$  bp et un total de 276 444 075 paires de bases. Les séquences issues des mitochondries et des plastides ont été supprimées pour atteindre un nombre final de séquences contigües de 626 700. Toutes les analyses ont été réalisées en utilisant le logiciel CLC Genomics Workbench v8.0.1 (CLC Bio-Qiagen, Aarhus, Denmark).

Tableau 6a : Description des populations utilisées dans l'étude de diversité génétique. PPG : Peak Plant Genetics, RU : Rutgers University, PST : Pure Seed Testing. Source: Mélodie Vivès et Stacy Bonos. Informations collectées des entreprises et de USDA (PVP).

POPULATION NAME	SPECIES	PEDIGREE	COMPANY	APPROXIMATIVE YEAR OF FIRST COMMERCIALIZATION
4RUE	<i>F. rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	ParkBench (Rose city cemetery + AC1 + Cincinnati) Collection from Germany	Pure Seed testing	Not commercialized yet
PST 4BEN	<i>F. rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	ParkBench (Rose city cemetery + AC1 + Cincinnati) Collection from Great Britain	Pure Seed testing	Not commercialized yet
PST 4ED4	<i>F. rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	ParkBench (Rose city cemetery + AC1 + Cincinnati) Collection from Aberdeen, Scotland	Pure Seed testing	Not commercialized yet
OS2	<i>F. rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	Rose City Cemetery Atlantic City	PickSeed West	Not commercialized yet
Audubon	<i>F. rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	81% Seattle Cemeteries 19% experimental lines Northrup King	Jacklin	2004
Chantilly	<i>F. rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	NJ old turf Rose City Cemetery	DLF	2012
Razor	<i>F. rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	6% NJ Old Turf 94% Rose City Cemetery	Pennington	2007
Cindy Lou	<i>F. rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	NJ old Turf Rose City Cemetery	DLF	2005
Contender	<i>F. rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	100% Rose City Cemetery	Barenbrug	
Lustrous	<i>F. rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	91% Rose City Cemetery 9% NJ old Turf	Pennington	2007
DLFPS	<i>F. rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	PSG5RM (81% Rose City Cemetery 19% Atlantic City) x OS2	DLF	Not commercialized yet
Kent	<i>F. rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	88% Rose City Cemetery 6% Atlantic City 6% NJ Old Turf	Columbia seeds	2007
Marvel	<i>F. rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	Rose City Cemetery Atlantic City	Landmark	2011
Epic	<i>F. rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	62% Rose City Cemetery 38% Atlantic City	Proseeds	2008
NavigatorII	<i>F. rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	73% Rose City Cemetery 27% Atlantic City + backcross with NJ old Turf	Mtn View	2014
PPGFRR111	<i>F. rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	54% Rose City Cemetery 46% Atlantic City	Mtn View	Not commercialized yet
PSG 5RM	<i>F. rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	81% Rose City Cemetery 19% Atlantic City	DLF	2013
Boreal	<i>F. rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	Ecotypes from Canada	STD	1966
58785	<i>F. rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	Poland	Poland	COLLECTION
JF-209	<i>F. rubra</i> subsp. <i>rubra</i>	63% Jacklin experimental non-released populations, 25% Shademaster II and + 12% Audubon.	Jacklin	Not commercialized yet

## II. CREATION DES MARQUEURS SSR

### A. DETECTION DES MOTIFS SSR ET DES AMORCES

Les motifs microsatellites ont été identifiés et créés en utilisant SciRoKo 3.4 (Kofler *et al.*, 2007), DesignPrimer 1.0 et le logiciel Primer3 (Rozen *et Skaletsky*, 1999).

Les paramètres de recherche des motifs microsatellites sont les suivants :

- Nombre minimal de répétitions du motif : 5 pour les motifs dinucléotidiques, 4 pour les motifs trinucléotidiques.
- Nombre minimal de nucléotides de part et d'autre de la séquence SSR : 300
- Nombre d'erreurs de séquençage tolérées : 0

Les paramètres de recherche d'amorces autour des motifs SSR sont les suivants :

- Longueur optimale : 20 pb
- Longueur minimale : 18 pb
- Longueur maximale : 27 pb
- Température de fusion optimale : 60°C
- Température de fusion minimale : 57.0°C
- Température de fusion maximale : 63.0°C
- Pourcentage de GC optimal : 50%

Ces paramètres ont été déterminés en étudiant différents projets similaires réalisés sur d'autres espèces : Cai *et al.*, 2013 ; Chen *et al.*, 1997. La recherche a été réalisée pour des motifs SSR trinucléotides et dinucléotides.

### B. DEVELOPPEMENT DES MARQUEURS SSR

Une séquence M13 a été ajoutée en terminaison 5' de l'amorce directe (5' – TGTTAAACGACGGCCAGT – 3') afin d'y attacher les molécules fluorescentes (Schuelke, 2000). Les amorces ont été synthétisées par Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). Une séquence « PIG-tail » (GTTTCTT) a été ajoutée en terminaison 5' de l'amorce inverse. Ainsi, la variabilité d'adénylation d'amplicons ou communément appelée variabilité « plus A\* » est minimisée et la lecture des données facilitée (Brownstein *et al.*, 1996).

## III. CARACTERISATION DES MARQUEURS SSR

### A. MATERIEL VEGETAL UTILISE

La caractérisation des marqueurs SSR développés a été réalisée sur 95 géotypes de *Festuca rubra* subsp. *rubra*. Les 95 géotypes proviennent de 6 variétés-populations : Boreal, Kent, DLFPS-FRR/3069, Marvel, Epic, 58573-14. Boreal est historiquement la première variété de fétuque rouge traçante protégée par le département d'agriculture du Canada en 1966 (Tilley *et al.*, 2012). 58573-14 est issue d'une population collectée en Europe dans les années 1970 (Dr Bonos, communication personnelle). Epic est une variété protégée développée par Rutgers University en 2008 (USDA, PVP, 2008). Kent est une variété présente dans les essais NTEP de 2007 (National Turfgrass Evaluation Program). Marvel et DLFPS-FRR/3069 sont des variétés actuellement présentes dans les essais NTEP. Ces géotypes ont été choisis pour être représentatifs de l'ensemble des ressources

Tableau 6b : Description des populations utilisées dans l'étude de diversité génétique. PPG : Peak Plant Genetics, RU : Rutgers University, PST : Pure Seed Testing. Source: Mélodie Vivès et Stacy Bonos. Informations collectées des entreprises et de USDA (PVP).

POPULATION NAME	SPECIES	PEDIGREE	COMPANY	APPROXIMATIVE YEAR OF FIRST COMMERCIALIZATION
JF-471	<i>F. rubra subsp. rubra</i>	No Information	Jacklin	Not commercialized yet
Garnet	<i>F. rubra subsp. rubra</i>	Rose City Cemetery Atlantic City + Jasper family	PickSeed West	2007
Rose City	<i>F. rubra subsp. rubra</i>	100% Rose City Cemetery	DLF	2012
58545	<i>F. rubra subsp. rubra</i>	Finland	Finland	COLLECTION
58708	<i>F. rubra subsp. rubra</i>	Latvia	Latvia	COLLECTION
58573	<i>F. rubra subsp. rubra</i>	Finland	Finland	COLLECTION
58758	<i>F. rubra subsp. rubra</i>	Lithuania	Lithuania	COLLECTION
Fairmont	<i>F. rubra subsp. commutata</i>	49% Chewings Fescue 20% Banner and Shadow germplasm 10% Collected plant Italy 2003 6% Treazure Chewings Fescue 5% Collected plant from France 2003 1% Collected plant from Slovenia 2003	Landmark	2014
PPGFRT101	<i>F. rubra subsp. litoralis</i>	Holland	Mtn View	COLLECTION
Seabreeze GT	<i>F. rubra subsp. litoralis</i>	Seabreeze Mala Ida Cemetery (Teck Republic) Great Britain	Mtn View	2007
Beacon	<i>F. trachyphylla</i>	58% Scaldis 24% Eastern US Old Turf 18% NJ Old Turf (Hard Fescue)	Mtn View	2011
Blue Ray	<i>F. trachyphylla</i>	43% A85-STE x Aurora 14% NJ Old Turf (Hard Fescue) 14% Collections from Italy 2003	Peak	2013
Reliant IV	<i>F. trachyphylla</i>	69% Reliant II 14% A85-STE x Aurora 11% NJ Old Turf (Hard Fescue) 4% Old Bridge Cemetery 2% Waldina	Proseeds	2008
Bighorn GT	<i>F. trachyphylla</i>	57% Bighorn 43% Azay	Pure Seed testing	2012
Soil Guard	<i>F. trachyphylla</i>	Aurora Gold Collection South Carolina Azay	Pure Seed testing	2011
Marco Polo	<i>F. ovina</i>	24% Azure 76% sheep x hard fescue	Jacklin	2010
Azure	<i>F. ovina</i>		Proseeds	1997

génétiques existantes dans le but global d'obtenir des marqueurs SSR fonctionnels, quelle que soit l'origine de l'accession. La caractérisation des marqueurs SSR est une étape importante qui permet d'évaluer leur polymorphisme et de sélectionner les meilleurs marqueurs afin de faciliter et optimiser de futures études impliquant ces marqueurs.

## **B. EXTRACTION D'ADN**

L'ADN a été extrait à l'aide d'un Kit DNeasy 96-well (QiAgen, Silicon Valley) en suivant les instructions du fabricant. Le broyage des tissus a été réalisé grâce à un TissueLyser II (QiAgen, Silicon Valley). Cette technique d'extraction a été choisie du fait de sa facilité et rapidité d'exécution tout en procurant un ADN de qualité suffisante pour la PCR.

## **C. PCR ET ELECTROPHORESE PAR CAPILLARITE**

Les PCR ont été conduites dans un volume de 13 µL en utilisant 50 ng d'ADN génomique, 10X ImmoBuffer (Bioline USA Inc, Taunton, USA), Immolase DNA Polymerase (Bioline), 50 mM MgCl<sub>2</sub> Solution (Bioline), 0.5 pmol d'amorce directe, 1 pmol d'amorce inverse et 1 pmol de marqueur fluorescent (FAM, NED, PET et VIC), 0.25 mM de chaque dNTP (Denville Scientific). Les paramètres du thermocycle sont 94°C pendant 5 minutes, puis 30 cycles de 94°C pendant 30 secondes, 55°C pendant 45 secondes, 72°C pendant 45 secondes, suivis de 20 cycles de 94°C pendant 5 minutes, 53°C pendant 45 secondes, 72°C pendant 45 secondes, puis finalement 10 minutes à 72°C.

Les produits de la PCR ont été analysés sur une ABI 3500 Genetic Analyzer et mesurés en utilisant le logiciel GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems, Foster City, CA) et LIZ 600 comme taille standard (Applied Biosystems, Foster City, CA).

## **D. ANALYSE DES DONNEES**

Pour des individus diploïdes, les marqueurs SSR génèrent des données codominantes c'est-à-dire qu'il est possible de distinguer hétérozygotes et homozygotes. Pour un diploïde, les génotypes possibles pour deux allèles\* A et B sont AA, AB ou BB : un pic ou une bande observée équivaut à un homozygote, deux pics observés équivaut à un hétérozygote. Pour des individus polyploïdes (octoploïdes pour la fétuque rouge traçante), le nombre de combinaisons possibles est bien plus important. Par exemple, deux génotypes octoploïdes possibles pour deux allèles A et B sont AAAAAABB et ABBBBBBB : les résultats de l'électrophorèse montreront seulement deux pics et les deux génotypes ne seront pas distingués. La détermination du nombre de copies d'un allèle pour un individu hétérozygote est très complexe. Plusieurs études ont tenté d'évaluer le nombre de copies d'un allèle grâce à la création de modèles, mais sont seulement applicables dans des conditions bien précises (De Silva *et al.*, 2005 ; Liao *et al.*, 2008 ; Markwith *et al.*, 2006). De fait, les marqueurs SSR de cette étude ont été traités comme marqueurs dominants et les bandes (allèles), notées absentes (0) ou présentes (1).

La valeur PIC (Polymorphism Information Content) a été calculée selon la formule décrite par Weir (1990) :  $PIC = 1 - \sum P_i^2$ , où  $P_i$  est la fréquence de l'allèle  $i$  du génotype étudié. Pour les marqueurs dominants, cette formule peut être simplifiée en  $PIC = 2P_iQ_i$  où  $P_i$  est la fréquence de présence et  $Q_i$  la fréquence d'absence pour l'allèle  $i$ . Pour un marqueur dominant la valeur PIC maximale est 0.50 (Honig, 2011).

Sur les 62 marqueurs testés, 22 ont été retenus pour la suite de l'étude ([Tableau 7](#)).

Tableau 7: Informations sur les 22 marqueurs SSR obtenus et leurs caractéristiques. Source: MélodieVivès.

MARKER		PRIMERS (5' - 3')	MOTIF	Na	LENGTH (bp)	PIC MIN FOR Na	PIC MAX FOR Na
NJR2Fr313	F	TGAAAAACGACGGCCAGTCCCGTTTATTTATTTGGGCA	(AT) <sub>8</sub>	9	293	0.020831025	0.48
	R	GTTTCTTCACCATGCATCGAGATGTTT					
NJR2Fr76	F	TGAAAAACGACGGCCAGTATGCCCTTATTTCCCTCACC	(TC) <sub>9</sub>	21	247	0.021274136	0.47450572
	R	GTTTCTTATGCGTGACAATTTCTGCTG					
NJR2Fr374	F	TGAAAAACGACGGCCAGTATCGTTAGTCGTACCTGCCG	(CA) <sub>9</sub>	13	292	0.020831025	0.49950139
	R	GTTTCTTTTATTGCATGTGGCGTCTTA					
NJR2Fr442	F	TGAAAAACGACGGCCAGTAGTCGTTATTTGACTCGGC	(AT) <sub>9</sub>	10	169	0.020831025	0.37761773
	R	GTTTCTTCCGAGCAGTATGATCAAGCA					
NJR2Fr81	F	TGAAAAACGACGGCCAGTAAACTAAGGGTTTCGATGCAA	(AT) <sub>10</sub>	18	271	0.021502836	0.39579395
	R	GTTTCTTAGATTGGTACAACACACGCTT					
NJR2Fr555	F	TGAAAAACGACGGCCAGTATCCGTAGCCCATGAAACAC	(AT) <sub>10</sub>	8	143	0.021050249	0.46740607
	R	GTTTCTTGCTGAGTGTGCATGTCTGGT					
NJR2Fr1066	F	TGAAAAACGACGGCCAGTACGTGGCATTGTGACAAATA	(AG) <sub>10</sub>	15	261	0.021050249	0.49977365
	R	GTTTCTTGGGCATGCTTAAGAATTTGG					
NJR2Fr85	F	TGAAAAACGACGGCCAGTTCGGGTCAAGTTACATCCAA	(TG) <sub>11</sub>	26	237	0.021274136	0.49947971
	R	GTTTCTTCCAAGTAAGATCCACCCGT					
NJR2Fr839	F	TGAAAAACGACGGCCAGTACAGTACGACCAAGAGGAA	(GT) <sub>11</sub>	12	164	0.020831025	0.40686981
	R	GTTTCTTGGTGCCTCGGAGTTGTCAT					
NJR2Fr285	F	TGAAAAACGACGGCCAGTATTATTCGTGGCAACATGC	(GA) <sub>12</sub>	21	290	0.021502836	0.47637051
	R	GTTTCTTTTGTACCCACACACGTGAA					
NJR2Fr1469	F	TGAAAAACGACGGCCAGTCCAATATTGAACACCAAGCCA	(AT) <sub>12</sub>	16	267	0.020831025	0.33240997
	R	GTTTCTTAATTAAGCCATGTTGGGCA					
NJR2Fr3136	F	TGAAAAACGACGGCCAGTCCGTGATGAGGAGAACCAAT	(CT) <sub>12</sub>	23	269	0.020831025	0.47556787
	R	GTTTCTTAACCTCAAGCCATGAGCAC					
NJR2Fr3147	F	TGAAAAACGACGGCCAGTTCACAACCTTCATGGGACA	(AT) <sub>12</sub>	23	184	0.020831025	0.47556787
	R	GTTTCTTAACATTGACCTGGATGGGAG					
NJR2Fr2323	F	TGAAAAACGACGGCCAGTATGAAGAACGGCTCACCAAG	(TA) <sub>13</sub>	11	135	0	0.29628791
	R	GTTTCTTGTACGTATCGCCAAGCTTCC					
NJR2Fr6746	F	TGAAAAACGACGGCCAGTATATGTACGCACCCTCGTCC	(TC) <sub>14</sub>	13	295	0.021975309	0.35777778
	R	GTTTCTTGATCGGTGGTCAAATTGCTT					
NJR3Fr177	F	TGAAAAACGACGGCCAGTGCAGTTAGCCAATCTTCCA	(GTG) <sub>7</sub>	8	294	0.021050249	0.49434133
	R	GTTTCTTTTGTGGACATAGGAGGGAG					
NJR3Fr296	F	TGAAAAACGACGGCCAGTGAACCTCACCTTCTCAGC	(GTT) <sub>7</sub>	21	235	0.020831025	0.4999446
	R	GTTTCTTAGGCACAGTTCATGCAGATG					
NJR3Fr1277	F	TGAAAAACGACGGCCAGTTGAAATAGCCCTGCTTGCTT	(CTC) <sub>7</sub>	9	175	0.022985398	0.38074635
	R	GTTTCTTCCCATGTTACCCATGATTGA					
NJR2Fr2398	F	TGAAAAACGACGGCCAGTTCATGTGTGGCACCATTCT	(AT) <sub>10</sub>	7	155	0	0.43622449
	R	GTTTCTTACAGTGGATGGTAAGGCTGC					
NJR2Fr2499	F	TGAAAAACGACGGCCAGTCTGCTGTGTGATCCAG	(TC) <sub>10</sub>	8	281	0.023252595	0.49439446
	R	GTTTCTTGATCCAACCACCTTGCTGAT					
NJR2Fr1275	F	TGAAAAACGACGGCCAGTGACCAAGCGACAACACAGAA	(CA) <sub>11</sub>	10	158	0.020831025	0.47069252
	R	GTTTCTTGGCCTATAGGTTCTGCTCCC					
NJR2Fr2181	F	TGAAAAACGACGGCCAGTCATTTGCTCTTTCACTTCG	(AG) <sub>11</sub>	16	167	0.020831025	0.49950139
	R	GTTTCTTAGAGTTCTGTCTGCCCTTCT					

## IV. ETUDE DE DIVERSITE GENETIQUE

### A. MATERIEL VEGETAL UTILISE

Peu de variétés de fétuques fines existent sur le marché et seulement une dizaine de variétés est protégée par un brevet. Les principales études expérimentales menées sur les cultivars sont celles de la NTEP (National Turfgrass Evaluation Program), de la CTBT (Cooperative Turfgrass Breeders Test) et du programme d'amélioration de Rutgers University. Pour choisir le panel de cultivars de ce projet, ces essais ont été pris en compte ainsi que l'avis d'experts de l'industrie du gazon : Dr William Meyer et Dr Stacy Bonos (Rutgers University). Les cultivars ont également été choisis pour leur représentativité du marché ; des variétés de chacun des plus importants obtenteurs ont donc été retenues (**Tableaux 6a** et **6b**). Des populations collectées en Europe ont également été incluses ainsi que des variétés expérimentales en cours de sélection.

Un total de 37 cultivars a été étudié dont :

- Fétuque rouge traçante - *Festuca rubra subsp. rubra* : 27 accessions
- Fétuque rouge gazonnante - *Festuca rubra subsp. commutata* : 1 accession
- Fétuque rouge semi traçante - *Festuca rubra subsp. litoralis* (G.F.W Meyer)  
Auquier : 2 accessions
- Fétuque durette - *Festuca trachyphylla* : 5 accessions
- Fétuque ovine - *Festuca ovina* : 2 accessions

Pour chaque cultivar, un lot de graines a été semé dans un conteneur. Une fois les graines germées, 24 individus par cultivar ont été prélevés au hasard et repiqués dans des casiers à cellules individuelles. Une fois les plantes suffisamment développées, 16 génotypes ont été sélectionnés aléatoirement pour représenter leur cultivar. Le nombre de 16 génotypes a été déterminé par une précédente étude réalisée par C. Kubik (Rutgers University), non publiée.

### B. EXTRACTION D'ADN, PCR ET ELECTROPHORESE PAR CAPILLARITE

Les conditions d'extraction de l'ADN, de PCR et d'électrophorèse sont les mêmes que celles énoncées dans les paragraphes III.B et III.C du chapitre 2. Les marqueurs SSR utilisés sont les 22 marqueurs retenus comme étant polymorphes (**Tableau 7**). Le nombre 22 pour les marqueurs SSR est jugé nettement suffisant pour obtenir une précision importante comme le prouve l'ensemble des études de diversité génétique suivantes : 11 marqueurs ont été utilisés par Cai *et al.* en 2013, 11 par Texeira *et al.* en 2013, 22 par Kubik *et al.* en 2001 ou encore 25 par Karatas *et al.* en 2014.

### C. ANALYSE DES DONNEES

Comme expliqué précédemment, les marqueurs SSR de cette étude ont été traités comme marqueurs dominants et les bandes (allèles) ont été notées absentes (0) ou présentes (1). Les données ont ensuite été assemblées en une matrice binaire compilant tous les allèles. GenAlEx 6.5 (Peakall *et Smouse*, 2006) a été utilisé pour déterminer  $\Phi_{iPT}$ , indicateur de la différenciation génétique au sein et entre les populations. Il est l'équivalent de  $F_{ST}$  (Wright) pour les matrices binaires. L'analyse de la variance moléculaire (AMOVA\*) a été réalisée sur GenAlEx 6.5. (Excoffier *et al.*, 1992). Les données ont été permutées 999





fois afin de créer une matrice de distance génétique\* entre les 37 populations indépendantes (pairwise genetic distance).

Cette matrice des distances a été implémentée au logiciel NTSYS 2.0.0 (Rohlf, 1992) afin d'obtenir un arbre phylogénétique\*. L'algorithme de Neighbor Joining (Saitou *et* Nei, 1987) a été utilisé comme méthode de calcul de regroupement. Les paramètres utilisés sont les suivants : method : weighed (Bruno *et al.*, 2000) ; rooting method : outgroup (Azure, *Festuca ovina*, a été choisi comme groupe externe car c'est une espèce différente). Le Neighbor Joining a été préféré aux autres méthodes de regroupement comme par exemple l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) pour plusieurs raisons. Premièrement, elle ne fait pas l'hypothèse que les populations évoluent au même rythme ce qui semble être un modèle plus représentatif des conditions réelles.

Deuxièmement, cette méthode a plus de chances de représenter fidèlement un plus large éventail de scénarii d'évolution (Kalinowski, 2009). Afin d'évaluer la représentativité de l'arbre phylogénétique par rapport à la matrice des distances entre les populations, la corrélation cophénéétique\* R a été calculée grâce au logiciel NTSYS 2.0.0.

Une autre méthode de calcul de regroupement a ensuite été utilisée pour comparer et affiner les résultats. Un algorithme bayésien a été appliqué à la matrice binaire de départ afin de déterminer le nombre optimal de populations distinguables et d'observer la répartition des individus au sein de ces populations *via* le logiciel STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000 ; Falush *et al.*, 2003). Le principe de l'algorithme est basé sur un nombre déterminé de regroupements (clusters, K), prédéfini et variant à chaque cycle du programme. Les paramètres utilisés sont les suivants : burnin length : 10 000 répétitions ; MCMC (Markov Chain Monte Carlo) : 10 000 répétitions ; nombre de répétitions à K fixe : 20 ; K minimum : 2 ; K maximum : 23 (un test préalable de K allant de 2 à 40 avec 3 répétitions à K fixe a montré que K=13 était la valeur optimale). Les résultats ont été visualisés grâce au logiciel en ligne Structure Harvester (Earl *et* VonHoldt, 2011). Deux tests statistiques ont permis de déterminer la valeur optimale de K : Ln P(D) (estimated Ln probability of data) et Delta K, développés par Pritchard *et al.*, 2000 et Evanno *et al.*, 2005.

## **BILAN**

Les méthodes utilisées lors de cette étude peuvent être résumées de la manière suivante :

1. Séquençage Nouvelle Génération d'un individu de féтуque rouge traçante.
2. Assemblage du génome et détection des motifs SSR et des amorces.
3. Test des marqueurs SSR sur 95 génotypes de féтуque rouge traçante.
4. Sélection des marqueurs les plus polymorphes et présentant des profils d'amplification faciles à interpréter.
5. Utilisation des 22 marqueurs SSR obtenus sur 37 cultivars, chacun représenté par 16 individus.
6. AMOVA sur matrice binaire regroupant les 610 allèles obtenus.
7. Algorithme du Neighbor Joining pour obtenir un arbre phylogénétique par le logiciel NTSYS.
8. Détermination du nombre optimal de populations et de leur structure par le logiciel STRUCTURE (méthode de regroupement bayésienne).

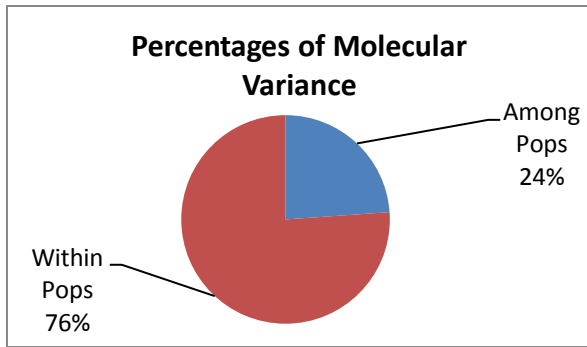


Figure 11 : Distribution de la variance moléculaire intra et inter-populations. Source : Mélodie Vivès.

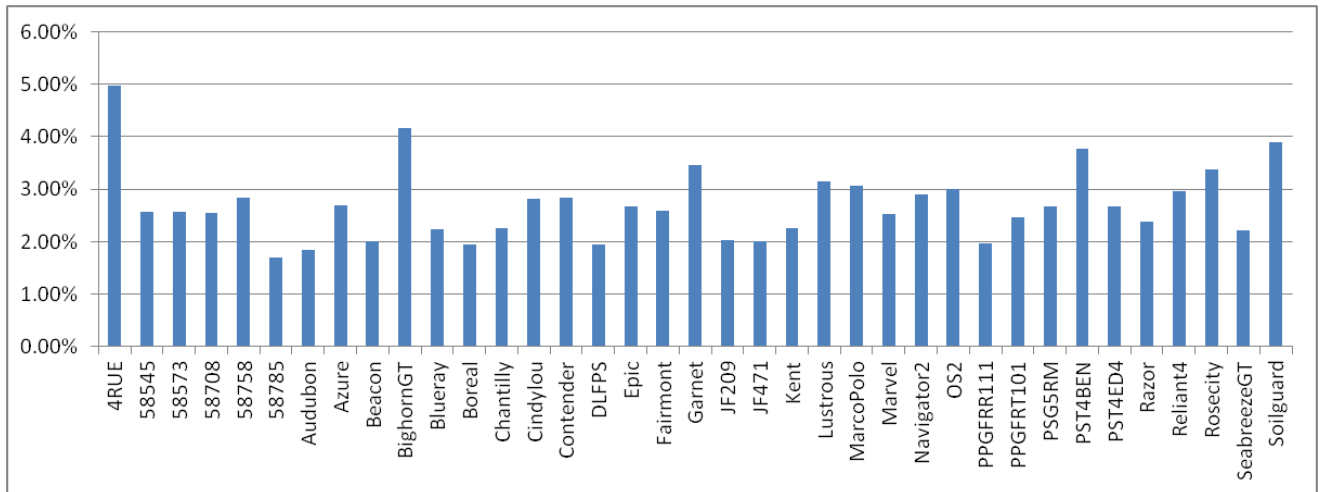


Figure 12 : Variance moléculaire par population. Source : Mélodie Vivès.

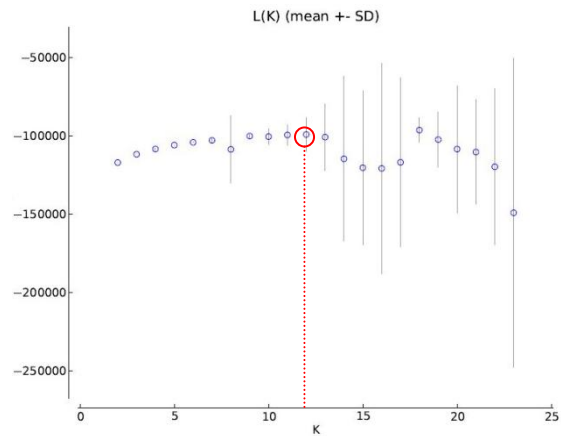
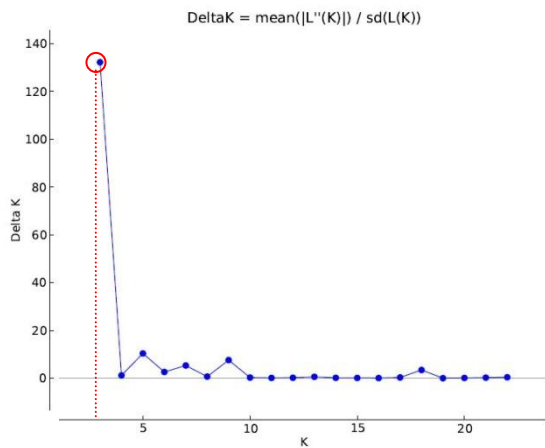


Figure 13 : Valeurs DeltaK en fonction de K. Source : Mélodie Vivès.

Figure 14 : Valeurs Ln P(D) en fonction de K. Source : Mélodie Vivès.

## RESULTATS ET INTERPRETATIONS

---

### I. INFORMATIONS SUR LE GENOME DE *FESTUCA RUBRA* SUBSP. *RUBRA*

Le séquençage a permis d'obtenir 670 000 séquences contigües dont la longueur médiane est  $N_{50} = 430$  pb. L'ensemble des séquences est disponible sur demande.

### II. MARQUEURS MICROSATELLITES POUR *FESTUCA RUBRA* SUBSP. *RUBRA*

43 872 motifs dinucléotidiques et 29 602 motifs trinuéotidiques ont été détectés. Comme présenté en Annexe 1, 16 628 SSR dinucléotidiques correspondent aux critères imposés (nombre minimal de répétitions par motif : 5 ; nombre minimal de nucléotides de part et d'autre du motif : 300). 18 121 SSR trinuéotidiques correspondent aux critères imposés (nombre minimal de répétitions par motif : 4 ; nombre minimal de nucléotides de part et d'autre du motif : 300). Enfin, 13 163 et 14 509 marqueurs di et trinuéotidiques ont été sélectionnés selon les caractéristiques de leurs amorces (longueur optimale : 20 pb ; longueur minimale : 18 pb ; longueur maximale : 27 pb ; température de fusion optimale : 60°C ; température de fusion minimale : 57.0°C ; température de fusion maximale : 63.0°C ; Pourcentage optimal de bases GC : 50%).

67 marqueurs ont été testés sur 95 génotypes. Les 22 marqueurs présentés dans le [Tableau 7](#), ont été retenus comme étant polymorphes et montrant des produits d'amplifications PCR facilement interprétables (pas d'ambiguïté « plus A », absence de pics à faible intensité, pics bien formés et nets, etc.).

### III. DIVERSITE DES RESSOURCES GENETIQUES DU PROGRAMME D'AMELIORATION DES FETUQUES FINES

#### A. MARQUEURS SSR

Les 22 marqueurs SSR utilisés ont produit un total de 610 allèles. Le nombre d'allèles par marqueur SSR varie de 11 à 46, avec pour valeur moyenne 27.7.

#### B. AMOVA

L'AMOVA a été réalisée sur les 37 variétés-populations. La variance moléculaire est majoritairement due à une variance intra-population (76%). Une part non négligeable (24%) est attribuée à la variance inter-population ([Figure 11](#)). La variance intra-population est répartie de façon homogène entre les différents cultivars bien que PST-4RUE présente la plus forte avec 4.97% et 58785, la plus faible avec 1.69% ([Figure 12](#)). Les détails des résultats de l'AMOVA sont présentés en Annexe 2.

La matrice des distances  $\Phi_{iPT}$  est présentée en Annexe 3. Les p-valeurs supérieures à 0.05 mettent en évidence les paires de populations non distinguables statistiquement. C'est le cas de Cindy Lou et Chantilly, Lustrous et Contender, Marvel et Epic, PST4RUE et PST4BEN, Soilguard et Bighorn GT. A part ces cinq paires, l'ensemble des p-valeurs est inférieur à 0.05 ce qui indique que toutes les autres comparaisons deux à deux sont

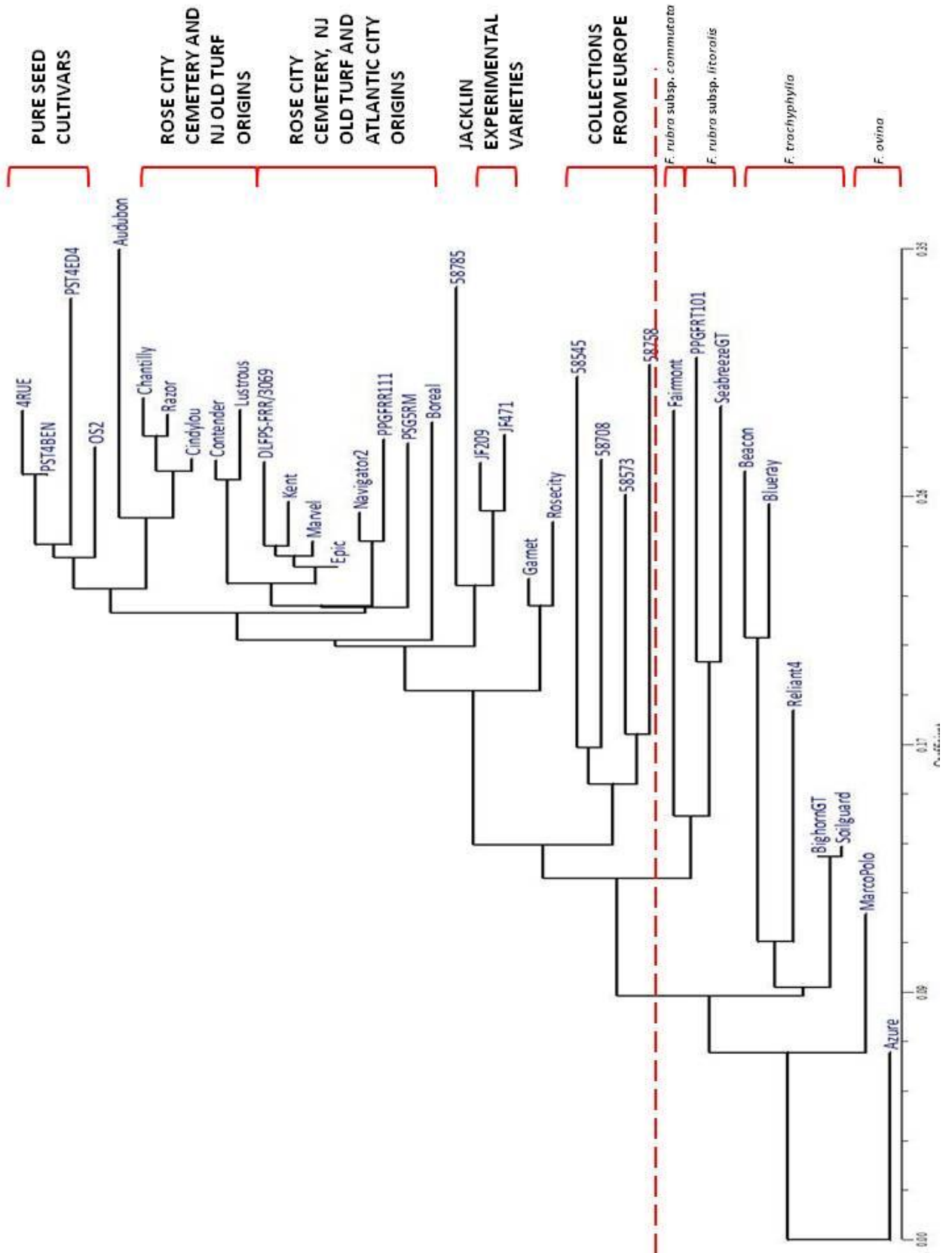


Figure 15: Arbre phylogénétique des 37 cultivars de fétuque fine. Source; Mélodie Vivès.

statistiquement différentes et que les cultivars associés sont génétiquement différenciés les uns des autres.

## C. ARBRE PHYLOGENETIQUE

### 1. Validation de l'arbre

La corrélation cophénétique obtenue est  $R=0.76454$ , valeur acceptable selon les recommandations du logiciel NTSYS (seuil minimal : 0.7). L'enchaînement des groupes basaux (**Figure 15**) correspond à la classification taxonomique décrite dans le chapitre 1 avec *Festuca ovina* et *Festuca trachyphylla*, suivies de *Festuca rubra* subsp. *litoralis* et *Festuca rubra* subsp. *commutata*. Ceci est un autre argument montrant la validité de l'arbre.

### 2. Arbre, pédigrée et sélectionneurs

L'arbre étant validé par les statistiques et la taxonomie, il est maintenant intéressant de comprendre pourquoi les variétés sont reliées de cette façon et quels éléments peuvent expliquer cette distribution. L'ensemble des caractéristiques des populations étudiées est résumé dans le **Tableaux 6a** et **6b**. La topologie de l'arbre peut être corrélée à plusieurs caractéristiques des cultivars.

Premièrement, on peut remarquer que certaines variétés sont regroupées en fonction de leur entreprise d'origine (sélectionneur) (**Figure 15**) comme pour les 3 cultivars PST 4RUE, PST 4BEN et PST 4ED4 ainsi que Bighorn GT et Soilguard de l'entreprise Pure Seed Testing. C'est également le cas pour les cultivars expérimentaux de l'entreprise Jacklin JF209 et JF471, bien qu'Audubon (appartenant également à Jacklin) soit faiblement lié à ces deux variétés.

Deuxièmement, le pédigrée, c'est-à-dire la généalogie de la variété étudiée, est fortement corrélé à la topologie de l'arbre. Au sein des fétuques rouges traçantes, on peut observer un groupe allant de PST 4RUE jusqu'à PSG 5RM, scindé en deux sous-groupes au niveau de Cindy Lou et Contender. L'étude du pédigrée nous indique que les variétés Chantilly, Razor, Cindy Lou, Contender et Lustrous sont toutes issues de croisements entre une plante contenant des endophytes prélevée dans le cimetière de Rose City (Oregon) et d'anciens individus de la station d'expérimentation pour le gazon d'Adelphia (New Jersey) collectés par le Dr. C. Reed Funk. Les variétés DLFPS, Kent, Marvel, Epic, Navigator II, PPG FRR 111 et PSG 5RM sont toutes issues de croisements entre une plante contenant des endophytes prélevée dans le cimetière de Rose City (Oregon), d'anciens individus de la station d'expérimentation pour le gazon d'Adelphia collectés par le Dr. C. Reed Funk et une plante contenant des endophytes prélevée à Atlantic City (New Jersey). Ainsi, la mise en parallèle de ces informations et de la topologie de l'arbre permet d'expliquer les observations précédentes :

- Le groupe allant de PST 4RUE jusqu'à PSG5RM s'explique par un pédigrée très proche pour chacune des variétés. Seulement trois parents principaux sont à l'origine de ces populations.
- La division en deux sous-groupes pourrait s'expliquer par l'apparition du parent prélevé à Atlantic City dans les pédigrées des variétés à partir de DLFPS. Le pédigrée ne permet pas d'expliquer la répartition de Contender et Lustrous avec le sous-groupe inférieur.

On peut cependant noter que les variétés Garnet et Rose City ont des pédigrées similaires et n'appartiennent pourtant pas au groupe précédent.

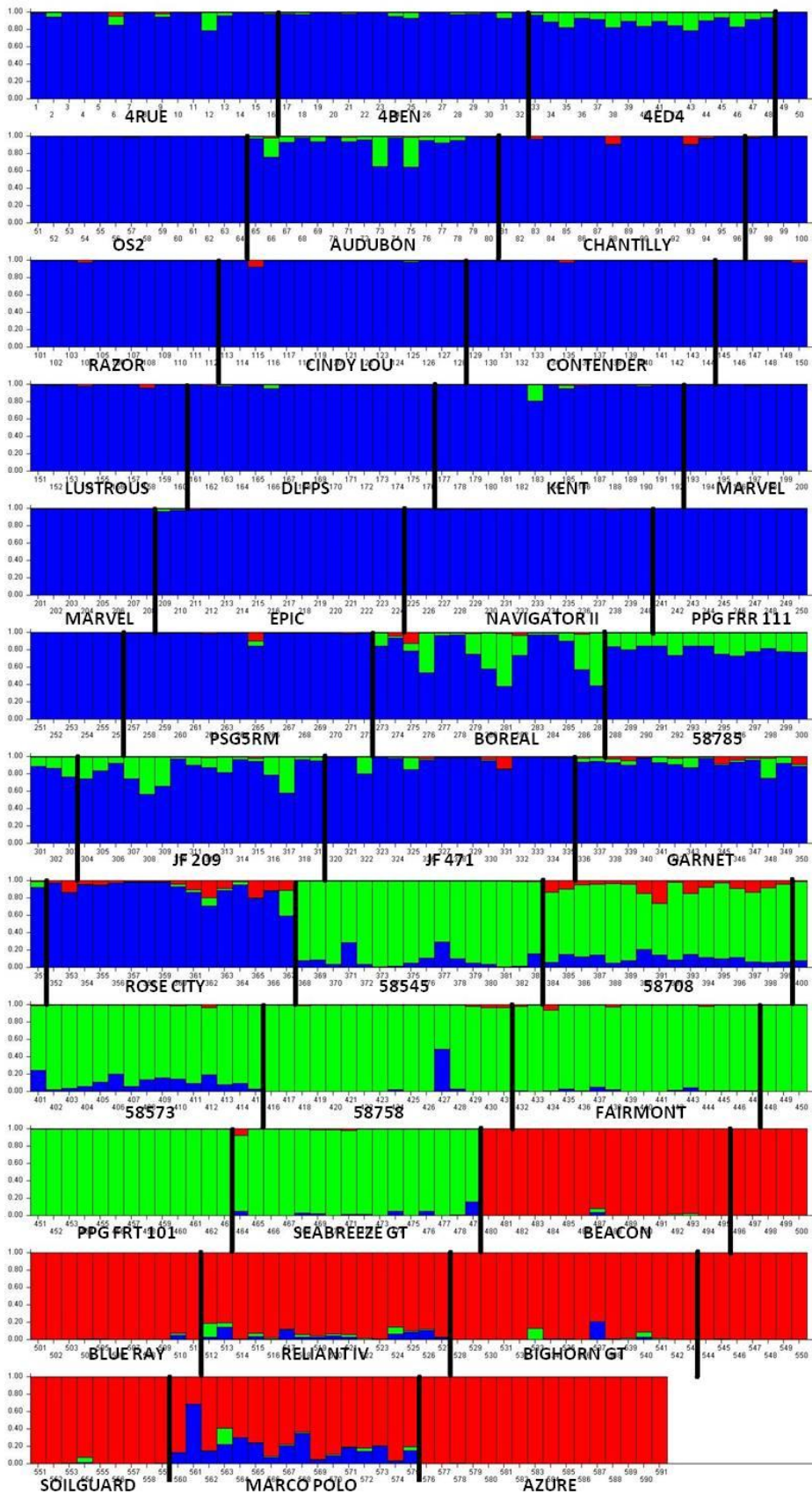


Figure 16 : Répartition des populations par individu pour K=3. Source : Mélodie Vivès



### **3. Informations sur les accessions**

Les paires identiques de cultivars indiquées par les p-valeurs de la matrice des distances sont également présentes sur l'arbre : Cindy Lou et Chantilly, Lustrous et Contender, Marvel et Epic, PST4RUE et PST4BEN, Soilguard et Bighorn GT.

Quatre des populations issues de collections en Europe sont reliées au groupe des fétuques rouges traçantes bien que leur position basale proche de la fétuque gazonnante (Fairmont) puisse soulever des questions. Leur position basale peut s'expliquer par le fait que les accessions de *Festuca* originaires d'Europe sont théoriquement plus distantes génétiquement et plus diverses que des génotypes plus récemment développés aux États-Unis. Une autre hypothèse qui pourrait expliquer la position basale est que lors du prélèvement, une erreur d'identification a été produite et ces accessions appartiennent à une autre espèce ou sous-espèce de fétuque fine. Comme il n'y a pas de coupure nette entre le groupe des fétuques rouges traçantes et les collections d'Europe, la première hypothèse est plus plausible.

L'accession 58785 est proche des cultivars expérimentaux Jacklin et d'autres fétuques rouges traçantes. Il est difficile d'expliquer cette observation. Il est possible qu'une partie des parents des variétés de Jacklin provienne de collections issues d'Europe. Une autre possibilité est que 58785 est une fétuque rouge traçante alors que les quatre autres accessions européennes n'en sont pas.

## **D. RESULTATS DE L'ALGORITHME BAYESIEN**

### **1. Détermination du nombre optimal de populations**

Les deux statistiques de détermination du nombre optimal de populations indiquent des résultats différents. La statistique DeltaK (Evanno *et al.*, 2005) montre  $K=3$  ([Figure 13](#)) alors que Ln P(D) (Pritchard *et al.*, 2000) montre  $K=12$  ([Figure 14](#)).

### **2. Résultats pour $K=3$**

Les trois populations sont présentées en [Figure 16](#). Chaque colonne représente un individu et chaque couleur représente une population. La proportion d'une couleur par rapport à une autre pour une colonne donnée représente la part de ces populations dans l'origine de l'individu. La population 1 regroupe les fétuques rouges traçantes. La population 2 regroupe les collections européennes ainsi que les fétuques rouges gazonnante et semi-traçantes. La population 3 regroupe les fétuques dures et ovines.

Il est intéressant de noter que les populations issues de collections en Europe ne sont pas regroupées avec les fétuques rouges traçantes mais avec d'autres espèces. Cette observation renforce l'hypothèse émise précédemment « lors du prélèvement, une erreur d'identification a été produite et ces accessions sont une autre espèce ou sous-espèce de fétuque fine », bien que la première hypothèse reste valable.

On peut également observer que certains individus du cultivar Boreal sont liés à la fois à la population 1 et à la population 2. Deux hypothèses peuvent expliquer ce constat. La première est que Boreal est une variété très ancienne (1966) qui n'est plus sujette à la certification et donc des impuretés dans les croisements ont pu apparaître. La deuxième hypothèse vient du fait que Boreal soit une variété ancienne, sélectionnée sur des écotypes du Canada. Cette variété est donc éventuellement plus proche du type « sauvage » représenté par la population verte que du type « amélioré » représenté par la population bleue.

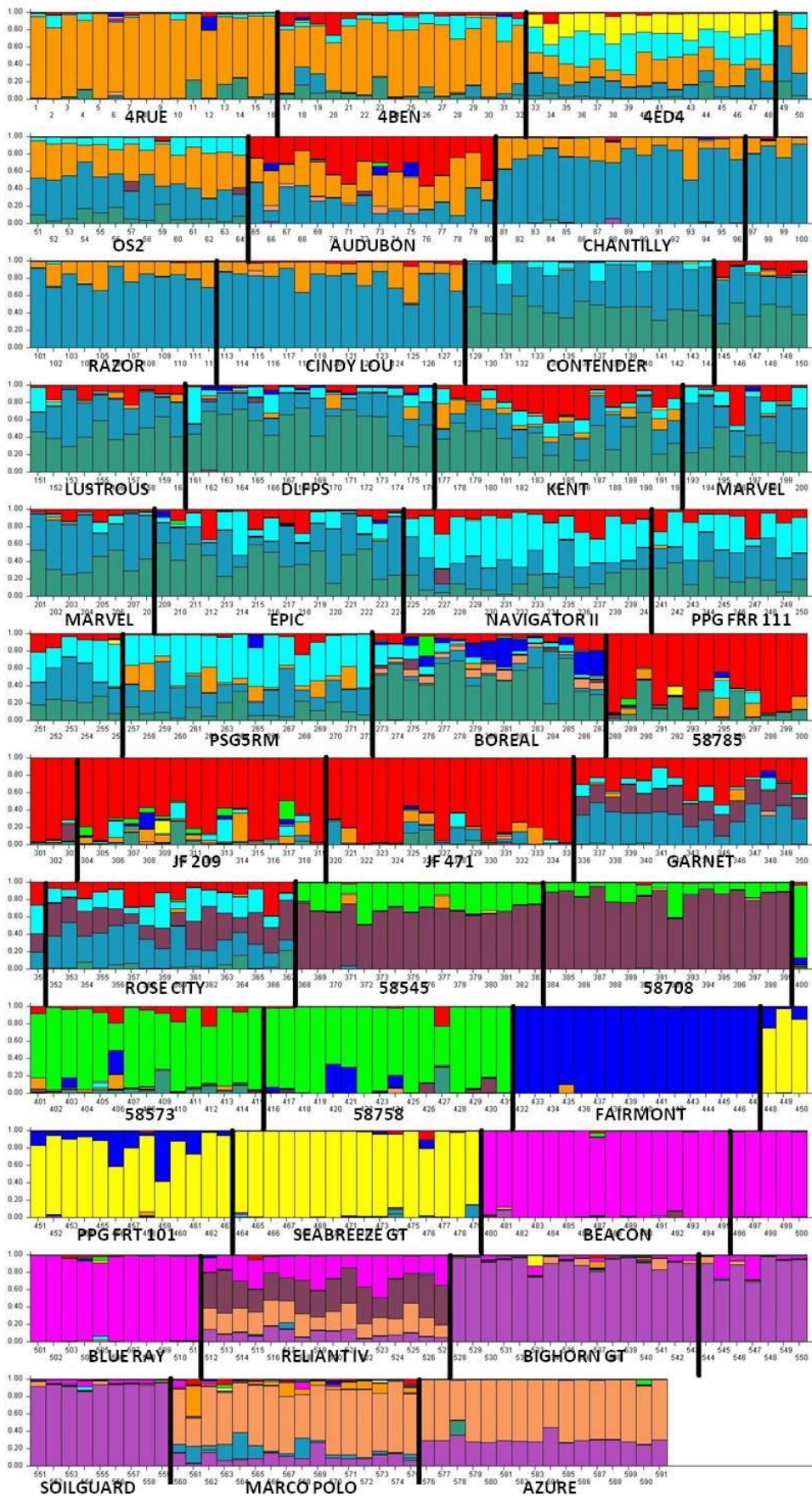


Figure 1 : Répartition des populations par individu pour K=12. Source : Mélodie Vivès



### 1. Résultats pour K=12

Les douze populations sont illustrées en *Figure 17*. Elles sont représentées par des individus principaux c'est-à-dire qui ont une couleur très dominante voire unique :

Pop 1 (orange) : 4RUE et 4BEN

Pop 2 (bleu) : Chantilly, Razor et Cindy Lou

Pop 3 (bleu vert) : Contender, Lustrous, DLFPS, Kent, Marvel, Epic et Boreal

Pop 4 (bleu clair) : Navigator II, PPG FRR 11 et PSG5RM

Pop 5 (rouge) : 58785, JF 209 et JF 471

Pop 6 (violet foncé) : 58545 et 58708

Pop 7 (vert) : 58573 et 58758

Pop 8 (bleu foncé) : Fairmont

Pop 9 (jaune) : PPG FRT 101 et Seabreeze GT

Pop 10 (rose) : Beacon et Blue Ray

Pop 11 (violet) : Bighorn GT et Soilguard

Pop 12 (rose saumon) : Marco Polo et Azure.

De nombreux éléments concordent avec les observations relatives à l'arbre phylogénétique. Premièrement, les espèces et sous-espèces sont regroupées dans des populations différentes : Pop8 pour la fétuque gazonnante, Pop9 pour la fétuque semi-traçante et Pop12 pour la fétuque ovine. La fétuque durette est divisée en deux populations : Beacon et Blue Ray sont différentes de Bighorn GT et Soilguard. De plus, les accessions européennes sont divisées en deux populations comme sur l'arbre phylogénétique. Les variétés expérimentales Jacklin et 58785, Cindy Lou, Razor et Chantilly et 4RUE et 4BEN sont aussi regroupées au sein de mêmes populations.

Les deux méthodes de regroupement, Neighbor Joining et algorithme bayésien, se recoupent donc en de nombreux points. La méthode bayésienne pour K=12 et sa représentation par le logiciel STRUCTURE nous permettent d'obtenir des informations plus détaillées. On observe premièrement que le cultivar Audubon, créé par la société Jacklin, appartient partiellement à la population 5, dont les principaux représentants sont JF 209 et JF 471 (Jacklin). Sa position au sein de l'arbre phylogénétique était surprenante, l'algorithme bayésien nous permet de comprendre pourquoi : Audubon partage des caractéristiques à la fois des populations 1, 2 et 5.

Garnet et Rose City ont exactement les mêmes types de pédigrées que le groupe formé entre PST 4RUE et PSG 5RM. De fait, on pourrait penser qu'ils devraient se positionner au sein de ce groupe dans l'arbre phylogénétique. La *Figure 17* montre que Garnet et Rose City ont des caractéristiques des populations 2 et 4 (part du pédigrée commune au groupe PST4RUE à PSG5RM) mais également de la population 6 (collections européennes). La position inattendue de Garnet et Rose City au sein de l'arbre phylogénétique peut donc s'expliquer de la manière suivante : ils partagent des caractéristiques à la fois du groupe PST4RUE à PSG5RM et des collections européennes. Par conséquent, ils se positionnent à « mi-chemin » entre ces deux groupes.

Enfin, on peut observer de façon surprenante que certains cultivars possèdent des traits provenant d'autres espèces ou sous-espèces. C'est le cas de 4ED4 qui montre des éléments de la population 9, fétuque semi-traçante, de Boreal qui possède des caractéristiques de la population 8, fétuque gazonnante et de Reliant IV qui présente des traits de la population 6, collection d'Europe supposée fétuque rouge traçante. Jenkin rapporte en 1955 des essais d'hybridations interspécifiques entre différentes espèces de



fétuques fines qui ont partiellement réussi en fonction des espèces croisées entre elles. Les principales barrières sont la différence de niveau de ploïdie et la différence de périodes de floraison (Ruemmele *et al.*, 2003). Une hypothèse qui expliquerait ces observations est que des hybridations interspécifiques naturelles auraient lieu malgré les barrières rapportées dans la littérature.

## **BILAN**

Dans cette étude, 13 163 marqueurs à motifs dinucléotidiques et 14 509 marqueurs à motifs trinucléotidiques ont été sélectionnés. 65 marqueurs SSR ont été testés sur 95 génotypes et 22 marqueurs polymorphes ont été retenus. L'étude de diversité génétique a montré un nombre moyen d'allèles par marqueur de 27.7. L'AMOVA a permis de révéler que certaines paires de cultivars ne sont pas génétiquement distinguables et que la diversité de l'ensemble des individus testés est majoritairement due à une diversité intra-population. L'algorithme du Neighbor Joining et l'algorithme bayésien permettent de représenter les résultats et de les comparer aux pédigrées. Les cultivars sont regroupés soit en fonction de leur entreprise d'origine, soit en fonction de leur pédigrée. Les espèces et sous-espèces de fétuque fine sont groupées en accord avec les études de taxonomie précédentes.



## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

### I. DISCUSSION DE LA METHODE

#### A. VALIDATION DE L'ARBRE PHYLOGENETIQUE

Une des méthodes de validation statistique les plus courantes est le « bootstrapping ». Appliquée aux arbres phylogénétiques en 1985 par Felsenstein, elle permet d'attribuer une probabilité à chaque branche de l'arbre et donc de valider sa topologie. La probabilité est basée sur des échantillonnages répétés des individus ou autrement dit, la probabilité que cette branche soit définie de la même manière avec un échantillonnage différent. Les calculs étant réalisés sur les individus, cette méthode ne s'applique pas aux arbres présentant des populations. De plus, aucun programme n'a été développé dans ce but (Mohammadi *et* Prasanna, 2003).

Pour valider l'arbre, nous avons donc procédé en deux étapes : les p-valeurs de  $\Phi_{IPT}$  suite à l'AMOVA permettent de valider la matrice des distances, la corrélation cophénétique R permet ensuite d'évaluer la représentativité de l'arbre par rapport à la matrice. Selon Sokal *et* Rohlf (1962), une corrélation cophénétique supérieure à 0.7 permet de valider l'arbre bien que des valeurs entre 0.7 et 0.8 soient considérées comme faibles.

En prenant en compte les remarques précédentes, nous avons décidé qu'une valeur  $R=0.76454$  était moyenne mais acceptable. Une autre méthode de regroupement a été utilisée afin de comparer les résultats et valider ces modèles. De plus, la mise en relation des pédigrées et de l'arbre phylogénétique montre que la plupart des relations observées ont un sens en termes d'histoire généalogique des variétés.

#### B. METHODE DE REGROUPEMENT : UPGMA VS NEIGHBOR JOINING

Comme expliqué dans la partie 2, plusieurs auteurs montrent que la méthode du Neighbor Joining est plus précise et représentative que l'algorithme UPGMA. Etant donné la valeur moyenne de R obtenue par le Neighbor Joining, un arbre UPGMA a été créé donnant une valeur R de 0.90407 (Annexe 4). Cette valeur R est nettement supérieure bien que l'arbre UPGMA montre des incohérences. En effet, les populations des espèces de féтуque ovine et féтуque durette sont « mélangées » et sont plus proches des féтуques rouges traçantes que les féтуques rouges gazonnante et semi-traçantes. Malgré une valeur R plus faible, les groupes externes (espèces et sous-espèces) du Neighbor Joining sont en accord avec les travaux de taxonomie précédemment réalisés, exposés dans le Chapitre 1, paragraphe III.B.1 (*Figure 7*).

Ceci rejoint également les travaux de Kalinowski en 2009 montrant que le Neighbor Joining est la méthode qui a le plus de chances de représenter fidèlement un plus large éventail de scénarii d'évolution. Pour l'ensemble de ces raisons, l'arbre du Neighbor Joining a été choisi comme arbre de référence.

#### C. ALGORITHMES DU NEIGHBOR JOINING ET BAYESIEN : COMPARAISON DES RESULTATS

Les résultats obtenus par les deux modèles se recoupent en de nombreux points : distribution des espèces et sous-espèces, groupements des cultivars, *etc.* (voir partie III). L'algorithme bayésien donne accès au nombre réel de populations (K) et à des résultats plus fins à l'échelle de l'individu. Il permet d'avoir une indication sur l'homogénéité des individus



d'un même cultivar. De plus, le fait que les deux statistiques LnP(D) et Delta K donnent des résultats différents nous permet d'avoir deux échelles de regroupement et d'obtenir des résultats plus précis. La comparaison des deux résultats du Neighbor Joining et de l'algorithme bayésien nous donne une meilleure compréhension des relations entre les cultivars et de leur généalogie. Pour les sélectionneurs, cet outil est très précieux et applicable au programme d'amélioration (voir chapitre IV, paragraphes III.B et III.C).

#### **D. DETERMINATION DU NOMBRE OPTIMAL DE POPULATIONS : LN P(D) VS DELTA K**

Comme présenté dans le chapitre 3, les statistiques Ln P(D) et Delta K ont donné des valeurs de K différentes. Selon son inventeur (Pritchard *et al.*, 2000), Ln P(D) est seulement un indicateur du plus petit nombre K qui permet de représenter au mieux la structuration des populations :

« *We may not always be able to know the TRUE value of K, but we should aim for the smallest value of K that captures the major structure in the data* ».

En 2005, Evanno *et al.* montrent que LnP(D) ne fournit pas une estimation correcte de K, alors que leur nouveau développement Delta K permet de détecter de façon précise les niveaux hiérarchiques les plus fins et donc donner la valeur optimale de K avec exactitude. La **Figure 16** pour K=3 est donc la plus représentative des groupes de populations. Néanmoins, de nombreuses études utilisent la statistique LnP(D) comme élément de décision. La **Figure 17** pour K=12 propose une structure non seulement en accord avec l'arbre phylogénétique de Neighbor Joining mais aussi correspondant aux pédigrées et observation taxonomiques. Les deux figures sont donc valides et représentent deux niveaux de groupement différents : groupement par sous-espèce et groupement par cultivar-population.

#### **E. NOUVELLES TECHNIQUES DE GENOTYPAGE : MARQUEURS SSR VS MARQUEURS SNP**

Les marqueurs microsatellites ont largement été utilisés depuis les années 2000 et continuent à être développés pour de nouvelles espèces. Une fois créés et testés, ce sont des outils très faciles à utiliser qui donnent rapidement accès à des résultats précis, fiables et reproductibles. Cependant, le développement et la caractérisation des marqueurs SSR est long et coûteux et doit être réalisé pour chacune des espèces étudiées.

De nos jours, les coûts de séquençage diminuent drastiquement. Par conséquent, de nombreuses méthodes ayant pour technique de base le séquençage, se développent et prennent de l'importance. C'est le cas du génotypage par séquençage (Genotyping-by-Sequencing, GBS), lancé en 2011 par Elshire *et al.*, qui permet le génotypage de larges génomes en réduisant la complexité par des enzymes de restrictions puis détection de marqueurs SNP. Cette méthode permet aux sélectionneurs de mener des études génomiques sans avoir à développer des outils moléculaires dans un premier temps, ou encore sans besoin de connaissances préalables sur le génome de l'espèce étudiée. La quantité d'informations obtenues est plus importante, pour un temps de développement bien plus court. Encore récente, cette méthode demande de nombreux ajustements en fonction des caractéristiques de l'espèce (taille du génome, niveau de ploïdie, système de reproduction, *etc.*) (Elshire *et al.*, 2014). Le traitement des données est complexe et requiert des connaissances en bioinformatiques importantes. Enfin, bien que les coûts de séquençage diminuent, la procédure nécessite un investissement important.

La performance des marqueurs microsatellites est donc aujourd'hui remise en question par le développement de ces nouvelles méthodes. Pour mettre en place la sélection





assistée par marqueurs, les nouvelles méthodes comme le génotypage par séquençage seraient plus intéressantes à utiliser que les marqueurs SSR. Ces derniers sont néanmoins nécessaires pour les sélectionneurs car faciles et rapides d'emploi et sont ainsi très pratiques pour la détermination de parentés, la caractérisation des collections ou encore la protection des variétés. Dans cette étude, les 22 marqueurs SSR ont permis de différencier 37 populations et 19 peuvent s'appliquer aux autres espèces de fétuques fines.

## II. DISCUSSION DES RESULTATS

### A. LES COLLECTIONS D'EUROPE SONT-ELLES DES FETUQUES ROUGES TRAÇANTES ?

Quatre des cinq populations issues de prélèvements en Europe sont regroupées à la base des fétuques rouges traçantes, proches des fétuques rouges gazonnante et semi-traçantes selon l'arbre phylogénétique du Neighbor Joining. Selon l'algorithme bayésien (pour  $K=3$ ), les collections appartiennent à la même population que les fétuques gazonnante et semi-traçante et sont séparées des fétuques rouges traçantes. Selon ces observations, l'appartenance de ces populations à la sous-espèce *F. rubra* subsp. *rubra* peut être remise en question.

Par manque de temps, nous n'avons pas pu mener d'études complémentaires. Un moyen de connaître l'espèce de ces collections serait le séquençage de la séquence ITS de ces populations (Internal Transcribed Spacer). Cette séquence non-codante est localisée entre les gènes 5.8S et 25S d'ARNr. Les gènes codant pour l'ARN ribosomal étant répétés en milliers de copies, cette région est très facile à amplifier. Les séquences ITS sont très polymorphes et sont de fait fréquemment utilisées pour comparer les individus. Cette méthode pourrait donc être utilisée pour déterminer à quelle espèce appartiennent les collections.

### B. MISE EN PERSPECTIVE DES RESULTATS PAR RAPPORT A D'AUTRES ESPECES VEGETALES

Un total de 73,474 *loci* SSR a été détecté pour la fétuque rouge traçante (43,872 motifs dinucléotidiques et 29,602 trinucleotidiques). Par une méthode très similaire, Cai *et al.* (2013) ont détecté 42 923 *loci* SSR pour le champignon *Anisogramma anomala*. Cette inégalité est principalement due à la différence de taille du génome des champignons comparée à celle des végétaux. Ces deux nombres possèdent tout de même un ordre de grandeur identique.

Dans cette étude, les 22 marqueurs SSR utilisés sur 591 individus ont produit un total de 610 allèles. Le nombre d'allèles par marqueur SSR varie de 11 à 46, avec pour valeur moyenne 27.7. Dans une étude similaire sur le pâturin des prés polyploïde (Honig *et al.*, 2010), 88 marqueurs SSR sur 265 accessions ont produit 3 373 allèles avec un nombre d'allèles par marqueur allant de 4 à 81 et une moyenne de 38.3. Les résultats pour le pâturin des prés et la fétuque rouge traçante sont similaires du fait de leur haut niveau de ploïdie entraînant une forte diversité allélique par *locus*. Une autre étude menée avec des marqueurs SSR sur la vigne a montré un nombre moyen d'allèles par *locus* de 10.09, allant de 4 à 20 (Karatas *et al.*, 2014). Les fétuques fines ont donc un niveau de diversité allélique important principalement dû à leur haut niveau de ploïdie.



L'AMOVA de cette étude a été réalisée sur les 37 variétés-populations. La variance est majoritairement due à une variance intra-population (76%). Des résultats similaires ont été obtenus sur l'étude des pâturins des prés avec 70% de la variance due à la variance intra-population et 30% due à la variance inter-population. Une autre étude menée sur le ray-grass anglais (Kubik *et al.*, 2001) montre une variance intra-population de 86.4%. De fortes variances intra-population sont synonymes d'une faible diversité du germplasma ou encore d'un potentiel de dégénérescence lorsqu'il s'agit de populations en milieu non contrôlé (Gaafar *et al.*, 2014). Dans les milieux d'origine d'une espèce, la variance intra-population est nettement inférieure à la variance inter-population, montrant une très forte diversité (Qian *et al.*, 2001). Le germplasma des fétuques fines est donc peu diversifié malgré les collections européennes.

### III. APPLICATION DES RESULTATS AU PROGRAMME D'AMELIORATION

#### A. UNE FAIBLE DIVERSITE DU GERMLASME

Pour un sélectionneur, avoir une collection variée et diversifiée est essentiel pour plusieurs raisons. Premièrement, le sélectionneur désire avoir un panel de caractéristiques étendu pour les utiliser et les combiner en fonction d'objectifs de sélection qui varient dans le temps (pics de maladies, attentes des consommateurs, changement climatique, *etc.*). Par exemple, une maladie peut ne pas poser de problème pendant très longtemps et devenir très agressive soudainement à cause de changements de conditions environnementales difficiles à contrôler. Posséder des ressources génétiques très variées permet d'avoir au moins un génotype résistant à cette maladie, base des croisements qui permettront l'introduction du caractère dans les cultivars plus avancés.

Deuxièmement, les sélectionneurs jouent un rôle important dans la conservation des ressources génétiques et permettent de maintenir le patrimoine d'une espèce. Les objectifs de sélection peuvent rapidement amener à une réduction de la diversité génétique par sélections répétées des mêmes caractères, génération après génération. De plus, les backcross peuvent entraîner des dégénérescences par consanguinité. Evaluer et gérer ses ressources génétiques est donc essentiel pour les obtenteurs.

Plusieurs éléments de cette étude montrent que la diversité de la collection est plutôt faible, notamment au sein des fétuques rouges traçantes. 76% de la variance est due à une variance intra-population ce qui signifie que les cultivars sont peu différents les uns des autres. 5 comparaisons deux à deux des cultivars par l'AMOVA n'étaient pas significatives, souvent parce qu'originaires de la même entreprise. L'étude du pedigree a permis d'expliquer cette faible diversité : une grande partie des cultivars de fétuque rouge traçante provient des croisements des mêmes groupes de parents. Ces parents ont été sélectionnés car porteurs d'endophytes afin d'aider à supprimer les maladies de la brûlure en plaque et du fil rouge (Bonos *et al.*, 2006 ; Clarke *et al.*, 2005).

Afin d'augmenter la diversité du germplasma, il serait intéressant d'utiliser les populations collectées en Europe dans les croisements puisqu'elles sont très différentes des cultivars existants. De plus, un projet d'étude des endophytes et de leur fonctionnement est en cours afin de comprendre pourquoi certains cultivars sont infectés et d'autres pas, et ainsi adapter les schémas de sélections.

Tableau 8 : Applicabilité des marqueurs SSR aux espèces et sous-espèces de fétuques fines. Source : Mélodie Vivès

	AMPLIFICATION_ SLENDER	AMPLIFCAITON_ CHEWING'S	AMPLIFICATION_ HARD	AMPLIFICATION_ SHEEP'S	AMPLIFICATION_ STRONG CREEPING
NJR2Fr2398	NON	NON	OUI	NON	OUI
NJR2Fr2499	OUI	NON	OUI	NON	OUI
NJR2Fr3136	OUI	OUI	NON	NON	OUI

## **B. DES MARQUEURS SSR POUR IDENTIFIER LES ESPECES ET SOUS-ESPECES DE FETUQUE FINE**

Comme expliqué dans le chapitre 1, les espèces et sous-espèces de fétuques fines sont difficiles à différencier sur le terrain et les caractères morphologiques impliqués dans l'identification peuvent être modifiés par les conditions environnementales. Cette étude a mis en évidence 3 marqueurs SSR qui pourraient permettre une identification génétique. Comme présenté dans le **Tableau 8**, NJR2Fr2398, NJR2Fr2499 et NJR2Fr3136 n'ont pas été amplifiés par toutes les espèces ou sous-espèces de fétuques fines. Ainsi, un « profil d'amplification » caractérise chacune des fétuques fines. Ceci n'est qu'un premier résultat, il faudrait répéter l'expérience et augmenter le nombre de représentants de chaque espèce ou sous-espèce pour confirmer ces résultats.

Cet outil pourrait être très utile notamment pour des prélèvements dans les milieux d'origine, la protection variétale et l'identification de matériel végétal en station d'expérimentation et d'amélioration.

## **C. AIDE AU CHOIX DES VARIETES DANS LES MELANGES POUR GAZON**

Les mélanges de semences pour gazon combinent des espèces et variétés différentes afin d'obtenir une diversité d'atouts et constituer des pelouses de qualité. La diversité permet un meilleur développement d'organismes dans le sol et diminuer la propagation des maladies (Beard et Green, 1993). Le nombre d'espèces et variétés différentes est néanmoins limité afin de garantir une homogénéité visuelle de la pelouse. Le choix des espèces et variétés doit donc être très réfléchi et optimisé.

Les résultats de l'AMOVA mis en parallèle avec les résultats de l'algorithme bayésien pour  $K=12$  montrent de fortes similarités entre les cultivars suivants : Bighorn et Soilguard, Razor, Chantilly et Cindy Lou, PST4RUE et PST4BEN, et enfin, Marvel et Epic. Suite à cette étude, une préconisation pour les concepteurs de mélanges serait de ne pas associer deux variétés similaires de cette liste dans un même mélange puisque leur génétique est très proche.

De même, certaines variétés provenant de la même entreprise sont très proches génétiquement. Utiliser des variétés d'entreprises différentes serait donc une garantie pour obtenir une diversité maximale.

## **IV. PERSPECTIVES DE RECHERCHE**

### **A. APPLICATION DES EMPREINTES GENETIQUES POUR L'IDENTIFICATION DE VARIETES ET LA PROTECTION VARIETALE**

La protection variétale est obtenue en Europe par une COV (Certificat d'Obtention Végétale) délivré par l'UPOV (Union pour la Protection des Obtentions Végétales) et aux Etats-Unis par un PVP (Plant Variety Patent) par l'USDA (United States Department of Agriculture). Les deux certificats sont attribués après examen de critères de distinction, homogénéité et stabilité. Ces critères sont mesurés par observations phénotypiques sur plusieurs années en fonction des espèces.

Les outils moléculaires sont des outils très précis permettant de comparer et différencier les génotypes sans influence de l'environnement. L'utilisation de marqueurs SSR pourrait donc aider à l'examen de distinction et homogénéité lors de l'obtention de certificats



variétaux. Ces techniques ne sont pas encore utilisées par les organismes de protection variétale mais commencent à être développées par des entreprises de biologie moléculaire pour venir en aide aux sélectionneurs.

De plus, comme expliqué précédemment, les espèces et sous-espèces de fétuques fines sont très difficiles à différencier visuellement et il est impossible d'identifier des variétés par simple observation des caractères morphologiques. Les marqueurs SSR développés dans cette étude permettraient de comparer une variété inconnue à l'ensemble des variétés de cette étude. En fonction de sa position au sein de l'arbre phylogénétique, une estimation de la variété peut être donnée. En augmentant le nombre de variétés de fétuques rouges traçantes de cette étude, ce test peut être affiné et les résultats peuvent devenir très précis. Ainsi, les producteurs qui ne sont pas sûrs de l'identité d'une variété peuvent avoir une confirmation. De même, avant la protection d'une nouvelle variété, l'obteneur peut tester sa distinction génétique avec les variétés déjà existantes.

#### **B. DEVELOPPEMENT DE MARQUEURS POUR LES AUTRES ESPECES ET SOUS-ESPECES DE FETUQUES FINES**

La plupart des marqueurs (19) a pu être appliquée aux autres espèces de fétuque fine. Cependant, les électrophorèses sont moins nettes et des pics de faible amplification sont présents, entraînant une lecture et une interprétation plus ardues. De plus, les marqueurs n'ont été testés que sur quelques variétés de chaque espèce ou sous-espèce ; nous ne savons donc pas s'ils permettent de différencier des populations. Il serait intéressant de développer des marqueurs pour les fétuques durette ou gazonnante qui possèdent aussi de nombreuses propriétés prometteuses.

#### **BILAN**

L'utilisation de deux algorithmes différents a permis d'obtenir des résultats fiables, précis et en accord avec la généalogie des cultivars. Bien que de nouvelles méthodes de génotypage plus performantes se développent, les marqueurs SSR sont des outils très simples et rapides à utiliser, facilement applicables par les obtenteurs. Ainsi les résultats de cette étude peuvent être utilisés pour différencier les fétuques fines et aider au choix des variétés. Ils ont permis de mettre en évidence un manque de diversité du germplasma causé par des croisements réalisés entre les mêmes parents. Ils peuvent être utilisés pour de futurs travaux de recherche comme la mise en place d'empreintes génétiques pour l'identification voire la protection de variétés.





## CONCLUSION

---

L'industrie du gazon a une forte importance économique aux Etats-Unis. Les nombreuses espèces de graminées possèdent des propriétés différentes qui permettent de composer des mélanges adaptés à tous les besoins. La prise de conscience des impacts environnementaux négatifs des produits chimiques utilisés pour l'entretien des gazons ainsi que les nouvelles attentes des consommateurs et des producteurs mènent à l'apparition d'un nouveau marché : les gazons à faible entretien. Les graminées les plus communes sont (aux Etats-Unis) le pâturin des prés et le ray-grass anglais. Ces deux espèces procurent des pelouses très esthétiques mais aux besoins en fertilisants et arrosage très importants. Afin de satisfaire ce nouveau marché, le programme d'amélioration des espèces de gazon de Rutgers University décide d'étudier de nouvelles espèces telles que les fétuques fines. Elles présentent de bonnes performances dans les milieux pauvres, salins et secs. Certaines fétuques rouges traçantes possèdent des endophytes qui aident à supprimer les maladies du fil rouge et de la brûlure en plaque. Ces caractéristiques les rendent parfaitement adaptées aux gazons à faible entretien, bien que certains traits doivent faire l'objet d'un programme d'amélioration (rendement, résistance à d'autres maladies, *etc.*). Les récents progrès en sélection des plantes ont été permis entre autres par l'utilisation des biotechnologies comme les marqueurs moléculaires. Déjà appliquées au pâturin des prés et au ray-grass anglais, ces techniques ont prouvé leur efficacité et ont donc fait l'objet de cette étude pour la fétuque rouge traçante : création de marqueurs SSR et étude de diversité génétique sur 37 cultivars de fétuques fines.

22 marqueurs SSR polymorphes ont été testés sur 95 génotypes de fétuque rouge traçante puis utilisés sur 37 cultivars, chacun représenté par 16 individus. Une AMOVA a été réalisée sur la matrice binaire regroupant les 610 allèles obtenus. L'algorithme du Neighbor Joining a permis d'obtenir un arbre phylogénétique par le logiciel NTSYS. Enfin, l'algorithme bayésien a été utilisé pour déterminer la structure et le nombre optimal de populations par le logiciel STRUCTURE.

L'AMOVA a permis de révéler que certains couples de cultivars ne sont pas génétiquement distinguables et que la diversité de l'ensemble des individus testés est majoritairement due à une diversité intra-population. L'algorithme du Neighbor Joining et l'algorithme bayésien permettent de représenter les résultats et de les comparer aux pédigrées. Les cultivars sont regroupés soit en fonction de leur entreprise d'origine, soit en fonction de leur généalogie. Les espèces et sous-espèces de fétuque fine sont groupées en accord avec les études de taxonomie précédentes.

Bien que de nouvelles méthodes de génotypage plus performantes se développent, les marqueurs SSR sont des outils très simples et rapides à utiliser, facilement applicables par les obtenteurs. Ainsi les résultats de cette étude peuvent être utilisés pour différencier les fétuques fines et aider au choix des variétés. Ils ont permis de mettre en évidence un manque de diversité du germplasm causé par des croisements réalisés entre les mêmes parents. Ils peuvent être utilisés pour de futurs travaux de recherche comme la mise en place d'empreintes génétiques pour l'identification voire la protection de variétés.



## BIBLIOGRAPHIE

---

- Aiken, Susan Graham, Stephen J. Darbyshire, *et al.* *Fescue grasses of Canada*. Agriculture Canada, 1990. <http://www.cabdirect.org/abstracts/19900738508.html>.
- Beard, James B, et Robert L. Green. « The Role of Turfgrasses in Environmental Protection and Their Benefits to Humans. » *Journal of Environment Quality* 23, n° 3 (1994): 452.
- Beard, J. B. « Cool season turfgrasses. » *Turfgrass: Science and Culture*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1973, 54-131.
- Bonos, Stacy A., Bruce B. Clarke, et William A. Meyer. « Breeding for disease resistance in the major cool-season turfgrasses. » *Annu. Rev. Phytopathol.* 44 (2006): 213-34.
- Bonos, Stacy A., Melissa M. Wilson, William A. Meyer, et C. Reed Funk. « Suppression of red thread in fine fescues through endophyte-mediated resistance. » *Applied Turfgrass Science* 2, n° 1 (2005): 0-0.
- Brown, Rebecca Nelson, et Josef H. Gorres. « The use of soil amendments to improve survival of roadside grasses. » *HortScience* 46, n° 10 (2011): 1404-10.
- Brownstein, Michael J., John D. Carpten, et Jeffrey R. Smith. « Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. » *Biotechniques* 20, n° 6 (1996): 1004-6.
- Bruno, William J., Nicholas D. Socci, et Aaron L. Halpern. « Weighted neighbor joining: a likelihood-based approach to distance-based phylogeny reconstruction. » *Molecular Biology and Evolution* 17, n° 1 (2000): 189-97.
- Cai, Guohong, Clayton W. Leadbetter, Megan F. Muehlbauer, Thomas J. Molnar, et Bradley I. Hillman. « Genome-wide microsatellite identification in the fungus *Anisogramma anomala* using Illumina sequencing and genome assembly », 2013. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0082408>.
- Casler, Michael D., et Ronny R. Duncan. *Turfgrass Biology, Genetics, and Breeding*. John Wiley & Sons, 2003.
- Chen, X., S. Temnykh, Y. Xu, Y. G. Cho, et S. R. McCouch. « Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). » *Theoretical and Applied Genetics* 95, n° 4 (1997): 553-67.
- Clarke, Bruce B., James F. White Jr, Richard H. Hurley, Mónica S. Torres, S. Sun, et David R. Huff. « Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. » *Plant Disease* 90, n° 8 (2006): 994-98.
- Clayton, W. D., et S. A. Renvoize. « Genera Graminum. Grasses of the World. » 13 (1986): 389pp.
- Collard, B. C. Y., M. Z. Z. Jahufer, J. B. Brouwer, et E. C. K. Pang. « An Introduction to Markers, Quantitative Trait Loci (QTL) Mapping and Marker-Assisted Selection for Crop Improvement: The Basic Concepts. » *Euphytica* 142, n° 1-2 (janvier 2005): 169-96.
- von Cräutlein, Maria, Helena Korpelainen, Marjo Helander, Henry Väre, et Kari Saikkonen. « Development and characterization of chloroplast microsatellite markers in a fine-leaved fescue, *Festuca rubra* (Poaceae). » *Applications in plant sciences* 2, n° 12 (2014). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4259459/>.
- De Silva, H. N., A. J. Hall, E. Rikkerink, M. A. McNeilage, et L. G. Fraser. « Estimation of Allele Frequencies in Polyploids under Certain Patterns of Inheritance. » *Heredity* 95, n° 4 (10 août 2005): 327-34.
- Dockery, Douglas W., Frank E. Speizer, Daniel O. Stram, James H. Ware, John D. Spengler, et Benjamin G. Ferris Jr. « Effects of inhalable particles on respiratory health of children. » *American Review of Respiratory Disease* 139, n° 3 (1989): 587-94.
- Doyle, J. J., et J. L. Doyle. « CTAB DNA extraction in plants. » *Phytochem Bull* 19 (1987): 11-15.
- Earl, Dent A., et Bridgett M. vonHoldt. « STRUCTURE HARVESTER: A Website and Program for Visualizing STRUCTURE Output and Implementing the Evanno Method. » *Conservation Genetics Resources* 4, n° 2 (13 octobre 2011): 359-61.



- Elshire, Robert J., Jeffrey C. Glaubitz, Qi Sun, Jesse A. Poland, Ken Kawamoto, Edward S. Buckler, et Sharon E. Mitchell. « A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. » Édité par Laszlo Orban. *PLoS ONE* 6, n° 5 (4 mai 2011): e19379.
- Evanno, G., S. Regnaut, et J. Goudet. « Detecting the Number of Clusters of Individuals Using the Software Structure: A Simulation Study. » *Molecular Ecology* 14, n° 8 (1 juillet 2005): 2611-20.
- Excoffier, Laurent, Peter E. Smouse, et Joseph M. Quattro. « Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. » *Genetics* 131, n° 2 (1992): 479-91.
- Falush, Daniel, Matthew Stephens, et Jonathan K. Pritchard. « Inference of population structure using multi-locus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. » *Genetics* 164, n° 4 (2003): 1567-87.
- Felsenstein, Joseph. « Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. » *Evolution*, 1985, 783-91.
- Gaafar, Abdel-Rhman Z., Fahad Al-Qurainy, et Salim Khan. « Assessment of genetic diversity in the endangered populations of *Breonadia salicina* (Rubiaceae) growing in The Kingdom of Saudi Arabia using inter-simple sequence repeat markers. » *BMC genetics* 15, n° 1 (2014): 109.
- Giguère, Mélissa, Institut national de santé publique du Québec, Direction des risques biologiques et environnementaux et occupationnels. *Mesures de lutte aux îlots de chaleur urbains revue de littérature*. [Québec]. 2009. <http://collections.banq.qc.ca/ark:/52327/1943632>.
- Gupta, P. K., Rajeev K. Varshney, P. C. Sharma, et B. Ramesh. « Molecular markers and their applications in wheat breeding. » *Plant breeding* 118, n° 5 (1999): 369-90.
- Gyssels, Gwendolyn, Jean Poesen, E. Bochet, et Yong Li. « Impact of plant roots on the resistance of soils to erosion by water: a review. » *Progress in physical geography* 29, n° 2 (2005): 189-217.
- Hallberg, George R. « Pesticides pollution of groundwater in the humid United States. » *Agriculture, ecosystems & environment* 26, n° 3 (1989): 299-367.
- Haydu, John J. et Hodges, Alan W.. « Economic Impacts of the Turfgrass and Lawn care Industry in the United States », 30 juillet 2012. <http://edis.ifas.ufl.edu/fe632>.
- Honig, Josh A., Stacy A. Bonos, et William A. Meyer. « Isolation and characterization of 88 polymorphic microsatellite markers in Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.). » *HortScience* 45, n° 11 (2010): 1759-63.
- Honig, Joshua Andrew. « The use of molecular genetics tools to complement a traditional field based turfgrass breeding program. » Rutgers University-Graduate School-New Brunswick, 2011. <https://rucore.libraries.rutgers.edu/rutgers-lib/31099/>.
- Huff, David R., et Antonio J. Palazzo. « Fine fescue species determination by laser flow cytometry. » *Crop science* 38, n° 2 (1998): 445-50.
- Jenkin, T. J. « Interspecific and intergeneric hybrids in herbage grasses. » *Journal of Genetics* 53, n° 1 (1955): 100-104.
- Johnson-Cicalese, J., M. E. Secks, C. K. Lam, W. A. Meyer, J. A. Murphy, et F. C. Belanger. « Cross species inoculation of Chewings and strong creeping red fescues with fungal endophytes. » *Crop Science* 40, n° 5 (2000): 1485-89.
- Kalinowski, S. T. « How well do evolutionary trees describe genetic relationships among populations? » *Heredity* 102, n° 5 (2009): 506-13.
- Karataş, Dilek Değirmenci, Hüseyin Karataş, Valérie Laucou, Gölge Sarikamiş, Leila Riahi, Roberto Bacilieri, et Patrice This. « Genetic diversity of wild and cultivated grapevine accessions from southeast Turkey. » *Hereditas* 151, n° 4-5 (2014): 73-80.



- Kofler, R., C. Schlotterer, et T. Lelley. « SciRoKo: A New Tool for Whole Genome Microsatellite Search and Investigation. » *Bioinformatics* 23, n° 13 (1 juillet 2007): 1683-85.
- Koyro, H.-W. « Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). » *Environmental and Experimental Botany* 56, n° 2 (2006): 136-46.
- Krenitsky, E. C., M. J. Carroll, R. L. Hill, et J. M. Krouse. « Runoff and Sediment Losses from Natural and Man-Made Erosion Control Materials. » *Crop Science* 38, n° 4 (1998): 1042.
- Kubik, Christine, Mark Sawkins, William A. Meyer, et Brandon S. Gaut. « Genetic diversity in seven perennial ryegrass (L.) cultivars based on SSR markers. » *Crop Science* 41, n° 5 (2001): 1565-72.
- Laforteza, Raffaele, Giuseppe Carrus, Giovanni Sanesi, et Clive Davies. « Benefits and well-being perceived by people visiting green spaces in periods of heat stress. » *Urban Forestry & Urban Greening* 8, n° 2 (2009): 97-108.
- Lederbogen, Florian, Peter Kirsch, Leila Haddad, Fabian Streit, Heike Tost, Philipp Schuch, Stefan Wüst, et al. « City living and urban upbringing affect neural social stress processing in humans. » *Nature* 474, n° 7352 (2011): 498-501.
- Lee, Michael. « DNA markers and plant breeding programs. » *Advances in agronomy*, 1995. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19960068527>.
- LIAO, WAN-JIN, BI-RU ZHU, YAN-FEI ZENG, et DA-YONG ZHANG. « TETRA: an improved program for population genetic analysis of allotetraploid microsatellite data. » *Molecular Ecology Resources* 8, n° 6 (2008): 1260-62.
- Markgraf-Dannenberg, I. von. « *Festuca* L. » *Flora europaea* 5 (1980): 125-53.
- Markwith, S. H., D. J. Stewart, et J. L. Dyer. « TETRASAT: a program for the population analysis of allotetraploid microsatellite data. » *Molecular Ecology Notes* 6, n° 3 (2006): 586-89.
- Martini, Nicholas F., Kristen C. Nelson, Sarah E. Hobbie, et Lawrence A. Baker. « Why “feed the lawn”? Exploring the influences on residential turf grass fertilization in the Minneapolis- Saint Paul metropolitan area ». *Environment and Behavior* 47, n° 2 (2015): 158-83.
- Meyer, William A., et C. Reed Funk. « Progress and benefits to humanity from breeding cool-season grasses for turf. » *Contributions from Breeding Forage and Turf Grasses*, n° contributionsfr (1989): 31-48.
- Milesi, Cristina, Steven W. Running, Christopher D. Elvidge, John B. Dietz, Benjamin T. Tuttle, et Ramakrishna R. Nemani. « Mapping and Modeling the Biogeochemical Cycling of Turf Grasses in the United States. » *Environmental Management* 36, n° 3 (27 juillet 2005): 426-38.
- Miller, Kristen L. « STATE LAWS BANNING PHOSPHORUS FERTILIZER USE », 1 février 2012. <http://www.cga.ct.gov/2012/rpt/2012-R-0076.htm>.
- Mohammadi, S. A., et B. M. Prasanna. « Analysis of genetic diversity in crop plants—salient statistical tools and considerations. » *Crop Science* 43, n° 4 (2003): 1235-48.
- Nowosad, F. S., DE Newton Swales, et W. G. Dore. « The identification of certain native and naturalized hay and pasture species by their vegetative characters. Pasture studies IX. » *McGill Univ. Tech. Bull* 16 (1936).
- Oke, T. R., et H. A. Cleugh. « Urban heat storage derived as energy balance residuals. » *Boundary-Layer Meteorology* 39, n° 3 (1987): 233-45.
- Peakall, R. O. D., et Peter E. Smouse. « GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. » *Molecular ecology notes* 6, n° 1 (2006): 288-95.
- Pritchard, Jonathan K., Matthew Stephens, Noah A. Rosenberg, et Peter Donnelly. « Association mapping in structured populations. » *The American Journal of Human Genetics* 67, n° 1 (2000): 170-81.





- Qian, Wei, Song Ge, et D.-Y. Hong. « Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. » *Theoretical and Applied Genetics* 102, n° 2-3 (2001): 440-49.
- Qian, Yaling, Ronald F. Follett, et John M. Kimble. « Soil Organic Carbon Input from Urban Turfgrasses. » *Soil Science Society of America Journal* 74, n° 2 (2010): 366.
- Ribaut, J. M., M. Banziger, J. Betran, C. Jiang, G. O. Edmeades, K. Dreher, et D. Hoisington. « Use of molecular markers in plant breeding: drought tolerance improvement in tropical maize. » *Quantitative genetics, genomics, and plant breeding*, 2002, 85-99.
- Robbins, Paul, et Trevor Birkenholtz. « Turfgrass revolution: measuring the expansion of the American lawn. » *Land Use Policy* 20, n° 2 (avril 2003): 181-94.
- Rohlf, F. James. *NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Applied Biostatistics, 1992.
- Rozen, Steve, et Helen Skaletsky. « Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. » In *Bioinformatics methods and protocols*, 365-86. Springer, 1999. <http://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-192-2:365>.
- Ruemmele, Bridget A., Joseph K. Wipff, Leah Brillman, et Kenneth W. Hignight. « Fine-leaved *Festuca* species. » *Turfgrass biology, genetics, and breeding*. J. Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2003, 129-74.
- Saitou, Naruya, et Masatoshi Nei. « The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. » *Molecular biology and evolution* 4, n° 4 (1987): 406-25.
- Samouelian, Frank, et Valérie Gaudin. *Génétique moléculaire des plantes*. Editions Quae, 2009.
- Schuelke, Markus. « An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. » *Nature biotechnology* 18, n° 2 (2000): 233-34.
- Sokal, Robert R., et F. James Rohlf. « The Comparison of Dendrograms by Objective Methods. » *Taxon* 11, n° 2 (1 février 1962): 33-40.
- Stace, C. A., AKKA Al-Bermani, et M. J. Wilkinson. « The distinction between the *Festuca ovina* L. and *Festuca rubra* L. aggregates in the British Isles. » *Watsonia* 19, n° 2 (1992): 107-12.
- Takebayashi, Hideki, et Masakazu Moriyama. « Study on the Urban Heat Island Mitigation Effect Achieved by Converting to Grass-Covered Parking. » *Solar Energy* 83, n° 8 (août 2009): 1211-23.
- Teixeira, Helena, Susana Rodríguez-Echeverría, et Cristina Nabais. « Genetic diversity and differentiation of *Juniperus thurifera* in Spain and Morocco as determined by SSR. » *PloS one* 9, n° 2 (2014): e88996.
- Turgeon, ed. « Turfgrass species. » *Turfgrass Management*. Reston, VA: Reston Publishing, 1980, 41-94.
- Ulrich, Roger. « View through a window may influence recovery. » *Science* 224, n° 4647 (1984): 224-25.
- US Census Bureau Public Information. « Growth in Urban Population Outpaces Rest of Nation, Census Bureau Reports - 2010 Census - Newsroom - U.S. Census Bureau », 2010. [http://www.census.gov/newsroom/releases/archives/2010\\_census/cb12-50.html](http://www.census.gov/newsroom/releases/archives/2010_census/cb12-50.html).
- Voogt, James A., et Tim R. Oke. « Thermal remote sensing of urban climates. » *Remote sensing of environment* 86, n° 3 (2003): 370-84.
- Weir, Bruce S., et others. *Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, 1990. <http://www.cabdirect.org/abstracts/19900180990.html>.
- WILKINSON, MICHAEL J., et CLIVE A. STACE. « A new taxonomic treatment of the *Festuca ovina* L. aggregate (Poaceae) in the British Isles. » *Botanical journal of the Linnean Society* 106, n° 4 (1991): 347-97.
- Yue, Chengyan, Kari Hugie, et Eric Watkins. « Are consumers willing to pay more for low-input turfgrasses on residential lawns? Evidence from choice experiments. » *Journal of Agricultural and Applied Economics* 44, n° 04 (2012): 549-60.



- Yue, Q., J. Johnson-Cicalese, T. J. Gianfagna, et W. A. Meyer. « Alkaloid production and chinch bug resistance in endophyte-inoculated chewings and strong creeping red fescues. » *Journal of Chemical Ecology* 26, n° 1 (2000): 279-92.
- Zaurov, D. E., S. Bonos, J. A. Murphy, M. Richardson, et F. C. Belanger. « Endophyte infection can contribute to aluminum tolerance in fine fescues. » *Crop science* 41, n° 6 (2001): 1981-84.
- Zhang, Qi, Alan Zuk, et Kevin Rue. « Salinity tolerance of nine fine fescue cultivars compared to other cool-season turfgrasses. » *Scientia Horticulturae* 159 (2013): 67-71.
- Zhang, Y., M. A. R. Mian, et J. H. Bouton. « Recent molecular and genomic studies on stress tolerance of forage and turf grasses. » *Crop Science* 46, n° 2 (2006): 497-511.

## SITIOGRAPHIE

---

- Agreste. « conjinforap201505cult.pdf. » Consulté le 31 août 2015.  
<http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/conjinforap201505cult.pdf>
- AOSCA. « Seed Certification | Association of Official Seed Certifying Agencies. » Consulté le 7 août 2015. [http://www.aosca.org/page/Seed\\_Certification.aspx](http://www.aosca.org/page/Seed_Certification.aspx).
- Banque Mondiale de Données. « Population rural (% de la population totale) | Données | Tableau », 2014. Consulté le 7 août 2015.  
<http://donnees.banquemondiale.org/indicateur/SP.RUR.TOTL.ZS>.
- Elshire, Glaubitz, Sun, Harriman. ES Buckler, and SE Mitchell, « GBS\_Method\_Overview1.pdf. » Consulté le 26 août 2015. [http://cbsu.tc.cornell.edu/lab/doc/GBS\\_Method\\_Overview1.pdf](http://cbsu.tc.cornell.edu/lab/doc/GBS_Method_Overview1.pdf).
- European Commission, et European Soil Portal. « Soil Salinisation. » Consulté le 7 août 2015.  
<http://eusoiils.jrc.ec.europa.eu/library/themes/salinization/>.
- Flint, M. L., M. A. Harivandi, et H. K. Kaya. « UC IPM: Information about Turfgrass Species in Turfgrass », 2009. <http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r785900111.html>.
- GNIS. « Les surfaces en multiplication de semences en France par espèces. » Consulté le 31 août 2015. <http://www.gnis.fr/index/action/page/id/59/title/Les-surfaces-en-multiplication-par-especes---Recolte-2014>.
- GNIS Pédagogie. « Gazon : Introduction sur les graminées. » Consulté le 7 août 2015.  
<http://www.gnis-pedagogie.org/gazon-presentation-type-definition.html>.
- GNIS Pédagogie. « Les marqueurs moléculaires. » Consulté le 7 août 2015. <http://www.gnis-pedagogie.org/biotechnologie-amelioration-marqueur-moleculaire.html>.
- Govindasamy Ramu, Sullivan Kevin, Brennan Margaret, Puduri Venkata, Clarke Bruce, Adelaja Adesoji. « NJ Economic Survey Turf.pdf. » 2007. Consulté le 7 août 2015.  
<http://turf.rutgers.edu/outreach/econsurvexecsumfullreport.pdf>.
- Mason, Sandra. « Seed or Sod. Which is best? - The Homeowners Column - University of Illinois Extension serving Champaign, Ford, Iroquois and Vermilion Counties. » Consulté le 25 août 2015. <https://web.extension.illinois.edu/cfiv/homeowners/070420.html>.
- Massachusetts State. « Municipal Water Use Restrictions | MassDEP. » *Energy and Environmental Affairs*, 23 juillet 2015.  
<http://www.mass.gov/eea/agencies/massdep/water/watersheds/municipal-water-use-restrictions.html>.
- NTEP. « National Turfgrass Evaluation Program - Fine Fescue », 2008. <http://ntep.org/ff.htm>.
- Satista.com « Topic: Corn. » *www.statista.com*. Consulté le 7 août 2015.  
<http://www.statista.com/topics/986/corn/>.
- Tilley, Derek, et USDA. « RED FESCUE. » 2012. Consulté le 7 août 2015.  
[https://www.ga.nrcs.usda.gov/Internet/FSE\\_DOCUMENTS/nrcs144p2\\_046113.pdf](https://www.ga.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/nrcs144p2_046113.pdf).



UFS Semenciers. « Surface de gazon en France. » Consulté le 7 août 2015. <http://www.ufs-semenciers.org/lufsenaction/lessectionspar especes/Lists/pages/fourrageresetgazons.aspx>.

URI University of Rhode Island. « URI Nutrient Management Tools and Resources. » Consulté le 7 août 2015. <http://www.uri.edu/ce/healthylandscapes/urinmp.html>.

USDA. « USDA, 2012 Census of Agriculture. » Consulté le 7 août 2015. [http://www.agcensus.usda.gov/Publications/2012/Full\\_Report/Volume\\_1,\\_Chapter\\_1\\_US/usv1.pdf](http://www.agcensus.usda.gov/Publications/2012/Full_Report/Volume_1,_Chapter_1_US/usv1.pdf).

USDA, GRIN. « 46 Results for [FINE FESCUE]. » Consulté le 7 août 2015. [http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/swish/acboth?si=0&query=FINE+FESCUE&x=0&y=0&btnG=Go%21&filter=0&as\\_sitesearch=ars.usda.gov&ie=&output=xml\\_no\\_dtd&client=usda&lr=&proxystylesheet=ARS&oe=](http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/swish/acboth?si=0&query=FINE+FESCUE&x=0&y=0&btnG=Go%21&filter=0&as_sitesearch=ars.usda.gov&ie=&output=xml_no_dtd&client=usda&lr=&proxystylesheet=ARS&oe=).

VALHOR. « CiteVerte\_BienfaitsVegetalVille2014.pdf. » Consulté le 11 août 2015. [http://www.valhor.fr/fileadmin/A-Valhor/Valhor\\_PDF/CiteVerte\\_BienfaitsVegetalVille2014.pdf](http://www.valhor.fr/fileadmin/A-Valhor/Valhor_PDF/CiteVerte_BienfaitsVegetalVille2014.pdf).



## ANNEXE 1 : DETAILS DES RESULTATS DE SEQUENÇAGE ET D'IDENTIFICATION DE MARQUEURS SSR

---

Dinucleotidic SSRs					
Total SSRs					43872
Number of selected SSRs according to following criteria					16628
CRITERION: Minimal number of motif repeats					5
CRITERION: Minimum number of flanking nucleotides					300
Statistics	Motif	Counts	Average_Length	Average_Mismatches	Counts/Mbp
	AT	6182	12.55	0	22.36
	AG	4754	12.36	0	17.2
	AC	4748	11.67	0	17.18
	CG	944	10.59	0	3.41
Number of primers					13163

Trinucléotidic SSRs					
Total SSRs					29602
Number of selected SSRs according to following criteria					18121
CRITERION: Minimal number of motif repeats					4
CRITERION: Minimum number of flanking nucleotides					300
Statistics	Motif	Counts	Average_Length	Average_Mismatches	Counts/Mbp
	CCG	3580	13.16	0	12.95
	AAG	2502	14.22	0	9.05
	AGG	2202	13.6	0	7.97
	AGC	1884	13.44	0	6.82
	ATC	1692	13.73	0	6.12
	AAT	1613	14.89	0	5.83
	AAC	1576	14.58	0	5.7
	ACC	1389	13.42	0	5.02
	ACG	926	13.34	0	3.35
	ACT	757	13.73	0	2.74
Number of primers					14509

## ANNEX 2 : DÉTAILS DE L'AMOVA

Source	df	Sum of Squares	Mean Square	Estimated Variation	%
Among Pops	36	7053.879	195.941	10.227	24%
Within Pops	554	18056.142	32.592	32.592	76%
Total	590	25110.020		42.819	100%

Pop	Sum of Squares Within Population
4RUE	899.438
58545	463.063
58573	464.188
58708	461.688
58758	513.313
58785	305.313
Audubon	332.500
Azure	488.125
Beacon	361.375
BighornGT	751.875
Blueray	403.875
Boreal	328.267
Chantilly	407.125
Cindylou	508.750
Contender	513.625
DLFPS	352.688
Epic	484.063
Fairmont	468.625
Garnet	626.438
JF209	366.438
JF471	364.000
Kent	409.688
Lustrous	569.625
MarcoPolo	554.688
Marvel	456.688
Navigator2	523.063
OS2	542.375
PPGFRR111	357.063
PPGFRT101	446.500
PSG5RM	482.938
PST4BEN	682.500
PST4ED4	484.875
Razor	432.125
Reliant4	537.063
Rosecity	609.500
SeabreezeGT	399.875
Soilguard	702.813



## ANNEXE 3 : MATRICE DES DISTANCES PHIPT

	4RUE	58545	58573	58708	58758	58785	Audubon	Azure	Beacon	BighornGT
<b>4RUE</b>	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
<b>58545</b>	0.254	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
<b>58573</b>	0.210	0.238	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
<b>58708</b>	0.224	0.229	0.244	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
<b>58758</b>	0.260	0.271	0.212	0.250	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
<b>58785</b>	0.181	0.361	0.281	0.323	0.349	-	0.001	0.001	0.001	0.001
<b>Audubon</b>	0.139	0.336	0.299	0.316	0.342	0.253	-	0.001	0.001	0.001
<b>Azure</b>	0.299	0.361	0.307	0.319	0.299	0.393	0.406	-	0.001	0.001
<b>Beacon</b>	0.300	0.378	0.361	0.340	0.375	0.454	0.430	0.292	-	0.001
<b>BighornGT</b>	0.170	0.253	0.223	0.229	0.258	0.282	0.281	0.172	0.196	-
<b>Blueray</b>	0.288	0.370	0.351	0.347	0.383	0.440	0.427	0.296	0.104	0.206
<b>Boreal</b>	0.163	0.309	0.213	0.268	0.284	0.191	0.212	0.338	0.373	0.215
<b>Chantilly</b>	0.125	0.329	0.301	0.293	0.342	0.239	0.130	0.389	0.382	0.245
<b>Cindylou</b>	0.111	0.296	0.264	0.259	0.310	0.199	0.111	0.352	0.363	0.227
<b>Contender</b>	0.140	0.291	0.255	0.266	0.295	0.210	0.205	0.319	0.373	0.233
<b>DLFPS</b>	0.143	0.327	0.260	0.297	0.327	0.181	0.205	0.367	0.390	0.237
<b>Epic</b>	0.113	0.280	0.214	0.251	0.278	0.165	0.161	0.313	0.351	0.211
<b>Fairmont</b>	0.271	0.371	0.309	0.348	0.310	0.343	0.358	0.292	0.393	0.253
<b>Garnet</b>	0.115	0.218	0.241	0.189	0.273	0.157	0.184	0.314	0.335	0.199
<b>JF209</b>	0.133	0.293	0.230	0.284	0.300	0.129	0.165	0.361	0.402	0.234
<b>JF471</b>	0.137	0.321	0.276	0.305	0.327	0.173	0.138	0.371	0.425	0.264
<b>Kent</b>	0.111	0.309	0.236	0.280	0.292	0.152	0.153	0.338	0.384	0.234
<b>Lustrous</b>	0.128	0.303	0.261	0.262	0.298	0.202	0.196	0.328	0.371	0.242
<b>MarcoPolo</b>	0.215	0.293	0.266	0.249	0.278	0.310	0.253	0.179	0.269	0.156
<b>Marvel</b>	0.115	0.301	0.256	0.272	0.307	0.183	0.165	0.345	0.377	0.238
<b>Navigator2</b>	0.138	0.303	0.258	0.273	0.306	0.158	0.171	0.337	0.379	0.238
<b>OS2</b>	0.081	0.298	0.257	0.262	0.301	0.222	0.172	0.349	0.363	0.215
<b>PPGFRR111</b>	0.158	0.337	0.292	0.307	0.354	0.187	0.201	0.381	0.418	0.264
<b>PPGFRT101</b>	0.257	0.369	0.330	0.360	0.352	0.394	0.396	0.370	0.370	0.271
<b>PSG5RM</b>	0.135	0.307	0.271	0.277	0.307	0.200	0.199	0.356	0.385	0.242
<b>PST4BEN</b>	0.012	0.271	0.211	0.237	0.262	0.148	0.115	0.307	0.331	0.190
<b>PST4ED4</b>	0.129	0.326	0.298	0.304	0.356	0.247	0.247	0.390	0.383	0.262
<b>Razor</b>	0.127	0.316	0.293	0.285	0.338	0.245	0.142	0.387	0.395	0.258
<b>Reliant4</b>	0.251	0.269	0.300	0.237	0.303	0.338	0.346	0.227	0.241	0.162
<b>Rosecity</b>	0.153	0.239	0.246	0.199	0.294	0.210	0.222	0.326	0.344	0.214
<b>SeabreezeGT</b>	0.241	0.338	0.304	0.313	0.361	0.379	0.381	0.374	0.344	0.252
<b>Soilguard</b>	0.184	0.268	0.222	0.232	0.260	0.289	0.290	0.166	0.202	0.203

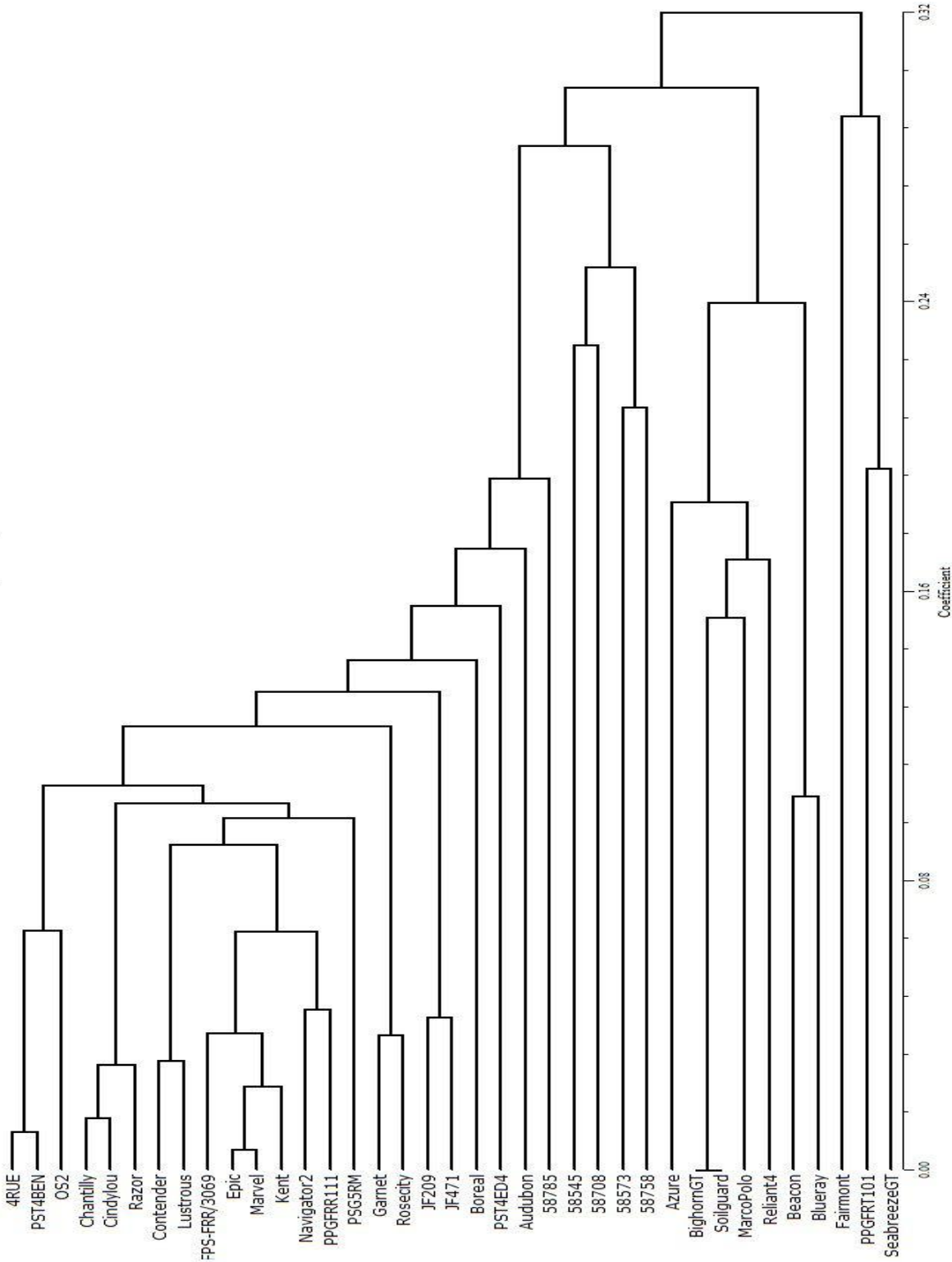
	Blueray	Boreal	Chantilly	Cindylou	Contender	DLFPS	Epic	Fairmont	Garnet
4RUE	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
58545	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
58573	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
58708	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
58758	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
58785	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Audubon	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Azure	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Beacon	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
BighornGT	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Blueray	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Boreal	0.364	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Chantilly	0.383	0.172	-	0.071	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Cindylou	0.361	0.153	0.015	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Contender	0.357	0.136	0.104	0.095	-	0.001	0.014	0.001	0.001
DLFPS	0.376	0.101	0.137	0.113	0.094	-	0.002	0.001	0.001
Epic	0.336	0.081	0.095	0.064	0.034	0.032	-	0.001	0.001
Fairmont	0.385	0.279	0.339	0.311	0.284	0.323	0.280	-	0.001
Garnet	0.315	0.163	0.123	0.115	0.112	0.139	0.106	0.300	-
JF209	0.377	0.136	0.177	0.151	0.143	0.109	0.091	0.306	0.114
JF471	0.403	0.177	0.175	0.148	0.155	0.159	0.090	0.344	0.112
Kent	0.363	0.119	0.123	0.097	0.088	0.044	0.027	0.286	0.115
Lustrous	0.357	0.166	0.132	0.122	0.031	0.131	0.073	0.304	0.122
MarcoPolo	0.268	0.241	0.239	0.211	0.241	0.268	0.221	0.264	0.227
Marvel	0.364	0.119	0.074	0.069	0.042	0.040	0.007	0.308	0.093
Navigator2	0.361	0.117	0.111	0.076	0.089	0.082	0.033	0.285	0.107
OS2	0.346	0.144	0.102	0.089	0.107	0.109	0.078	0.295	0.124
PPGFRR111	0.397	0.140	0.122	0.095	0.103	0.085	0.056	0.333	0.125
PPGFRT101	0.351	0.320	0.363	0.344	0.331	0.350	0.315	0.261	0.300
PSG5RM	0.364	0.148	0.139	0.099	0.103	0.105	0.073	0.325	0.121
PST4BEN	0.313	0.120	0.101	0.086	0.102	0.105	0.068	0.266	0.102
PST4ED4	0.347	0.215	0.166	0.161	0.165	0.168	0.121	0.367	0.149
Razor	0.387	0.166	0.021	0.039	0.083	0.128	0.080	0.353	0.123
Reliant4	0.236	0.292	0.311	0.278	0.280	0.301	0.258	0.344	0.211
Rosecity	0.321	0.176	0.151	0.143	0.106	0.150	0.102	0.311	0.038
SeabreezeGT	0.332	0.296	0.325	0.317	0.309	0.325	0.303	0.325	0.278
Soilguard	0.205	0.216	0.261	0.239	0.235	0.248	0.212	0.258	0.208

	JF209	JF471	Kent	Lustrous	MarcoPolo	Marvel	Navigator2	OS2	PPGFRR111
4RUE	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
58545	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
58573	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
58708	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
58758	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
58785	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Audubon	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Azure	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Beacon	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
BighornGT	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Blueray	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Boreal	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Chantilly	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Cindylou	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Contender	0.001	0.001	0.001	0.082	0.001	0.004	0.001	0.001	0.001
DLFPS	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Epic	0.001	0.001	0.001	0.009	0.001	0.228	0.001	0.001	0.001
Fairmont	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Garnet	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
JF209	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
JF471	0.043	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Kent	0.077	0.087	-	0.001	0.001	0.004	0.001	0.001	0.001
Lustrous	0.158	0.162	0.106	-	0.001	0.007	0.001	0.001	0.001
MarcoPolo	0.269	0.281	0.249	0.250	-	0.001	0.001	0.001	0.001
Marvel	0.097	0.112	0.022	0.066	0.247	-	0.001	0.001	0.001
Navigator2	0.106	0.102	0.067	0.116	0.248	0.046	-	0.001	0.001
OS2	0.163	0.162	0.101	0.135	0.257	0.082	0.085	-	0.001
PPGFRR111	0.140	0.150	0.101	0.150	0.279	0.066	0.045	0.118	-
PPGFRT101	0.334	0.365	0.326	0.339	0.323	0.341	0.318	0.313	0.369
PSG5RM	0.131	0.152	0.095	0.132	0.273	0.073	0.091	0.105	0.115
PST4BEN	0.094	0.099	0.061	0.093	0.213	0.073	0.094	0.053	0.119
PST4ED4	0.179	0.185	0.156	0.189	0.302	0.136	0.126	0.135	0.164
Razor	0.168	0.169	0.118	0.101	0.241	0.051	0.103	0.110	0.115
Reliant4	0.302	0.310	0.288	0.282	0.188	0.281	0.287	0.288	0.312
Rosecity	0.155	0.159	0.144	0.101	0.248	0.114	0.128	0.141	0.156
SeabreezeGT	0.315	0.360	0.317	0.322	0.316	0.316	0.307	0.280	0.344
Soilguard	0.248	0.271	0.237	0.242	0.152	0.242	0.243	0.221	0.276

	PPGFRT 101	PSG 5RM	PST 4BEN	PST 4ED4	Razor	Reliant4	Rosecity	Seabreeze GT	Soilguard
4RUE	0.001	0.001	0.239	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
58545	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
58573	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
58708	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
58758	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
58785	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Audubon	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Azure	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Beacon	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
BighornGT	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.417
Blueray	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Boreal	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Chantilly	0.001	0.001	0.001	0.001	0.022	0.001	0.001	0.001	0.001
Cindylou	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Contender	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
DLFPS	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Epic	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Fairmont	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Garnet	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.004	0.001	0.001
JF209	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
JF471	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Kent	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Lustrous	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	0.003	0.001	0.001
MarcoPolo	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Marvel	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Navigator2	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
OS2	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
PPGFRR111	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
PPGFRT101	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
PSG5RM	0.336	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
PST4BEN	0.259	0.103	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
PST4ED4	0.290	0.160	0.103	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Razor	0.372	0.121	0.092	0.170	-	0.001	0.001	0.001	0.001
Reliant4	0.348	0.302	0.256	0.315	0.313	-	0.001	0.001	0.001
Rosecity	0.320	0.129	0.127	0.168	0.127	0.226	-	0.001	0.001
SeabreezeGT	0.195	0.324	0.244	0.258	0.339	0.343	0.294	-	0.001
Soilguard	0.275	0.253	0.195	0.275	0.266	0.160	0.225	0.260	-

ANNEXE 4 : ARBRE UPGMA

Fine Fescue Diversity Study Tree 2015





	<p><b>Diplôme</b> : Ingénieur  <b>Spécialité</b> : Horticulture  <b>Spécialisation / option</b> : Horticulture Ornementale et VALorisation  <b>Enseignant référent</b> : Vanessa SOUFFLET-FRESLON</p>
<p><b>Auteur(s)</b> : Mélodie Vivès</p>	<p><b>Organisme d'accueil</b> : Rutgers University – Department of Plant Biology and Pathology</p>
<p><b>Date de naissance*</b> : 24-07-1992</p>	<p><b>Adresse</b> : Foran Hall/ Cook Campus 59 Dudley Rd</p>
<p><b>Nb pages</b> : 39</p>	<p>New Brunswick, NJ 08901, USA</p>
<p><b>Annexe(s)</b> : 4</p>	<p><b>Maître de stage</b> : Dr. Stacy Bonos</p>
<p><b>Année de soutenance</b> : 2015</p>	
<p><b>Titre français</b> : Création et caractérisation de marqueurs SSR pour la féтуque rouge traçante - <i>Festuca rubra</i> subsp. <i>rubra</i> – et étude de diversité génétique.</p>	
<p><b>Titre anglais</b> : SSR marker design and characterization for strong creeping red fescue - <i>Festuca rubra</i> subsp. <i>rubra</i> – and genetic diversity study.</p>	
<p><b>Résumé :</b></p>	
<p>La prise de conscience des impacts environnementaux négatifs des produits chimiques utilisés pour l'entretien des gazons ainsi que les nouvelles attentes des consommateurs et des producteurs mènent à l'apparition d'un nouveau marché : les gazons à faible entretien. Du fait de son adaptation aux milieux pauvres, salins et secs, la féтуque rouge traçante, <i>Festuca rubra</i> subsp. <i>rubra</i>, correspond parfaitement aux critères des gazons à faible entretien. Cette étude a pour objectifs d'appliquer les techniques moléculaires à cette sous-espèce. 22 marqueurs SSR polymorphes ont été testés sur 95 génotypes de féтуque rouge traçante puis utilisés sur 37 cultivars de féтуques fines. Une AMOVA a été réalisée sur la matrice binaire regroupant les 610 allèles obtenus. L'algorithme du Neighbor Joining a permis d'obtenir un arbre phylogénétique par le logiciel NTSYS. Enfin, l'algorithme bayésien a été utilisé pour déterminer la structure et le nombre optimal de populations par le logiciel STRUCTURE. Les résultats ont mis en évidence des couples de cultivars identiques et une variance intra-population de 76%, montrant un manque de diversité du germplasm. Les résultats de cette étude peuvent être utilisés pour différencier les féтуques fines et aider au choix des variétés. Ils peuvent être utilisés pour la mise en place d'empreintes génétiques pour l'identification voire la protection de variétés.</p>	
<p><b>Abstract:</b></p>	
<p>Turfgrass is a very important industry in the US. Awareness of the negative impacts of chemicals used for lawn maintenance as well as new customers and growers expectations, led to a new market: low-maintenance and low-input lawns. Because of its adaptation to poor, saline and dry environments, strong creeping red fescue, <i>Festuca rubra</i> subsp. <i>rubra</i>, perfectly matches low-maintenance requirements. This study aims at applying molecular techniques to this sub-species. 22 polymorphic SSR markers were tested on 95 strong creeping red fescue genotypes and then used on 37 fine fescue cultivars. AMOVA was realized on the binary matrix gathering the 610 obtained alleles. Neighbor Joining algorithm enabled us to build a phylogenetic tree <i>via</i> NTSYS software. Finally, bayesian algorithm was used to determine the structure and the most parsimonious number of populations <i>via</i> STRUCTURE software. Results revealed genetically identical cultivars and within-population variance of 76%, showing low germplasm diversity. Results obtained in this study can be used to differentiate fine fescues and help seed mixture designers choose the most efficient combination of varieties. Future research involves the use of fingerprinting for plant variety identification and protection.</p>	
<p><b>Mots-clés</b> : SSR, Féтуques fines, AMOVA, Neighbor Joining, Algorithme bayésien, Amélioration gazon  <b>Key Words</b>: SSR, Fine fescues, AMOVA, Neighbor Joining, Bayesian algorithm, Turfgrass breeding</p>	

\* Élément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires