

1.2 KARINE HENRY-BOUNAN¹, BRIGITTE MANGIN², FLORIAN SANDRON²,
BRIGITTE DEVAUX¹, VALERIE LAURENT¹, PIERRE DEVAUX¹

¹Florimond Desprez Veuve & Fils SAS, BP41, 3, Rue Florimond Desprez, F – 59242
Cappelle-en-Pévèle

²Institut National de la Recherche Agronomique, BIA Unit, 24, BP52627, Chemin de
Borde Rouge, F – 31326 Castanet-Tolosan Cedex

GENETIC DIVERSITY AMONG CULTIVATED AND WILD SPECIES ACCESSIONS OF SUGAR BEET (*BETA VULGARIS* L.) BASED ON SNP AND DArT MARKERS: MOLECULAR AND ECOGEOGRAPHICAL ANALYSES AND LINKAGE MAP BUILDING

ABSTRACT

Wild species usually exhibit large genetic variability which serves as a resource for adaptability to changing environments. In contrast, cultivated plants display less genetic variability, as a result of the genetic bottlenecks occurring during domestication process. Thus wild species related to cultivated crops represent interesting sources of genetic variation, through the introgression of new and better performing alleles. Molecular markers and development of statistical techniques to analyze such data, allow the analyzes of genetic structure in several species. There exist around 10,000 accessions of wild beets and other related *Beta vulgaris* species currently stored in seed genebanks, worldwide. In the frame of the program AKER, a core subset of 2,600 accessions has been settled according to geographical and species diversity. We used Diversity Array Technology (DArT), and SNP markers for application in genetic studies of this core subset (*Beta vulgaris* and other *Beta* species from genepool I). DArT is a microarray based marker system that achieves high throughput by reducing the complexity of the genome. A DArT chip has recently been developed in Australia: genomic representation of a mixture of 2,246 accessions from genus *Beta* and collected all around the world was produced after PstI/TaqI digestion and spotted on microarray slides. We genotyped 2,590 accessions, including 39 *Beta macrocarpa*, 990 *Beta maritima*, 4 *Beta adanensis*, 2,200 *Beta vulgaris*, using the newly developed chip, and in-house SNP markers. 3,600 polymorphic DArT markers and 379 SNPs were selected and used for a phylogenetic analysis. The genetic relationship of the 2,590 accessions was investigated using different software (DARWIN, GenAlex, Adegnet package...) with the following methods: AFT, PCA, unweighted pair-group method, arithmetic average (UPGMA), neighbor joining (NJ). The population structure among all accessions was also evaluated with STRUCTURE 2.3.3 using an admixture model with no linkage. Cluster and principal coordinate analysis located accessions in 4 groups, and cultivated varieties (sugar beets but also fodder and garden beets) were obviously separated from the wild accessions. Different subgroups have been also identified in wild accessions, mainly according to species differentiation. DArT markers were also mapped in a new doubled haploid population comprising 150 lines from a cross between 2 lines of *Beta vulgaris vulgaris*. Linkage groups were assigned on the basis of previously mapped single nucleotide polymorphism (SNP). The map consisted of 1,450 DArT and SNP markers, and spanned 1,651 cM. Our results demonstrate that DArT markers are suitable for genetic diversity analysis and linkage map construction in sugar beet.

**DIVERSITE GENETIQUE AU SEIN DES BETTERAVES CULTIVEES ET SAUVAGES
(*BETA VULGARIS* L.) BASEE SUR L'ANALYSE DE MARQUEURS SNP ET DART :
ANALYSES DE DONNEES ECO-GEOGRAPHIQUES ET MOLECULAIRES ET
CONSTRUCTION DE CARTES**

RÉSUMÉ

Les espèces sauvages présentent généralement une grande variabilité génétique qui peut servir de ressource pour une capacité d'adaptation à différents environnements. En revanche, les plantes cultivées présentent moins de variabilité génétique en raison des goulots d'étranglement génétiques qui se produisent pendant le processus de domestication. Ainsi, les espèces sauvages apparentées aux plantes cultivées représentent des sources intéressantes de variation génétique, permettant l'introgression d'allèles nouveaux et plus performants. Les marqueurs et le développement de techniques statistiques pour analyser les données moléculaires, permettent l'analyse de la structure génétique des espèces. Il existe environ 10.000 entrées (accessions) de betteraves sauvages et d'autres espèces proches de *Beta vulgaris* actuellement stockées dans les banques de gènes du monde entier. Dans le cadre du programme AKER, un sous-ensemble de référence de 2600 entrées a été formé tenant compte de la diversité géographique et de l'espèce. Nous avons utilisé les marqueurs issus des technologies Diversity Array Technology (DART), et Single Nucleotide Polymorphism (SNP) pour les études génétiques de cette collection de référence (*Beta vulgaris* et d'autres espèces de Beta pool génétique I). Les DART sont un système de marquage basé sur puce à ADN qui permet d'obtenir un débit élevé, en réduisant la complexité du génome. Une puce de DART a récemment été mise au point en Australie : une représentation génomique d'un mélange de 2.246 entrées (du genre Beta et recueillies dans le monde entier) a été produite après digestion enzymatique (Pst/TagI) et placée sur une puce ADN (lames microarray). Nous avons génotypé 2.590 entrées, dont 39 *Beta macrocarpa*, 990 *Beta maritima*, 4 *Beta adanensis*, 2.200 *Beta vulgaris*, en utilisant cette nouvelle puce, ainsi que des marqueurs SNP internes. 3.600 marqueurs polymorphes DART et 379 SNP ont alors été sélectionnés et utilisés pour une analyse phylogénétique. Les relations génétiques des 2.590 entrées a été étudiée en utilisant différents logiciels (Darwin, Genalex, Adegnet...) avec les méthodes suivantes: AFT, PCA, arbres phylogénétiques basés sur des comparaisons par paires UPGMA, et/ou tenant compte des différentes vitesses d'évolution entre les branches NJ). La structuration des entrées a également été évaluée avec le logiciel Structure 2.3.3 sur un modèle en mélange, sans lien. Suite aux regroupements réalisés grâce aux analyses en composantes principales, il a été mis en évidence une séparation claire en 4 différents groupes d'entrées, avec une forte distinction des variétés cultivées (betteraves sucrières, mais aussi fourragères et potagères) des betteraves sauvages. Différents sous-groupes ont été également identifiés au sein des entrées sauvages, principalement sur la base de la spéciation. Les marqueurs DART ont également été cartographiés dans une nouvelle population comprenant 150 haploïdes doublés issus d'un croisement entre 2 lignées de *Beta vulgaris vulgaris*. Les groupes de liaison ont été attribués grâce à la cartographie SNP déjà disponible en interne. La carte est composée de 1.450 marqueurs DART et SNP, et s'étend sur 1651 cM. Nos résultats démontrent que les marqueurs DART sont bien adaptés à l'analyse de la diversité génétique et à la construction d'une carte génétique de betterave à sucre.

GENETISCHE DIVERSITÄT BEI ZUCHT- UND WILDFORMEN DER ZUCKERRÜBE (*BETA VULGARIS* L.) AUF BASIS VON SNP UND DART MARKERN: ANALYSE DER ÖKOGEOGRAPHISCHEN UND MOLEKULAREN GRUNDLAGEN UND ERSTELLUNG EINER KOPPLUNGSKARTE

KURZFASSUNG

Wildarten weisen in der Regel große genetische Variabilität auf, die als Ressource für die Anpassungsfähigkeit an sich ändernde Umgebungen dient. Im Gegensatz dazu zeigen Kulturpflanzen weniger genetische Variabilität. Diese Verringerung tritt während des Prozesses der Domestizierung auf. Daher stellen wild lebender Arten in Bezug auf Kulturpflanzen interessante Quellen genetischer Variation dar und bieten die Möglichkeit der Einkreuzung neuer und leistungsfähigerer Allele. Molekulare Marker und Entwicklung statistischer Techniken zur Analyse solcher Daten erlauben die Analyse der genetischen Strukturen in mehrere Arten. Aktuell wird weltweit Saatgut von rund 10.000 Einträgen (accessions) von Wildrüben und anderen verwandten *Beta vulgaris*-Arten in Genbanken gelagert. Im Rahmen des Programms AKER wurde eine zentrale Teilmenge von 2600 Einträgen zusammengestellt, die die geographische Herkunft und Artenvielfalt berücksichtigen. Für die genetischen Untersuchungen dieses Hauptteilsatzes (*Beta vulgaris* und andere Arten des Beta Genpool I) verwendeten wir die Diversity Array Technology (DART) und Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-Marker. DART ist ein Mikroarray-basiertes Marker-System, das einen hohen Durchsatz erzielt, indem die Komplexität des Genoms reduziert wird. Ein DART-Chip ist kürzlich in Australien entwickelt worden: eine genomische Darstellung einer Mischung aus 2246 Akzessionen der Gattung *Beta* aus der ganzen Welt wurde nach enzymatischer Verdauung (PstI / TaqI) produziert und auf einem Mikroarray-Slide entdeckt. Wir genotypisierten 2590 Einträge (darunter 39 *Beta macrocarpa*, 990 *Beta maritima*, 4 *Beta adanensis*, 2200 *Beta vulgaris*) mit dem neu entwickelten Chip und in-house SNP-Markern. 3600 polymorphe DART und 379 SNPs wurden für eine phylogenetische Analyse ausgewählt. Die genetische Verwandtschaft von 2590 Einträgen wurde unter Verwendung unterschiedlicher Software (Darwin, Genalex, Adegenet...) mit den folgenden Methoden untersucht: AFT, PCA, phylogenetische Stammbäume auf Basis paarweiser Vergleiche (UPGMA) und/oder unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Evolutionsgeschwindigkeit zwischen den Zweigen (NJ). Die Populationsstruktur aller Einträge wurde zudem mit Structure 2.3.3 unter Zuhilfenahme eines Modell-Gemischs ohne Linkage ausgewertet. Eine Cluster- sowie Hauptkomponentenanalyse zeigte eine klare Trennung in vier verschiedene Gruppen. Zuchtformen (Zuckerrüben, aber auch Futter- und Gartenrüben) waren deutlich von Wildrüben getrennt. Untergruppen wurden auch innerhalb der Wildarten identifiziert, vor allem auf Grundlage der Artbildung. DART-Marker wurden auch in einer neuen doppelhaploiden Population mit 150 Linien aus einer Kreuzung zwischen zwei *Beta vulgaris vulgaris*-Linien abgebildet. Linkage-Gruppen wurden auf Grundlage der zuvor abgebildeten SNP-Karte zugeordnet. Die Karte bestand aus 1450 DART und SNP-Marker und überspannt 1651 cM. Unsere Ergebnisse zeigen, dass DART Marker zur Analyse der genetischen Vielfalt und Erstellung von Linkage-Karten in Zuckerrüben geeignet sind.