



HAL
open science

Progrès génétique et maintien de la variabilité génétique : sont-ils incompatibles ? Le cas du ray-grass anglais au travers de 40 ans d'amélioration de variétés fourragères et à gazon

Marc M. Ghesquière, Philippe P. Barre, Gilles Boutet, Isabelle I. Cameleyre,
Chrystel Gibelin-Viala Gibelin, Jean-Baptiste J.-B. Pierre, Jean Paul J. P.
Sampoux

► To cite this version:

Marc M. Ghesquière, Philippe P. Barre, Gilles Boutet, Isabelle I. Cameleyre, Chrystel Gibelin-Viala Gibelin, et al.. Progrès génétique et maintien de la variabilité génétique : sont-ils incompatibles ? Le cas du ray-grass anglais au travers de 40 ans d'amélioration de variétés fourragères et à gazon. Innovations Agronomiques, 2013, 27, pp.123-137. 10.17180/0ny5-j742 . hal-00964443

HAL Id: hal-00964443

<https://hal.science/hal-00964443>

Submitted on 28 May 2020

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License

Progrès génétique et maintien de la variabilité génétique : sont-ils incompatibles ? Le cas du ray-grass anglais au travers de 40 ans d'amélioration de variétés fourragères et à gazon.

Ghesquière M.¹, Barre P.¹, Boutet G.^{2,3}, Cameleyre I.^{1,4}, Gibelin C.^{1,5}, Pierre J.B.^{1,6}, Sampoux J.P.¹

¹ INRA, Unité de Recherche Pluridisciplinaire Prairies et Plantes Fourragères, Le Chêne, RD 150, BP 80006, 86600 Lusignan

² INRA, UMR 1095, Génétique, Diversité & Ecophysiologie des Céréales, Plate-forme de Génotypage et Séquençage GENTYANE, Site de Crouël, 234 avenue du Brézet, 63100 Clermont-Ferrand

³ INRA, Institut de Génétique Environnement et Protection des Plantes, Plateforme de Séquençage - Génotypage Ouest Genopole, Domaine de la Motte au Vicomte, BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex

⁴ Biopôle Santé, 4 rue Carol Heitz, 86000 Poitiers

⁵ UMR CNRS / INRA 2594/441, Interactions Plantes – Microorganismes, Chemin de Borde-Rouge, BP 52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex

⁶ ARVALIS – Institut du Végétal, Pôle Variétés, semences et génétique, 91720 Boigneville

Correspondance : Marc.Ghesquiere@lusignan.inra.fr

Résumé

Le ray-grass anglais est l'espèce de graminées la plus communément cultivée en Europe avec cette particularité d'une double utilisation, en tant que fourrage à destination des ruminants et comme gazon pour la couverture du sol et à des fins esthétiques. L'amélioration de cette espèce n'a débuté significativement que très progressivement dans les années 1950 avec le développement d'objectifs de sélection spécifiques pour une utilisation en gazon encore plus tardivement vers la fin des années 1960. Une évaluation sous les deux modes d'utilisation a été entreprise de 2006 à 2008 au travers de 14 essais conduits dans le réseau de l'Association des Créateurs de Variétés Fourragères (ACVF) et de 61 populations spontanées ou variétés inscrites entre 1974 et 2004 dont 32 au catalogue français des variétés à gazon et 14 à celui des variétés fourragères. L'évaluation phénotypique a été également complétée par deux essais de production de semences. Parallèlement, l'ensemble de la collection a été génotypé à l'aide de 16 marqueurs moléculaires PCR¹-spécifiques après un tri de polymorphisme et de portabilité sur séquenceur parmi 197 marqueurs publics de différentes natures et disponibles en 2005. Les résultats montrent l'émergence d'une différenciation phénotypique marquée désormais entre les deux types sur les caractères de morphologie foliaire, de productivité et de valeur alimentaire tandis que les deux directions de sélection convergent vers une meilleure tolérance aux maladies et l'élimination de caractères de la reproduction sexuée défavorables comme l'alternativité et la remontaison en été. Cependant, aucun impact du processus de sélection variétale n'a été mis en évidence sur la productivité grainière, toujours caractérisée par une extrême variabilité entre variétés quelles qu'elles soient. Au plan moléculaire, la différenciation génétique entre fourrage et gazon ne se développe que très lentement devant la différenciation entre variétés au sein de chaque type, désormais significativement supérieure à celle entre populations naturelles. L'amélioration du ray-grass anglais au travers de sélections récurrentes, de variétés synthétiques et du fonctionnement des catalogues illustre ainsi un système collectif particulièrement efficace pour réaliser un progrès génétique régulier tout en limitant l'érosion de la diversité génétique de l'espèce.

Mots-clés: *Lolium perenne* – marqueurs microsatellites – variétés synthétiques – amélioration génétique – différenciation entre populations.

¹ PCR Polymerase Chain Reaction

Abstract: Is long term genetic progress friendly with safeguarding genetic variability: a case study in perennial rye-grass through 40 years of breeding between forage and turf varieties.

Perennial ryegrass is the most commonly used grass species in Europe with this unique feature of a contrasting utilization either as forage for ruminants or turf for ground covering, sport use and aesthetic purposes. Breeding varieties progressively developed only in the '50s while turf-specific objectives of selection emerged by the end of '60s. A global assessment under both managements of 61 natural populations or cultivars registered between 1974 and 2004, of which 32 as turf and 18 as forage was thus carried out from 2006 to 2008 through 14 trials all over the French Forage Breeder Association (ACVF) network. The phenotypic evaluation was completed with two trials of seed production. Finally, the whole collection of varieties was genotyped by using a set of 16 PCR-specific molecular markers following a screening of polymorphism and transferability to sequence analyser among 197 various markers publicly available in 2005. The results show a quite strong phenotypic differentiation between present cultivars of both types in respect with leaf morphogenesis, productivity and feeding value traits while both ways of selection converge towards to higher disease tolerance and eradication of unfavourable reproductive traits as first-year flowering and after-math heading. However, breeding mostly on vegetative traits was not found to impact significantly on seed productivity which remains of considerable high variability between varieties whatever type. By contrast, the genetic differentiation between forage and turf-type documented by molecular markers developed only very slowly regarding differentiation within type, currently higher than between natural populations. Thus, breeding perennial ryegrass through recurrent selection, synthetic varieties and promoting by recommended lists illustrates a particularly effective collective system to achieve a continuous genetic progress while preserving genetic erosion.

Keywords: *Lolium perenne* – SSR² markers – synthetic varieties – genetic improvement – population differentiation

Introduction

Les graminées pérennes (*Poaceae*) représentent une énorme ressource de diversité génétique en espèces et complexes d'espèces polyploïdes inter-fertiles, et pour des utilisations aussi diverses que la production fourragère en prairie temporaire, la protection des sols pour des aspects environnementaux, jusqu'à des usages très spécifiques en gazon sportif ou d'agrément. Si la disponibilité semble illimitée, elle n'en pose pas moins question à l'amélioration une fois les principaux genres botaniques retenus, *Lolium* sp., *Dactylis* sp., *Festuca* sp. Cette question d'efficacité de la création variétale pour assurer un progrès génétique continu en direction des utilisateurs concerne néanmoins toutes les espèces cultivées ; depuis quelques années, l'amélioration se trouve aussi devant la perspective d'un profond renouvellement des méthodes de sélection avec le développement des outils de la biologie moléculaire.

Dans ce contexte, la situation des graminées pérennes reste particulière au sens où la biologie de la plante contraint plus fortement que chez les autres espèces le processus de sélection :

1- La pérennité des plantes conduit à une évaluation phénotypique complexe chez ces espèces. Celle-ci ne peut être que multi-caractère en intégrant, entre-autres, la diversité des usages (fauche vs pâturage pour les fourrages) ou la saisonnalité des contraintes abiotiques (faibles au printemps vs limitantes en été), sources d'autant d'interactions génétique x environnement *s.l.*, mais non toujours aussi clairement identifiées et souvent à effet majeur devant les effets génétiques *s.s.* (Charmet et al 1990).

² SSR Single Sequence Repeat

2- Un régime de reproduction allogame mais non maîtrisé ne permet de produire que des familles demi-frères. De plus, de faibles disponibilités en semences jointes à la lourdeur des dispositifs expérimentaux en parcelle ne permettent que difficilement une sélection familiale, précoce, et surtout en conditions de peuplement dense qui sont la réalité fonctionnelle de l'utilisation des graminées pérennes, prairie ou gazon. Pour finir, les contraintes du régime de reproduction conduisent à ne diffuser les variétés fourragères et à gazon que sous forme de variétés synthétiques, c'est-à-dire sans atteindre l'homogénéité génétique. Gallais (1992) soulignait déjà ce mauvais compromis de la variété synthétique en termes d'efficacité de la sélection et vis-à-vis duquel, à défaut d'être une étape transitoire vers des variétés hybrides F1, la sélection de populations lui semblait plus pertinente.

Ainsi, malgré les efforts soutenus des sélectionneurs, le relais vers les utilisateurs assuré par le GNIS et le levier que constitue le CTPS pour valoriser le progrès génétique, il devenait de plus en plus fréquent dans les années 2000 d'avoir à rappeler la réalité du progrès variétal chez les espèces fourragères, au même titre que chez les autres espèces cultivées (Tabel et Allert, 2005). Cependant, basé sur des comparaisons relatives sur plusieurs années et à témoin non constant, le calcul du progrès génétique moyen à partir des données du GEVES ne constituait pas une preuve aussi concluante qu'un réseau d'essais multilocal comparant un ensemble de variétés, ayant été inscrites sous les procédures d'un même catalogue et sur un long pas de temps. C'est ce qui a été entrepris à l'occasion d'un projet conduit par l'ACVF et soutenu par le Ministère en charge de l'Agriculture de 2006 à 2008 et dont cet article rapporte les principaux résultats. Le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) a été choisi pour faire l'objet de cette étude en raison de son importance majeure en Europe, première espèce en volume de semences commercialisées. Une diversification d'utilisation, bien distincte désormais entre variétés fourragères et à gazon, et un niveau chromosomique diploïde ($2n=2x=14$) en faisaient également un bon modèle pour aborder ces questions de progrès génétique et de différenciation entre variétés.

Il était intéressant aussi de coupler cette approche phénotypique par une approche génétique à l'aide de marqueurs moléculaires pour évaluer l'impact de la création variétale à ce niveau de la variabilité génétique. L'utilisation de marqueurs génétiques a débuté dans les années 70 avec les études du polymorphisme protéique et enzymatique. Chez le ray-grass, les marqueurs isoenzymatiques ont été ainsi appliqués à la distinction variétale (Greneche et al, 1991) et l'analyse de la diversité au sein de larges collections. Charmet et al (1993) montraient déjà la faible structuration entre populations ($F_{ST} = 0.054$) parmi les 550 écotypes de ray-grass anglais prospectés en France de 1983 à 1984 par l'ACVF. Le développement des marqueurs s'est ensuite considérablement diversifié suivant la nature du polymorphisme révélé et les objectifs de recherche, grâce notamment aux nouvelles techniques d'amplification spécifique de l'ADN par PCR ; citons, entre autres et pour ce qui concerne le ray-grass : les marqueurs RAPD³ (Bolaric et al, 2005a et 2005b), AFLP⁴ (Bert et al, 1999), STS⁵ (Lem et Lallemand, 2003), cpDNA⁶ (Balfourier et al, 2000), RFLP⁷ et TAS⁸ (Inoue et al, 2004a).

Néanmoins, ces marqueurs présentaient tous, à des degrés divers, des limites techniques (reproductibilité, nombre, polymorphisme...) ou d'interprétation (hérédité, ADN codant ou non, ...) qui incitaient à développer une nouvelle génération de marqueurs. Les marqueurs microsatellites (ou SSR), dispersés de façon très dense sur l'ensemble du génome des êtres vivants y compris au sein des gènes, correspondaient à cette attente. Ils consistent en la répétition, en nombre variable, d'un motif élémentaire de bases nucléotidiques (3 le plus souvent) sur l'ADN nucléaire ou des organites cellulaires; si l'on dispose de la séquence des paires d'amorces permettant d'amplifier spécifiquement le fragment d'ADN dans lequel est inséré le locus microsatellite, puis de détecter le polymorphisme de

³ RAPD Random Amplification of Polymorphic DNA

⁴ AFLP Amplified Fragment Length Polymorphism

⁵ STS Sequence-Tagged Site

⁶ cpDNA Chloroplast DNA

⁷ RFLP Restriction Fragment Length Polymorphism

⁸ TAS Telomeric Repeat Associated Sequence

taille dû au nombre de répétitions du motif, on dispose d'un système de marquage idéal, en nombre illimité et à nombreux allèles à hérédité co-dominante. A l'époque de la préparation du projet en 2005, de premières publications commençaient à rapporter le développement de marqueurs microsatellites chez les graminées fourragères (Jones et al, 2001 ; Kubik et al, 2001 ; Saha et al. 2004) et auquel l'INRA avait contribué (Lauvergeat et al, 2005) au travers d'un projet financé par l'UE (SAGES 2004). Cette disponibilité croissante en marqueurs conduisaient à des cartes génétiques de plus en plus denses (Jones et al, 2002a ; Jensen et al, 2005a) permettant le positionnement de QTLs⁹ (Inoue et al, 2004b ; Yamada et al, 2004) et en exploitant à chaque fois que possible la synténie avec des espèces apparentées chez lesquelles le déterminisme est plus avancé (Jones et al, 2002b ; Armstead et al, 2004 ; Jensen et al, 2005b).

Le projet n'avait donc pas pour objet d'identifier de nouveaux locus microsatellites mais de bénéficier de ceux dont la séquence des paires d'amorces avait été publiée pour décrire la variabilité génétique associée à la différenciation entre type fourrage et gazon chez le ray-grass anglais et au progrès génétique des variétés au sein de chacun d'eux. Le projet était aussi l'occasion d'introduire pour la première fois une approche totalement nouvelle de la génétique fourragère dans la communauté des sélectionneurs français.

Matériel et Méthodes

Matériel végétal:

Soixante et une populations ou variétés de ray-grass anglais diploïde ont été choisies pour permettre une comparaison significative, d'une part, entre écotypes, type fourrage et type gazon et, d'autre part, entre variétés au sein de chaque type. Sept populations couvraient la zone de distribution naturelle en Europe de *Lolium perenne* en provenant de Belgique, Danemark, France (Bretagne et Centre), Irlande, Ukraine et Hongrie. On disposait de 5 variétés anciennes dont l'utilisation n'était pas encore différenciée ; enfin, 31 variétés à gazon et 18 variétés fourragères permettaient d'évaluer le progrès génétique réalisé entre 1974 et 2004. Les variétés ont été échantillonnées au sein des variétés diploïdes de précocité intermédiaire à demi-tardive du catalogue français. Les variétés devaient avoir eu un développement commercial minimum et/ou avoir marqué un progrès pour un caractère ou un autre lors des épreuves pour l'inscription. La diversité des obtenteurs a été prise en compte dans la mesure où 25 entreprises distinctes étaient représentées; enfin, le choix des variétés s'est efforcé d'échantillonner régulièrement les 40 années couvertes par l'inscription variétale.

Dispositifs expérimentaux

Quatorze essais multilocaux ont été installés et exploités entre 2006 à 2008 dans le réseau de l'ACVF: 10 essais en parcelle dont 6 en utilisation gazon à Druelle (Aveyron), Les Alleuds (Maine et Loire), Lusignan (Vienne), Mas-Grenier (Tarn et Garonne), Orchies (Nord) et Verneuil-L'Etang (Seine et Marne) et 4 en utilisation fourrage à Montours (Ile et Vilaine), Les Alleuds, Orchies et St Sauvant (Vienne). Deux pépinières de plantes espacées à 0.50m ont été suivies à Verneuil et St Sauvant. Les protocoles d'expérimentations ont été ceux recommandés par le GEVES pour l'étude des variétés-candidates (<http://www.geves.fr/>) ainsi que les mesures (rendement en parcelle - hauteur de la plante et/ou longueur des organes à divers stades végétatifs et reproducteur - dates de réalisation de ces stades) et notations (sensibilité aux maladies - phénologie (alternativité et re-montaison) - pérennité et valeur esthétique des parcelles dans le cas des gazons). Bien que ces critères n'aient été mis en place qu'à partir de l'inscription des variétés en 2013, 4 composantes chimiques de la valeur alimentaire ont été prédites par spectrométrie dans le proche infra-rouge (NIRS) : la teneur en Azote total de la matière sèche (CP), celle en lignine par la méthode Klason (KL), en glucides solubles (WSC) et en fibres (NDF).

⁹ QTL Quantitative Trait Loci

Deux méthodes de digestibilité plus intégratives ont été estimées également par prédiction : la solubilité à la cellulase de la matière sèche (IVDMD) et la dégradabilité du résidu en fibres NDF (IVNDFD). Enfin, 2 essais de production de semences ont été réalisés à Connantre (Marne) et St Pouange (Aube) sous les protocoles de la FNAMS.

Traitement des données phénotypiques

Les moyennes des variétés sur l'ensemble des lieux où elles ont été observées ont été estimées après analyse de variance suivant un modèle mixte ; sous ce modèle, il est possible d'inclure l'interaction avec les lieux d'essais (effets aléatoires) dans le calcul de la variance erreur pour tester la signification des contrastes entre moyennes des variétés (effet fixe) et donc, de ne retenir que les variables où l'effet génétique reste prépondérant devant les interactions. Le progrès génétique au sein de chacun des types variétaux a été estimé par régression linéaire des moyennes des variétés pour chaque caractère sur la valeur de l'année de leur inscription au catalogue. Dans le cas des variétés de type fourrage et compte-tenu de l'importance de la phénologie chez les graminées sur la plupart des caractères mesurés, leur valeur moyenne a été corrigée par régression linéaire sur la date d'épiaison observée en pépinière. Les relations entre caractères ont été calculées par analyse en composantes principales sur les valeurs résiduelles des moyennes des variétés après régression sur l'année d'inscription et, dans le cas des variétés fourragères, après un premier ajustement par régression également sur la date d'épiaison.

Génotypage microsatellite

Une revue bibliographique, quasi-exhaustive en 2005, a permis de rassembler un jeu de 197 marqueurs microsatellites dont les paires d'amorces étaient publiées. Un premier test d'amplification et de polymorphisme à partir d'un échantillon de 20 individus de la collection a conduit à retenir 43 marqueurs, le choix prenant en compte également la taille des amplicons dans la perspective d'un génotypage de toute la collection par séquenceur capillaire ABI3000 à haut débit. La portabilité de ces marqueurs a été ensuite testée à partir des mêmes produits d'amplification de l'échantillon de 20 individus en croisant les 2 méthodes disponibles pour révéler un polymorphisme de taille (séquençage LiCor sur gel de polyacrylamide et séquençage capillaire ABI3000) entre la plateforme INRA/Gentyane à Clermont, INRA/URP3F à Lusignan, R2n à Rodez et DLF Trifolium au Danemark. Seize marqueurs ont été finalement retenus parmi les marqueurs les plus reproductibles et permettant de couvrir chacun des 7 groupes de liaison du ray-grass anglais par 2 à 3 marqueurs.

Les 16 marqueurs regroupent 13 marqueurs microsatellites : LPSSR020 - LPSSR112 - DLFA20 - DLF027 - UNI001 (Jensen et al 2005b) ; LP165 (Kubik et al 2001) ; NFFA015 - NFFA023 - NFFA059 - NFFA113 (Saha et al 2004) ; B1A2 (Lauvergeat et al 2005) ; LPSSRH01H06 (Jones et al 2001) et S7F7 (= NGRLI LM 3-4F développé par M. Fujimori, *National Institute for Livestock and Grassland Sciences* à Tochigi au Japon et publié par Kindiger (2006)) parmi lesquels 10 sont à motif parfait et 2, à motif interrompu (LPSSR020 et DLF027), avec 3 marqueurs STS : PHOS - NDPK (Lem et Lallemand, 2003) et SYN20738-1 (Barre et al, 2009).

L'extraction d'ADN de la collection a été réalisée en échantillonnant 44 individus/variété dans la pépinière du GIE GRASS à St Sauvant où elle avait été implantée au printemps 2006 (soit 2684 individus répartis en 7 plaques x 384 dont 5 témoins et 4 témoins négatifs). Les amplifications PCR et le génotypage sur séquenceur capillaire des 16 marqueurs, éventuellement par multiplexage de 1 à 3 marqueurs, ont été effectués en trois passages en 2007 à la plate-forme INRA/GENTYANE de Clermont.

Traitement des données de génotypage

Une première définition du panel d'allèles par marqueur à partir de chaque profil individuel a été réalisée sous le logiciel *GeneMapper* en fonction de la plus ou moins grande proximité des pics de fluorescence le long du profil (nombre d'allèles) et de leur hauteur, absolue et relative. Compte-tenu de

la diversité du taux d'amplification et du nombre d'allèles observés entre marqueurs, la définition des allèles s'est basée aussi sur une première estimation de la fréquence des pics dans l'ensemble de la collection en regroupant les pics dont la proximité était inférieure au nombre de bases du motif microsatellite et/ou en très faible fréquence dans la collection (< 0.003).

Deux marqueurs (PHOS et LPSSR020 sur les groupes de liaison 3 et 7, resp.) ont dû être abandonnés en raison d'une définition du panel d'allèles trop délicate à cause d'un taux de non-amplification déjà élevé (PHOS : 13.9 %) et/ou de très nombreux de pics en présence pratiquement toujours unique chez les individus (LPSSR020 : 37 pics). Pour les mêmes raisons, le codage des profils en génotype s'est basé seulement sur la présence des pics observés, c'est-à-dire sans hypothèse de déterminisme allélique co-dominant, pour 3 marqueurs : DLF027 - LPSSR112 - S7F7). Pour limiter l'impact de la non-amplification sur l'estimation des fréquences alléliques, les individus n'ayant pas amplifié ont été considérés comme données manquantes pour le marqueur concerné. L'analyse génétique a pu porter ainsi sur le génotypage de 2629 profils individuels pour 14 marqueurs et à raison de 2 marqueurs par groupe de liaison comme se l'était fixé initialement le projet.

Au niveau individuel, l'analyse s'est limitée à comparer le nombre d'allèles par variété, population et type variétal et leur cumul au cours des années d'inscription. Au niveau population, les fréquences alléliques estimées ont permis de calculer le critère F_{st} de différenciation comme le rapport, moyen et par marqueur, entre variance observée de la fréquence allélique entre variétés et type, et variance attendue sous hypothèse d'équilibre global. Un intervalle de confiance empirique des valeurs F_{st} a été estimé par *bootstrap*.

L'analyse multilocus a d'abord procédé à une réduction des données par Analyse en Composantes Principales (2161 individus, 10 marqueurs, 107 allèles) à 22 facteurs pour 95% de covariance expliquée, suivie du calcul de la distance (géométrique) entre variétés. Celle-ci a fait l'objet d'une classification hiérarchique ascendante, agrégation en groupes sur critère de Ward (distance moyenne) et définition du nombre de groupes à 37 % de variance intergroupe par rapport à la variance totale. Une seconde réduction des données a été réalisée en échantillonnant de 1 à 2 allèles par marqueur parmi ceux expliquant la plus grande part de variance totale entre variétés, soit 13 allèles à 8 marqueurs, et utilisée pour tester la robustesse de la classification hiérarchique en groupes à l'aide d'une analyse canonique discriminante.

Résultats

Sélection de marqueurs microsatellites

L'étude de portabilité du génotypage entre méthodes et laboratoires a montré une bonne reproductibilité globale des marqueurs en termes de nombre d'allèles et de leur taille relative, En revanche, le génotypage peut présenter au niveau individuel de nombreuses discordances en particulier pour les marqueurs à nombreux allèles et/ou de taille proche.

Cinq marqueurs parmi les 16 ont présenté un taux de non-amplification supérieur à 10 % et jusqu'à 31.5 % (LPSSR112), le nombre d'allèles par locus pouvait s'étendre de 6 à 37 allèles par locus mais en restant inférieur ou égal à 7 (SYN20738-1) dans le cas des 3 STS. De façon générale, il existe une corrélation entre nombre total d'allèles et taux de non-amplification, modulée suivant que le marqueur est situé dans une zone codante ou non. Ainsi, les microsatellites exprimés (EST-SSR) peuvent présenter jusqu'à 37 allèles mais avec des taux de non-amplification ne dépassant pas 6.1 % (LPSSR020). Inversement, un des 3 marqueurs STS (PHOS) présentait un taux de non-amplification déjà élevé (13.9 %) pour 6 allèles seulement. En bon accord avec un modèle de mutation de proche en proche du polymorphisme microsatellite, les fréquences alléliques se caractérisent par une distribution en cloche ou asymétrique mais très souvent vis-à-vis d'un allèle en fréquence très majoritaire (> 0.404 chez 12 marqueurs /14). L'hétérozygotie moyenne des individus, pour autant qu'on puisse l'évaluer

précisément ici, paraît directement reliée au nombre d'allèles recensés mais avec un déficit par rapport à l'équilibre marqué, soulignant la présence d'allèles nuls en fréquence élevée et d'autant plus difficilement détectables que le nombre d'allèles « actifs » est peu abondant.

Différenciation entre variétés et type fourrager vs Gazon

Les tableaux de résultats et figures ont déjà été communiqués (Ghesquière et al, 2009) et ne seront pas repris ici. Parmi les résultats les plus significatifs, on note que la richesse allélique moyenne des variétés aux marqueurs les plus polymorphes est à peine inférieure à celle des populations spontanées, ne diminue que très lentement au cours de l'inscription variétale et que les allèles présents dans les populations spontanées sont rapidement et en totalité récupérés par le catalogue variétal, qu'il soit fourrage ou gazon.

La structuration en variétés de la collection donne une image singulièrement contrastée vis-à-vis du progrès génétique décrit plus loin ; une différenciation extrêmement faible en moyenne entre type fourrage et type gazon ($F_{st} = 0.0118$) en comparaison de la différenciation entre variétés d'un même type quatre fois plus rapide sur le même pas de temps ($F_{st} = 0.1086$) et qui dépasse désormais celle entre populations spontanées ($F_{st} = 0.061$). Deux marqueurs DLF027 ($F_{st} = 0.0426$) et NFFA059 ($F_{st} = 0.0384$), sur les groupes de liaison 1 et 5 (resp.), suggèrent cependant qu'ils pourraient être associés aux gènes ayant répondu à la sélection gazon vs fourrage.

La classification aboutit à retenir 6 groupes, consistants après analyse discriminante et relativement homogène vis-à-vis du type variétal, mais sans relation particulière avec la date d'inscription. On distingue 2 groupes de variétés de type fourrager et 4 groupes de type gazon parmi lesquels 2 présentent une différenciation sensiblement plus marquée que les 2 groupes de type fourrager. Parmi les populations spontanées, 5 populations originaires de France, Belgique, Danemark et Irlande se mêlent avec 4 des 5 variétés anciennes et non différenciées dans leur usage, les deux groupes de type fourrager et l'un des groupes de type gazon au centre de la distribution en 2 dimensions de l'analyse canonique. Les deux populations spontanées les plus distantes géographiquement, Ukraine et Hongrie, se trouvent en distribution périphérique avec les deux groupes de type gazon les plus extrêmes.

Deux variétés se positionnent comme hors-type dans cette classification avec un profil de fréquences mixte entre type fourrager et type gazon, bien visible en particulier aux deux marqueurs DLF027 et NFFA059 : la variété à gazon *Idole* qui se regroupe avec un groupe de type fourrager, ce qui peut être cohérent vue l'ancienneté de son inscription (1980), et la variété de type fourrager *Aberavon*, inscrite en 2000, mais qui est classée avec l'un des 2 groupes extrêmes de type gazon. La base génétique connue pour être particulièrement étroite chez la variété *Aberavon* confirme que c'est la dérive qui doit déterminer de loin la structuration génétique observée entre variétés mais qu'à l'échelle d'un type d'utilisation donné, le système de création variétale reste très peu cloisonné/emboîté pour permettre le maintien d'une diversité génétique globale très proche de celle des populations spontanées.

Les résultats sont conformes à ceux de Bolaric et al (2005b) qui montraient que la composante inter-population de la variance de la distance génétique entre 22 écotypes d'origine allemande passe à peine de 29 % à 33 % entre 22 variétés, toutes dates d'inscription confondues. Concernant les variétés à gazon, les résultats suggèrent aussi qu'à même effort de sélection au sein des deux types, le pool génique du type gazon pourrait commencer à se trouver plus isolé des ressources génétiques spontanées et/ou de son vis-à-vis de type fourrager que l'inverse. Aux USA et chez une autre espèce de graminée pérenne, la fétuque élevée, Baird et al (2012) montrent une perte de diversité allélique particulièrement marquée chez les variétés de type gazon.

Progrès génétique

Les résultats de progrès génétique ont fait l'objet d'un article scientifique pour chacun des types variétaux (Sampoux et al, 2011 et 2013) et de communication plus large vers la filière semence et des utilisateurs (Chosson et al, 2009), aussi le lecteur est-il invité à s'y reporter pour examiner les tableaux

et figures qui les décrivent. Pour résumer, les résultats montrent très clairement que la création variétale de ray-grass anglais s'est accompagnée d'un progrès significatif linéaire sans ambiguïté sur une période de 40 années et pour un ensemble de caractères pouvant être de nature très différente et dans les deux directions de sélection, fourrage et gazon.

Chez les variétés fourragères, le rendement total annuel progresse ainsi de + 3.2 % mais seulement de façon significative aux saisons les plus limitantes : +2.8 % aux coupes d'été et + 7.4 % à celles en automne. De la même façon, on observe un progrès du démarrage en végétation au début du printemps, conférant, pour une même date d'épiaison, une amélioration de la souplesse d'utilisation des variétés fourragères. Chez les variétés à gazon, on enregistre également un net progrès sur la valeur esthétique, de 8.8 % à 12.5 % suivant les saisons, la tolérance au piétinement (+ 5.4 %) et la diminution de croissance (- 0.43 mm/jour). Chez les deux types de variétés en revanche, le progrès converge simultanément et au même rythme, vers une plus grande tolérance aux maladies, notamment la rouille couronnée.

Les relations entre caractères suggèrent comment une part de la réponse génétique a pu être obtenue par sélection indirecte ou au contraire, être antagoniste d'autres objectifs de sélection, plus héritable ou sur lesquels la pression de sélection a été plus forte, ou même comment une variabilité génétique disponible reste à exploiter. Chez les variétés fourragères, la réduction de la remontaison à épis est très significative et a pu contribuer à améliorer indirectement des critères de composition chimiques de la matière sèche ; de même, les relations positives de la valeur esthétique en gazon et de la tolérance au piétinement sont corrélées avec la densité et la finesse des talles. Inversement, des corrélations négatives peuvent expliquer pourquoi un progrès plus faible, voire non significatif, a été observé sur la vitesse d'installation du couvert 3 mois après le semis, la pérennité ou la couleur du gazon à différentes saisons de l'année. Enfin, de nombreux caractères mesurés en pépinière de plantes isolées peuvent montrer une forte association avec des caractères de productivité mais sans réponse significative au cours des 40 années de création variétale. Ces caractères apparaissent ainsi comme autant de critères de sélection potentiels et ce d'autant plus s'ils sont fortement héritable ; ainsi, la longueur des limbes et/ou la vitesse d'élongation. La productivité semencière, souvent tenue comme antagoniste d'une amélioration pour des caractères végétatifs, n'a présenté aucune réponse significative en fonction de l'année d'inscription ni de corrélations avec ces caractères et paraît donc ouverte à une amélioration spécifique sans préjudice pour des objectifs d'utilisation fourragère ou en gazon.

Discussion

Un marquage moléculaire en évolution

L'utilisation de marqueurs microsatellites très informative potentiellement sur un matériel génétiquement proche ou à des fins de cartographie génétique pour la recherche de QTLs s'est trouvée ici en partie handicapée pour cette étude. Cela souligne l'extrême variabilité de séquence chez le ray-grass anglais pour exploiter un polymorphisme moléculaire issu de PCR parmi du matériel végétal aussi divers, état de fait qui s'est confirmé ultérieurement par l'étude du déséquilibre de liaison entre deux variétés de ray-grass à base génétique très contrastée (Auzanneau et al, 2007).

Concernant les marqueurs microsatellites précisément et leur développement chez le ray-grass anglais, celui-ci n'a fait que croître au cours du projet ; d'une part, le nombre de marqueurs a beaucoup augmenté, éventuellement en provenance de l'espèce *L. multiflorum* (Hirata et al, 2006) et/ou sont tous désormais situés dans des gènes exprimés (EST¹⁰-SSR) ; d'autre part, un effort important a été réalisé pour éditer des cartes consensus entre des populations ne partageant pas de locus hétérozygotes grâce à la technique HRM¹¹ (Studer et al, 2009). Depuis les premières cartes à quelques marqueurs

¹⁰ EST Expressed Sequence Tag : marqueur de séquence ADN exprimée

¹¹ HRM High Resolution Melt : courbe de fusion à haute résolution

communs seulement (Armstead et al, 2002 ; Jensen et al., 2005a), Studer et al (2010) ont publié une carte génétique interconnectée entre 8 populations de *L. perenne* et à laquelle Pfender et al (2013) viennent d'ajouter à une précédente édition de leur carte (Pfender et al, 2011), 28 autres marqueurs microsatellites par HRM et reliant les cartes de Faville et al (2004), Jensen et al (2005a), Studer et al (2008), Van Daele et al (2008), Dracatos et al (2009) et Pauly et al (2012). Cet effort consenti au développement et à la cartographie de marqueurs microsatellites s'explique par une recherche de QTLs qui s'est beaucoup intensifiée et diversifiée à partir de 2005 et sur de très nombreux caractères chez *Lolium* sp. (Inoue et al ; 2004b ; Gil et al, 2006 ; Polok, 2007 ; Barre et al, 2009 ; Kölliker et al, 2010).

Par ailleurs, sur la période écoulée, les coûts de séquençage de l'ADN suivant différentes technologies ont considérablement diminué pour exploiter un polymorphisme, également non limitant et bien dispersé dans le génome, mais à base de substitutions nucléotidiques au sein des gènes (SNP¹²). Par rapport à la recherche classique de QTLs dans des populations où le déséquilibre de liaison est construit par apparentement (pleins frères), le polymorphisme SNP offre la possibilité de détecter des déséquilibres de liaison très étroits au sein de matériel génétique non apparenté, ce qui renouvelle profondément la recherche en génétique évolutive mais aussi en amélioration, par la recherche de signature génomique de la sélection et la génétique d'association (Cogan et al, 2006 ; Brazauskas et al, 2010).

Cette ouverture technologique du polymorphisme SNP a motivé l'ACVF pour entreprendre un nouveau projet financé par le CASDAR¹³ à la suite de celui rapporté ici, « *Développement d'outils pour la sélection assistée par marqueurs chez le ray-grass anglais (2008-11)* », avec l'objectif d'identifier des QTLs chez 6 croisements fourrage x gazon. Récemment, la combinaison du développement de marqueurs, de leur cartographie génétique et de leur séquençage appuyé de données de synténie chez les graminées vient d'aboutir à une mise à disposition publique d'information génomique sans précédent et qui devrait renouveler complètement la réflexion sur l'utilisation de ces outils pour l'amélioration (Pfeifer et al, 2012).

On voit donc que l'introduction du marquage moléculaire en amélioration est constamment confrontée au développement de nouvelles techniques, toutes attractives par différents aspects : technicité, valeur de l'information génétique, haut-débit, coût, ..., mais dans un contexte où le matériel végétal apporte aussi ses propres contraintes biologiques, et peut même ne pas être disponible ni permettre de valoriser réellement de nouvelles technologies au regard des questions scientifiques posées.

Cette contrainte d'un marquage moléculaire adapté à la biologie de l'espèce cible et suffisamment évolutif pour répondre aux questions emboîtées de l'amélioration a incité à développer une technologie alternative en basant la recherche de polymorphisme par l'hybridation d'ADN génomique sur microarrays garnis d'un très grand nombre d'ADN-cibles, les marqueurs DArTs¹⁴ (Jaccoud et al, 2001). Bien adaptés aux études de matériel génétique très divers (Baird et al, 2012), les marqueurs DArTs n'excluent pas pour autant d'être utilisés successivement à des fins de cartographie génétique (Kopecký et al, 2009 ; Tomaszewski et al ; 2012), de recherche de QTLs et approfondissement du déterminisme par séquençage des ADN sondes et synténie (Bartoš et al, 2011). Pour toutes ces raisons, nous avons initié en 2011 le développement d'une ressource propre en marqueurs DArT chez les 4 espèces fourragères principales, dont le ray-grass, au travers d'une AIP INRA Bioressources (DArTClimat) et de l'accueil à la plateforme du CIRAD/Montpellier.

Ceci étant, il n'est pas évident que la disponibilité d'un plus grand nombre de marqueurs microsatellites en 2005 ou d'un polymorphisme moléculaire d'une autre nature et applicable en l'état à l'étude de la collection variétale du ray-grass anglais, eût été à même de remettre en cause les principales conclusions présentées ici.

¹² SNP Single Nucleotide Polymorphism

¹³ CASDAR Compte d'Affectation Spéciale pour le Développement Agricole et Rural

¹⁴ DArT Diversity Array Technology

Une amélioration des graminées pérennes performante

Les résultats montrent que le progrès génétique chez le ray-grass anglais, et vraisemblablement aussi chez l'ensemble des graminées pérennes, est de nature multi-variable et qu'il peut être atteint de façon indirecte par la sélection multi-caractère qui est appliquée. Sur le pas de temps étudié et partant d'une situation initiale marquée par les populations naturelles, le progrès observé paraît linéaire et ne semble pas atteindre de limites au contraire d'autres caractères qui n'ont absolument pas répondu à des pressions de sélection qui n'ont pourtant pas manqué d'être exercées.

Ainsi, la non-réponse de la productivité des coupes de printemps constitue-t-elle une sorte de validation *a posteriori* de l'approche écophysiological de la productivité fourragère. Selon celle-ci, la productivité ne peut que plafonner du fait de l'invariance de l'efficacité photosynthétique, notamment lorsque l'indice foliaire optimum est atteint et que les conditions d'alimentation hydrique et minérale sont peu limitantes, ce qui est généralement le cas au printemps (Lemaire et al, 1987). Ce n'est qu'en régime de coupe très contrasté, du pâturage intensif à la fauche, qu'une variabilité génétique de la productivité peut être observée. Sous cet angle, les résultats renvoient de façon très cohérente aux programmes entrepris par l'ACVF à partir de 1990 sur la génétique de la morphogénèse foliaire (Hazard et al, 1994 ; 1996) et l'amélioration de la productivité fourragère (Hazard et al, 1995 & 1997 ; Barre et al, 2006). Il est également intéressant de noter qu'inversement, c'est en conditions non-optimum, hydriques et/ou de température, que la productivité a répondu à la sélection le plus significativement et sans avoir disposé de critères de sélection particuliers de tolérance à la sécheresse, de plus, vraisemblablement d'un déterminisme génétique complexe et peu héritable.

Il est possible que la productivité évaluée en parcelle soit suffisamment intégrative en elle-même pour que la sélection réalisée à cette échelle, c'est-à-dire entre familles, se révèle finalement efficace sur le long terme. Ainsi, la combinaison des deux niveaux de sélection, individu vs famille, et des deux systèmes d'évaluation, pépinière vs parcelle, semble bien appropriée *a posteriori* pour optimiser la réponse à une sélection globale sur de très nombreux caractères, y compris de tolérance aux stress abiotiques, et grâce surtout à l'existence des fortes corrélations fonctionnelles entre caractères, à même dispositif et entre dispositifs, propres aux espèces fourragères pérennes.

C'est ici que le rapprochement des niveaux phénotypique et moléculaire de la variabilité génétique est éclairant en illustrant l'originalité de l'amélioration du ray-grass anglais, capable de différencier rapidement et nettement deux types d'utilisation au sein de la même espèce, à un coût seulement très modéré en termes de diversité génétique. Un mode de sélection récurrente, l'emprunt de variabilité génétique aux variétés précédemment inscrites comme le recours toujours possible à des ressources génétiques spontanées permettent d'expliquer cette situation : comment des variétés récemment inscrites peuvent encore atteindre des diversités alléliques voisines de celles de populations spontanées, et comment aussi des composantes de la morphogénèse foliaire directement liée à la productivité semblent ne pas avoir été touchée par la sélection.

Si des ressources de variabilité génétique paraissent ne pas avoir été exploitées ni des critères de sélection mis en œuvre, il se pose des questions sur l'efficacité de l'amélioration du ray-grass : Pourrait-on mieux sélectionner sur critères de sélection, définis plus précisément ou plus précoces ? Y a-t-il trop de variabilité dans les variétés ? Serait-il judicieux de construire des pools géniques divergents au sein de chaque type variétal mais à forte valeur en combinaison ?

Sur toutes ces questions pour optimiser un système d'amélioration capable simultanément de progrès variétal et de préservation globale de la diversité de l'espèce, le marquage moléculaire est un outil que l'amélioration fourragère peut s'approprier progressivement. Si l'utilisation des marqueurs a été approchée de façon rétrospective dans ce projet, c'est bien en tant qu'outil actif de gestion de la diversité génétique et jusqu'à une utilisation prédictive en sélection que réside le challenge. De ce point de vue, la différenciation en variétés fourragères et à gazon, suffisamment séparées désormais pour constituer des ensembles reproductifs isolés, constitue déjà un excellent modèle génétique chez les

graminées pérennes, et disponible non seulement chez le ray-grass anglais mais aussi la fétuque élevée.

Conclusion

Le projet initié en 2005 marque un tournant de l'action de recherche collaborative entre l'ACVF et l'INRA et qui a inspiré le développement de la plupart des programmes de recherche ultérieurs. Il souligne la nécessité de conduire désormais un double effort de recherche en génétique fourragère pour éclairer à la fois les questions spécifiques à l'amélioration des espèces fourragères et y incorporer de façon la plus avertie possible une méthodologie moléculaire en constante évolution et à rythme bien plus rapide que celui de la création variétale.

Au plan phénotypique, le projet souligne la valeur d'études rétrospectives pour approfondir le progrès génétique. Un nouveau projet soutenu par le CASDAR (*EFILOLIUM* 2012-14) est en cours pour mesurer la part prise par l'efficacité de l'utilisation de l'azote et de l'eau dans l'amélioration de la productivité aux coupes d'été et automne qui a été mise en évidence dans le présent projet.

Le modèle ray-grass anglais ne doit pas faire oublier l'intérêt des (nombreuses) autres espèces fourragères et le risque d'une distribution trop déséquilibrée de l'effort de recherche dans le contexte actuel très évolutif de l'agriculture. Ce contexte et les changements de paradigmes qui y sont associés ont été pris en compte dans le projet *CLIMAGIE* (2012-15) par l'adaptation des prairies au changement climatique dans le cadre du métaprogramme INRA *ACCAF*. Un projet soutenu par le CASDAR (*ELARGIR* 2013-2015) va étudier plus spécifiquement la réponse génétique au réchauffement climatique chez le dactyle et la fétuque élevée et les possibilités d'amélioration à partir des ressources génétiques d'origine méditerranéenne.

Le projet a contribué aussi à nourrir la réflexion sur la place de la variabilité génétique, inter- et intra spécifique, intra-variétale en particulier, au moment où la vente de semences fourragères en mélange était autorisée en France et où l'on prenait de plus en plus conscience des services écosystémiques que pouvaient rendre les prairies temporaires en plus de la production fourragère, au même titre que la prairie permanente.

Cela remet au cœur de l'amélioration *s.l.* les questions de variabilité génétique : est-ce un atout ou un handicap chez des espèces dont les variétés sont appelées à être exploitées en mélange ? Ainsi, d'objets relativement dédaignés par l'amélioration des plantes moderne, les concepts d'Agro-Écologie remis en avant pour l'agriculture de demain redonnent-ils singulièrement une place de premier plan aux espèces dont les variétés ne peuvent être que « synthétiques ».

Remerciements

Les résultats présentés dans ce article ont été obtenus dans le cadre d'un projet qui a bénéficié du soutien financier du Ministère de l'Agriculture et de la pêche (MAP) au travers d'une convention avec l'Association des Créateurs de Variétés Fourragères (ACVF) n° C05/19 – 69.01.12 du 24 novembre 2005 et d'un contrat de recherche entre l'INRA et l'ACVF en date du 14 juin 2006.

Les auteurs tiennent à exprimer leurs remerciements à C. Tabel, président en exercice de l'ACVF en 2005 qui a soutenu ce projet de recherches auprès du MAP ainsi qu'à A. de la Soujeole et M. Lécivain à la Société Coopérative d'Intérêt Collectif Agricole des Sélectionneurs Obteniteurs de Variétés Végétales (SICASOV) qui en ont assuré une administration sans faille.

Nos remerciements les plus vifs vont également à l'ensemble des responsables du projet chez les établissements partenaires au sein de l'ACVF : K. de Bruijn, D. Noël et B. Tharel chez Tourneur-Barenbrug Recherches ; P. Bourdon et L. Poinard chez Carneau Frères ; B. Bayle et C. Galbrun chez le GEIE Force Limagrain/DLF avec K. Vangsgaard chez DLF Trifolium au Danemark ; P.

Baudouin, V. Béguier et S. Flajoulot au GIE Grass ; J-F. Chosson, A-M. Gras, W. Pietraszek et M. Romestant chez R2N ; A. Viguié chez le GIE REGA ainsi que F. Deneubourg et J. Hacquet à la Fédération Nationale des Agriculteurs Multiplicateurs de Semences (FNAMS).

Références Bibliographiques

Armstead I.P., Turner L.B., King I.P., Cairns A.J., Humphreys M.O., 2002. Comparison and integration of genetic maps generated from F2 and BC1-type mapping populations in perennial ryegrass. *Plant Breeding* 121, 501-507.

Armstead I.P., Turner L.B., Farell M., Skot L., Gomez P., Montoya T., Donnison I. S., King I.P., Humphreys M.O., 2004. Synteny between a major heading date QTL in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and the Hd3 heading date locus in rice. *Theor Appl Genet* 108, 822-828.

Auzanneau J., Huyghe C., Julier B., Barre P., 2007. Linkage disequilibrium in synthetic varieties of perennial ryegrass. *Theor. Appl. Genet.* 115, 837-847.

Balfourier F., Imbert C., Charmet G., 2000. Evidence for phylogeographic structure in *Lolium* species related to the spread of agriculture in Europe. A cpDNA study. *Theor Appl Genet* 101, 131-138.

Barre P., Emile J.C., Béтин M., Surault F., Ghesquière M., Hazard L., 2006. Morphological characteristics of perennial ryegrass leaves that influence short-term intake in dairy cows. *Agronomy Journal* 98, 978-985.

Barre P., Moreau L., Mi. F., Turner L. B., Gastal F., Julier B., Ghesquière M., 2009. Quantitative trait loci for leaf length in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Grass and Forage Science* 64, 310-321. DOI: 10.1111/j.1365-2494.2009.00696.x

Bert P.F., Charmet G., Sourdille P., Hayward M.D., Balfourier F., 1999. A high-density molecular map for rye-grass (*Lolium perenne*) using AFLP markers. *Theor Appl Genet* 99, 445-452.

Baird J. H., Kopecký D., Lukaszewski A.J., Green R.L., Bartoš J., Doležel J., 2012. Genetic diversity of turf-type tall fescue using diversity arrays technology. *Crop Sci.* 52, 408-412.

Bartoš J., Sandve S.R, Kölliker R., Kopecký D., Christelová P., Stočes S., Østrem L., Larsen A., Kilian A., Rognli O.A., Doležel J., 2011. Genetic mapping of DArT markers in the *Festuca-Lolium* complex and their use in freezing tolerance association analysis. *Theor Appl Genet* 122, 1133-1147. DOI: 10.1007/s00122-010-1518-z

Bolaric S., Barth S., Melchinger A.E., Posselt U.K., 2005a. Genetic diversity in European perennial ryegrass cultivars investigated with RAPD markers. *Plant Breeding* 124, 161-166.

Bolaric S., Barth S., Melchinger A.E., Posselt U.K., 2005b. Molecular genetic diversity within and among ecotypes in comparison to European perennial ryegrass cultivars. *Plant Breeding* 124, 257-262.

Brazauskas G., Pasakinskiene I., Asp T., Lübberstedt T., 2010. Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in five *Lolium perenne* genes with putative role in shoot morphology. *Plant Sci* 179, 194-201.

Charmet G., Balfourier F., Bion A., 1990. Agronomic evaluation of a collection of French perennial ryegrass populations: multivariate classification using genotype x environment interactions. *Agronomie* 10, 807-823.

Charmet G., Balfourier F., Ravel C., 1993. Isozyme polymorphism and geographic differentiation in a collection of French perennial ryegrass populations. *Genetic Resources and Crop Evolution* 40, 77-89.

Chosson J.F., Béguier V., Ghesquière M., Sampoux J.P., Gras M.C., 2009. Genetic progress made in the perennial forage species during the past fifty years. *Fourrages* 200, 475-488.

Cogan N.O.I., Ponting R.C., Vecchies A.C., Drayton M.C., George J., Dracatos P.M., Dobrowolski M.P., Sawbridge T.I., Smith K.F., Spangenberg G.C., Forster J.W., 2006. Gene-associated single nucleotide polymorphism discovery in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Mol Gen Genomics* 276, 101-112.

- Dracatos P.M., Cogan N.O.I., Sawbridge T.I., Gendall A.R., Smith K.F., Spangenberg G.C., Forster J.W., 2009. Molecular characterisation and genetic mapping of candidate genes for qualitative disease resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *BMC Plant Biol* 9, 1–22.
- Faville M.J., Vecchies A.C., Schreiber M., Drayton M.C., Hughes L.J., Jones E.S., Guthridge K.M., Smith K.F., Sawbridge T., Spangenberg G.C., Bryan G.T., Forster J.W., 2004. Functionally associated molecular genetic marker map construction in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theor Appl Genet* 110, 10-32.
- Gallais A., 1992. Pourquoi faire des variétés synthétiques ? *Agronomie* 12, 601-609.
- Ghesquière M., Barre P., Boutet G., Cameleyre I., Flajoulot S., Pierre J.B., Poncet C., Romestant M., Sampoux J.P., Vangsgaard K., 2010. Impact of four decades of breeding on molecular differentiation between forage and turf cultivars of *Lolium perenne*. In: Huyghe C (ed) Sustainable use of genetic diversity in forage and turf breeding, Proceedings of the 27th Eucarpia Fodder Crops and Amenity Grasses Section Meeting, 301-305, La Rochelle, France, 11–14 May 2009, Springer Science+Business Media B.V. DOI:10.1007/978-90-481-8706-5_42
- Gill G.P., Wilcox P.L., Whittaker D.J., Winz R.A., Bickerstaff P., Echt C.E., Kent J., Humphreys M.O., Elborough K.M., Gardner R.C., 2006. A framework linkage map of perennial ryegrass based on SSR markers. *Genome* 49, 354-364.
- Greneche M., Lallemand J., Michaud O., 1991. Comparison of different enzyme loci as a mean of distinguishing ryegrass varieties by electrophoresis. *Seed Science and Technology* 19, 147-158.
- Hazard L., Ghesquière M., Béтин M., 1994. Breeding for management adaptation in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) I. Assessment of yield under contrasting cutting frequencies and relationships with leaf morphogenesis components. *Agronomie* 14, 259–266.
- Hazard L., Emile J.C., Ghesquière M., Charrier X., 1995. Varietal effect in perennial ryegrass on milk productivity of dairy cows continuous grazing: turf variety vs. forage variety. *Annales de Zootechnie* 44 Suppl: 367.
- Hazard L., Ghesquière M., Barraux C., 1996. Genetic variability for leaf development in perennial ryegrass populations. *Can J Plant Sci* 76, 113-118.
- Hazard L., Ghesquière M., 1997. Productivity under contrasting cutting regimes of perennial ryegrass selected for short and long leaves. *Euphytica* 95, 295–299.
- Hirata M., Cai H., Inoue M., Yuyama N., Miura Y., Komatsu T., Takamizo T., Fujimori M., 2006. Development of simple sequence repeat (SSR) markers and construction of an SSR-based linkage map in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) *Theor Appl Genet* 113, 270-279.
- Inoue M., Gao Z., Hirata M., Fujimori M., Cai H., 2004a. Construction of a high-density linkage map of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) using restriction fragment length polymorphism, amplified fragment length polymorphism, and telomeric repeat associated sequence markers. *Genome* 47, 57-65.
- Inoue M., Gao Z., Cai H., 2004b. QTL analysis of lodging resistance and related traits in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Theor Appl Genet* 109, 1576–1585.
- Jaccoud D., Peng K., Feinstein D., Kilian A., 2001. Diversity Arrays: a solid-state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Res* 29:e25.
- Jensen L.B., Muylle H., Arens P., Andersen C.H., Holm P.B., Ghesquiere M., Julier B., Lübberstedt T., Nielsen K.K., De Riek J., Roldan-Ruiz I., Roulund N., Taylor C., Vosman B., Barre P., 2005a. Development and mapping of a public reference set of SSR markers in *Lolium perenne* L. *Mol. Ecol Notes* 5, 951-957.
- Jensen L.B., Andersen J.R., Frei U., Xing Y.Z., Taylor C., Holm P.B., Lübberstedt T.L., 2005b. QTL mapping of vernalization response in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) reveals co-location with an orthologue of wheat VRN1. *Theor Appl Genet* 110, 527–536.
- Jones E.S., Dupal M.P., Kölliker R., Drayton M.C., Forster J.W., 2001. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers for perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Theor Appl Genet* 102, 405-415.
- Jones E.S., Dupal M.P., Dumsday J.L., Hughes L.J. Forster J.W., 2002a. An SSR-based genetic linkage map for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theor Appl Genet* 105, 577–584.

Jones E.S., Mahoney N.L., Hayward M.D., Armstead I.P., Jones J.G., Humphreys M.O., King I.P., Kishida T., Yamada T., Balfourier F., Charmet G., Forster J.W., 2002b. An enhanced molecular marker based genetic map of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) reveals comparative relationships with other *Poaceae* genomes. *Genome* 45, 282-295.

Kindiger B., 2006. Cross-species amplification of *Lolium* microsatellites in *Poa* ssp. *Grassland Science* 52, 105–115. DOI: 10.1111/j.1744-697X.2006.00055.x

Kölliker R., Rosselini D., Wang Z.Y., 2010. Development and application of biotechnological and molecular genetic tools. *In*: Boller B, Posselt UK, Vernonesi F (eds) *Fodder Crops and Amenity Grasses, Handbook of plant breeding*, 89-113, Springer Science+Business Media LLC. DOI:10.1007/978-1-4419-0760-8_4

Kopecký D., Bartoš J., Lukaszewski A.J., Baird J.H., Černoch V., Kölliker R., Rognli O.A., Blois H., Caig V., Lübberstedt T., Studer B., Shaw P., Doležel J., Kilian A., 2009. Development and mapping of DArT markers within the *Festuca - Lolium* complex. *BMC Genomics* 10, 473. DOI: 10.1186/1471-2164-10-473

Kubik C., Sawkins M., Meyer W.A., Gaut B.S., 2001. Genetic diversity in seven perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars based on SSR markers. *Crop Sci* 4, 1565-1572

Lauvergeat V., Barre P., Bonnet M., Ghesquiere M., 2005. Sixty simple sequence repeat markers for use in the *Festuca-Lolium* complex of grasses. *Molec Ecol Notes* 5, 401-405.

Lem P., Lallemand J., 2003. Grass consensus STS markers: An efficient approach for detecting polymorphism in *Lolium*. *Theor Applied Genet* 107, 1113–1122.

Lemaire G., Varlet-Granchet C., Gastal F., Durand J.L., 1987. Ecophysiological approach to plant growth. Consequences for breeding strategies for forage species in contrasting conditions and different managements. *Proc 14th Meeting Fodder Crops Section of EUCARPIA, Lusignan, France*: 103–118.

Pauly L., Flajoulot S., Garon J., Julier B., Beguier V., Philippe B., 2012. Detection of favorable alleles for plant height and crown rust tolerance in three connected populations of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theor Appl Genet* 124, 1139-1153.

Pfeifer M., Martis M., Asp T., Mayer K.F.X., Lübberstedt T., Byrne S., Frei U., Studer B., 2012. The perennial ryegrass GenomeZipper – targeted use of genome resources for comparative grass genomics. *Plant Physiology Preview*. Published on November 26, 2012. DOI:10.1104/pp.112.207282.

(<http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/lolium/index.jsp>.)

Pfender W.F., Saha M.C., Johnson E.A., Slabaugh M.B., 2011. Mapping with RAD (restriction-site associated DNA) makers to rapidly identify QTL for stem rust resistance in *Lolium perenne*. *Theor Appl Genet* 122, 1467-1480.

Pfender W., Slabaugh M., 2013. Pathotype-specific QTL for stem rust resistance in *Lolium perenne*. *Theor Appl Genet*, submitted.

Polok K. 2007. Molecular evolution of the genus *Lolium* L. Kornelia Polok (ed), 317p. ISBN 978-83-88125-522.

(http://books.google.fr/books?id=dtlLdvhTFwEC&printsec=frontcover&hl=fr&source=gbs_vpt_buy#v=onepage&q&f=false)

SAGES 2004. Sustainable Grasslands Withstanding Environmental Stresses, 5th PCRDT shared cost project QLK5-CT-2000-0076. for 2001–2003. Key-Action 5.1.1. Sustainable Agriculture, Technological Implementation Plan. European Commission, Brussels, Belgium, 42p. (<http://www.sages-eu.co.uk/>)

Saha M.C., Mian R., Zwonitzer J.C., Chekhovskiy K., Hopkins A.A., 2004. An SSR- and AFLP-based genetic linkage map of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Theor Appl Genet* 110, 323–336. DOI: 10.1007/s00122-004-1843-1

Sampoux J.P., Baudouin P., Bayle B., Béguier V., Bourdon P., Chosson J.F., Deneufbourg F., Galbrun C., Ghesquière M., Noël D., Pietraszek W., Tharel B., Vigié A., 2011. Breeding perennial grasses for forage usage: An experimental assessment of trait changes in diploid perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars released in the last four decades. *Field Crops Science* 123, 117-129. DOI:10.1016/j.fcr.2011.05.007

- Sampoux J.P., Baudouin P., Bayle B., Béguier V., Bourdon P., Chosson J.F., de Bruijn K., Deneufbourg F., Galbrun C., Ghesquière M., Noël D., Tharel B., Viguié A., 2013. Breeding perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) for turf usage: an assessment of genetic improvements in cultivars released in Europe, 1974–2004. Grass and Forage Science, in the press. DOI: 10.1111/j.1365-2494.2012.00896.x
- Studer B., Jensen L.B., Fiil A., Asp T., 2009. “Blind” mapping of genic DNA sequence polymorphisms in *Lolium perenne* L. by high resolution melting curve analysis. Mol Breed 24, 191-199.
- Studer B., Asp T., Frei U., Hentrup S., Meally H., Guillard A., Barth S., Muylle H., Roldan-Ruiz I., Barre P., Koning-Bouciran C., Uenk-Stunnenberg G., Dolstra O., Skot L., Skot K.P., Turner L.B., Humphreys M.O., Kolliker R., Roulund N., Nielsen K.K., Lubberstedt T., 2008. Expressed sequence tag-derived microsatellite markers of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Mol Breed 21, 533-548.
- Studer B., Kolliker R., Muylle H., Asp T., Frei U., Roldan-Ruiz I., Barre P., Tomaszewski C., Meally H., Barth S., Skot L., Armstead I.P., Dolstra O., Lubberstedt T., 2010. EST-derived SSR markers used as anchor loci for the construction of a consensus linkage map in ryegrass (*Lolium* spp.). BMC Plant Biology 10, 177.
- Tabel C., Allerit R., 2005. Bilan du progrès génétique obtenu pour différents caractères et différentes espèces. Fourrages 183, 365-376.
- Tomaszewski C., Byrne S.L., Foito A., Kildea S., Kopecky D., Dolezel J., Heslop-Harrison J.S., Stewart D., Barth S., 2012. Genetic linkage mapping in an F2 perennial ryegrass population using DArT markers. Plant Breeding 131, 345-349.
- Van Daele I., Muylle H., Van Bockstaele E., Roldan-Ruiz I., 2008. Mapping of markers related to selfincompatibility, disease resistance, and quality traits in *Lolium perenne* L. Genome 51, 644-656.
- Yamada T., Jones E.S., Cogan N.O.I., Vecchies A.C., Nomura T., Hisano H., Shimamoto Y., Smith K.F., Hayward M.D., Forster J.W., 2004. QTL analysis of morphological, developmental, and winter hardiness associated traits in perennial ryegrass. Crop Science 44, 925–935.