



**HAL**  
open science

## Développement d'un outil pour la sélection assistée par marqueurs chez le ray-grass anglais

Philippe Barre, Gaelle Chupeau, Vincent Beguier, Pascal Bourdon, Sandrine Flajoulot, C. Galbrun, M.C. Gras, Marie-Christine Le Paslier, D. Noël, L. Poinsard, et al.

### ► To cite this version:

Philippe Barre, Gaelle Chupeau, Vincent Beguier, Pascal Bourdon, Sandrine Flajoulot, et al.. Développement d'un outil pour la sélection assistée par marqueurs chez le ray-grass anglais. Innovations Agronomiques, 2014, 35, pp.151-159. 10.17180/a1hd-dt51 . hal-01543488

**HAL Id: hal-01543488**

**<https://hal.science/hal-01543488v1>**

Submitted on 20 Jun 2017

**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

## Développement d'un outil pour la sélection assistée par marqueurs chez le ray-grass anglais

Barre P.<sup>1</sup>, Chupeau G.<sup>1</sup>, Béguier V.<sup>2</sup>, Bourdon P.<sup>2</sup>, Flajoulot S.<sup>2</sup>, Galbrun C.<sup>2</sup>, Gras M.C.<sup>2</sup>, Lepaslier M.C.<sup>3</sup>, Noël D.<sup>2</sup>, Poinsard L.<sup>2</sup>, Pietraszek W.<sup>2</sup>, Romestant M.<sup>2</sup>, Saint-Pierre L.<sup>2</sup>, Salse J.<sup>4</sup>, Sampoux J.P.<sup>1</sup>, Tharel B.<sup>2</sup>, Brunel D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> INRA, UR4, Unité de Recherche Pluridisciplinaire, Prairies et Plantes Fourragères, Le Chêne, RD 150, BP 80006, 86600 Lusignan, France

<sup>2</sup> ACVF Association des Créateurs de Variétés Fourragères, 7 rue Coq Héron, 75030, Paris, Cedex 1, France

<sup>3</sup> INRA, INRA\_US\_1279 EPGV (Etude du Polymorphisme des Génomes Végétaux), CEA/Institut de Génomique/Centre National de Génotypage (CNG), 2 rue Gaston Crémieux, Bat G2, CP5724, 91057 Evry Cedex

<sup>4</sup> INRA UBP, UMR1095 Génétique Diversité & Ecophysiologie des Céréales (GDEC), 5 Chemin de Beaulieu, 63100 Clermont-Ferrand, France

Correspondance : philippe.barre@lusignan.inra.fr

### Résumé :

Les variétés fourragères sont des variétés synthétiques obtenues par intercroisement en panmixie d'un certain nombre de constituants sélectionnés selon des schémas de sélection récurrente. Cette stratégie d'amélioration a permis un progrès génétique indéniable, mais son efficacité pourrait être accrue grâce à l'utilisation de marqueurs moléculaires. L'objectif de cette étude était de développer un outil permettant de génotyper facilement plusieurs milliers d'individus avec une centaine de marqueurs répartis sur l'ensemble du génome chez le ray-grass anglais. La stratégie a été de développer des couples d'amorces dans des régions conservées encadrant un intron pour amplification et séquençage dans les génotypes d'intérêt (parents de polycross). Les séquences ont ensuite été utilisées pour développer des marqueurs SNP. Au total, nous avons développé 363 couples d'amorces bien répartis sur le génome et présentant une amplification correcte chez le ray-grass anglais. De plus, ces amorces ont montré une excellente transférabilité à d'autres espèces de graminées fourragères (de 73 à 97 % pour les fétuques et 77 % pour le dactyle). L'étude du polymorphisme sur sept génotypes de ray-grass anglais a révélé en moyenne un SNP toutes les 42 bases. Seulement 38 % des SNP étaient hétérozygotes chez plus d'un génotype, ceci a conduit à développer des marqueurs SNP spécifiques à chacun des sept génotypes pour l'étude de la ségrégation de leurs descendances respectives.

**Mots-clés** : *Lolium perenne* L., graminées fourragères, marqueurs moléculaires, SNP

### Abstract: Development of molecular markers for marker assisted selection in perennial ryegrass

Forage varieties are synthetic varieties obtained by the intercross of a small number of elite genotypes selected in recurrent selection programs. This breeding method has been successful to improve forage species but its efficiency could be increased by the use of molecular markers. The goal of this study was to develop a tool for an easy genotyping of thousands of individuals with an hundred markers evenly spread across the genome in perennial ryegrass. The strategy was to design primer pairs in conserved regions on both sides of an intron for amplification and sequencing in genotypes of interest (polycross parents). Sequences were used to develop SNP markers. We developed 363 primer pairs evenly distributed across the genome with good amplification in perennial ryegrass. Moreover, these primer pairs showed an excellent transferability to other forage grass species (between 73 and 97% in

fescues and 77% in cocksfoot). Polymorphism study on seven perennial ryegrass genotypes revealed one SNP every 42 bases on average. Only 38% of the SNPs were heterozygous in more than one genotype. This required to develop specific SNP markers in order to study segregating progenies within each of the seven genotypes.

**Keywords:** *Lolium perenne* L., forage grasses, molecular markers, SNP

## Introduction

Les prairies, représentant 45% de la SAU française (plus de 14 Million d'ha), ont un rôle essentiel à jouer dans un contexte d'agriculture durable permettant de concilier production de produits laitiers et carnés et protection de l'environnement. En effet, elles présentent de nombreux avantages dont le stockage des éléments bio-géo-chimiques (notamment C et N), la préservation des ressources en eau, la limitation de l'érosion des sols, la préservation de la biodiversité et la préservation des territoires et des paysages. De plus, elles constituent la source d'énergie et de protéines la moins onéreuse pour l'alimentation des ruminants, essentiellement lorsqu'elles sont pâturées (Huyghe et al., 2005). Une partie des prairies (prairies temporaires couvrant 2,7 Millions d'ha) est installée par semis dans les systèmes prairiaux les plus intensifs. Dans ce cas, pour assurer une production suffisante de bonne qualité, l'éleveur sème régulièrement ses prairies avec des semences de variétés sélectionnées de différentes espèces de graminées et / ou légumineuses. La création de ces variétés de qualité associant fort rendement, bonne valeur alimentaire, souplesse d'exploitation, pérennité et résistance aux maladies à un prix accessible pour les éleveurs est le défi que doivent relever les sélectionneurs.

La sélection assistée par marqueurs (SAM) devrait augmenter l'efficacité de la sélection sur les caractères phénotypiques tout en permettant un meilleur contrôle de la diversité des populations soumises à sélection. En effet, la SAM devrait permettre une sélection précoce pour des caractères longs et coûteux à mesurer comme le rendement végétatif et grainier, la composition biochimique et la résistance aux maladies grâce à l'association de certains marqueurs moléculaires avec ces caractères. Chez la plupart des espèces fourragères, du fait de l'existence de systèmes d'auto-incompatibilité, d'une dépression de consanguinité importante et de la quasi-impossibilité de contrôler les croisements, les variétés sont des variétés synthétiques constituées d'un certain nombre de génotypes. Ce type de variété a l'avantage de maintenir une certaine diversité intra-variété qui pourrait être un facteur d'adaptation aux variations des conditions environnementales, et notamment aux stressés biotiques ou abiotiques. **La SAM devrait permettre d'augmenter la fréquence des allèles favorables, voire de les fixer, pour des caractères d'intérêt, maximisant ainsi le progrès sur ces caractères, tout en maintenant de la diversité allélique associée à d'autres caractères fonctionnels dont la variabilité pourrait favoriser l'homéostasie des variétés.**

**La SAM nécessite dans un premier temps de repérer les parties du génome impliquées dans les caractères d'intérêt** et les allèles favorables puis de fixer ces allèles. L'identification du déterminisme génétique des caractères peut être réalisée par une approche « gène candidat » lorsque le caractère est bien connu et qu'un nombre limité de gènes sont potentiellement impliqués dans la variation du caractère ou par une approche plus systématique sur l'ensemble du génome visant à tester si chaque région du génome intervient ou non dans la variation du caractère : « génome scan » ou QTL (quantitative trait loci) selon le type de populations utilisées. Les deux approches sont souvent combinées avec la recherche de co-localisations entre gènes candidats et QTLs. Chez les graminées fourragères, les différents types d'approches sont utilisés : (i) approche gène candidat sur la date de floraison ou la longueur de feuille (Auzanneau et al., 2011 ; Skot et al., 2007 ), (ii) recherche de QTLs pour de nombreux caractères comme la résistance aux stressés biotiques et abiotiques, la date de floraison, la composition biochimique et la morphogenèse (Barre et Julier, 2005 ; Barre et al., 2009 ; Barrett et al., 2007), (iii) combinaison des deux approches précédentes avec la co-localisation du gène

VrnA et d'un QTL de sensibilité à la vernalisation (Jensen et al., 2005 ; Andersen et al., 2006). Le nombre de gènes impliqués dans la variation de la plupart des caractères d'intérêt pour les sélectionneurs est élevé. De ce fait, une approche sur l'ensemble du génome dans des populations où le déséquilibre de liaison est important reste indispensable. Cette approche implique le génotypage d'un grand nombre d'individus pour de nombreux marqueurs (de l'ordre de 100 à 200) répartis sur le génome. De plus, le schéma de sélection classique des espèces fourragères comprend l'évaluation de descendances de polycross qui sont des familles de pleins-frères dans lesquelles le déséquilibre de liaison est important ce qui permet une recherche de QTLs (Pauly et al., 2012). Cette approche est bien entendue non exclusive d'une approche gène candidat pour quelques gènes dont la fonction aura été élucidée dans d'autres espèces.

Depuis une quinzaine d'années, le développement rapide des outils de marquage moléculaire a permis de mieux connaître la structuration de la diversité des espèces et le déterminisme génétique des caractères. Malgré un certain retard, le développement de marqueurs moléculaires publics chez les graminées fourragères est en bonne voie avec principalement des marqueurs STS (Sequence Tagged Site) et SSR (Simple Sequence Repeat) (Saha et al., 2004 ; Jensen et al. 2005 ; Studer et al., 2008 ; Bushman et al., 2011). Ces marqueurs sont d'une grande utilité pour étudier la structuration de la diversité chez les graminées fourragères. Cependant, leur nombre limité et leur coût de génotypage encore assez élevé ne permettront pas d'identifier les bases génétiques de caractères d'intérêt dans de nombreuses populations, ce qui serait pourtant nécessaire pour le développement à grande échelle de la SAM sur les graminées fourragères et à gazon. L'objectif de ce projet était donc de développer un outil permettant le génotypage à haut débit d'un grand nombre d'individus avec une centaine de marqueurs bien répartis sur l'ensemble du génome chez le ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.). Ce nombre de marqueurs est bien adapté pour des populations où le déséquilibre de liaison est élevé, ce qui est le cas dans les descendances de polycross utilisées par les sélectionneurs de plantes fourragères. Le ray-grass anglais est la première espèce semée dans les régions à climat tempéré humide pour des usages en fourrage et en gazon. D'autre part, le ray-grass anglais a l'avantage d'être diploïde ( $2n=14$  chromosomes) avec un génome de taille moyenne ( $1C=2,3$  Gbases) et est, de ce fait, utilisé comme espèce modèle pour les graminées fourragères pour les recherches en génomique.

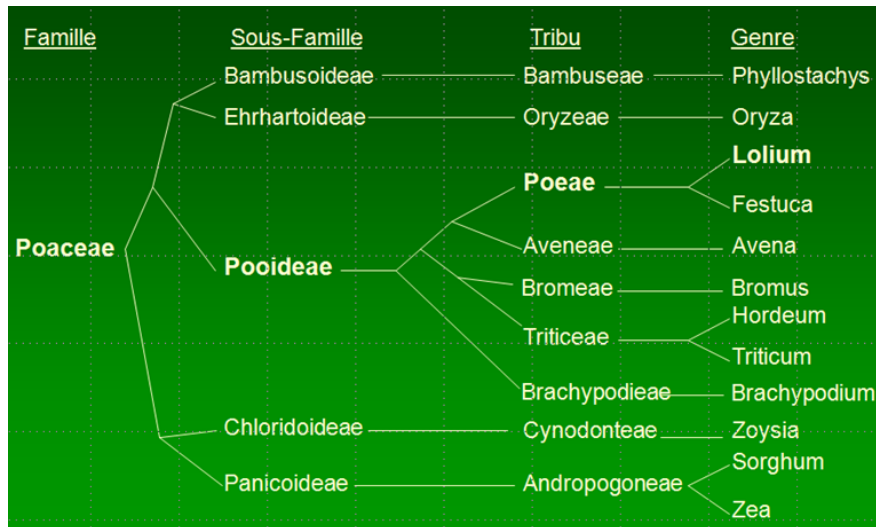
Le choix du type de marqueurs s'est porté sur les marqueurs SNP qui peuvent être trouvés sur l'ensemble du génome, et dont le coût de génotypage est plus faible que celui d'autres types de marqueurs. Cependant, leur développement nécessite un investissement important de séquençage afin de déterminer leurs positions. **Nous avons donc choisi de développer des amorces dans des régions conservées permettant d'amplifier un fragment de 150 à 700 bases incluant un intron en principe très polymorphe.** Ces amorces ont ensuite été utilisées sur les génotypes d'intérêt afin d'obtenir le polymorphisme de séquence nécessaire au développement des marqueurs SNP. **Ces amorces étant définies dans des régions conservées, elles sont largement transférables sur d'autres espèces de graminées fourragères et à gazon** souvent polyploïdes, mais d'intérêt majeur comme la fétuque élevée et le dactyle adaptés à une disponibilité en eau plus faible que le ray-grass anglais.

## 1- Développement d'amorces dans des régions conservées chez le ray-grass anglais

Afin d'obtenir des amorces permettant d'amplifier des fragments d'ADN chez plusieurs espèces de graminées et révélant du polymorphisme, la démarche a été de définir des amorces dans des régions conservées (exon) et encadrant un intron (plus polymorphe). Les régions conservées sont identifiées par comparaison des séquences de différentes espèces de graminées. De plus, ces amorces ont été choisies pour couvrir l'ensemble du génome en se basant sur des données de cartographie génétique chez le ray-grass d'Italie (Miura et al., 2007) et sur la séquence génomique de *Brachypodium distachyon* (International Brachypodium Initiative, 2010) (downloaded on phytozome March 2012). En

effet, il existe une bonne synténie (conservation de l'ordre des loci) entre les différentes espèces de graminées de manière générale, et au sein des *Pooideae* en particulier, groupe qui inclut les graminées fourragères tempérées, *Brachypodium* et le blé (Figure 1).

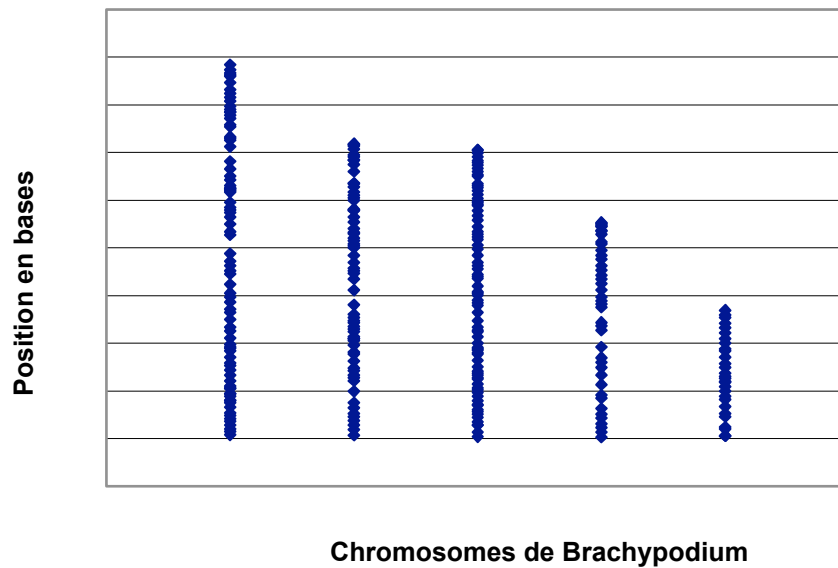
**Figure 1** : Arbre phylogénétique des graminées (*Poaceae*) d'après Kellogg (2001) et Torrecilla et Catalan (2002)



Suivant cette démarche, deux stratégies ont été adoptées pour la définition des amorces. La première a consisté à définir les amorces manuellement sur des alignements de séquences incluant au moins une séquence de ray-grass ou de fétuque et une séquence d'une autre graminée, ainsi qu'une séquence génomique pour l'identification des positions des introns/exons. Les séquences d'EST de *Lolium* et *Festuca* sont issues de la base de données de NCBI. Ces alignements ont permis de repérer les régions conservées ainsi que les introns. La compatibilité des amorces a été vérifiée à l'aide du logiciel Oligo6. La deuxième stratégie a été une méthode automatique permettant d'obtenir un grand nombre de couples d'amorces. Elle a utilisé le programme COS-finder développé par l'équipe de J. Salse (Quraishi et al., 2009). Ce programme comprend deux modules avec un premier module qui identifie les positions des introns et exons dans des gènes conservés et un deuxième module qui définit une liste d'amorces dans des exons et encadrant un intron. Dans notre cas, les séquences d'EST de ray-grass et de fétuques ont été utilisées avec les séquences des génomes de *Brachypodium*, du riz, du sorgho et du maïs. Un total de 6 252 couples d'amorces a été défini par cette stratégie. En plus de ces deux stratégies, des amorces publiées par Tamura et al. (2009) ont aussi été testées.

Au total 666 couples d'amorces (90 par la stratégie 1, 432 par la stratégie 2 et 144 de Tamura et al. (2009)) ont été testés sur sept génotypes de ray-grass anglais. **363 couples d'amorces (36 de la stratégie 1, 279 de la stratégie 2 et 48 de Tamura et al. (2009)) ont donné une amplification correcte sur les sept génotypes.** Ces couples sont répartis sur l'ensemble du génome de *Brachypodium* comprenant cinq chromosomes (Figure 2) et devraient donc être bien répartis sur les sept chromosomes du ray-grass anglais.

**Figure 2 :** Répartition sur le génome de *Brachypodium distachyon* des 363 couples d'amorces donnant une amplification correcte chez le ray-grass anglais



## 2- Transférabilité des amorces à d'autres graminées prairiales

Afin de pouvoir utiliser ces 363 couples d'amorces développés chez le ray-grass anglais sur d'autres espèces de graminées prairiales, nous les avons testées sur 11 espèces : *Festuca arundinaceae*, *L. multiflorum*, *F. glaucescens*, *F. pratensis*, *F. ovina*, *F. rubra*, *F. nigrescens*, *Dactylis glomerata*, *Alopecurus myosuroides* et *Agrostis capillaris*. Pour cela, deux génotypes par espèce ont été utilisés. Une amplification était considérée comme correcte lorsqu'au moins une bande était observée après migration sur gel d'agarose et lorsque le nombre de bandes était inférieur ou égal au niveau de ploïdie de l'espèce. Le pourcentage de couples d'amorces permettant une amplification correcte pour chaque espèce est présenté dans le Tableau 1. Au total, au moins 248 couples d'amorces sont disponibles pour chacune des espèces et 143 couples ont montré une bonne transférabilité chez les 11 espèces.

**Tableau 1:** Transférabilité des couples d'amorces du ray-grass anglais sur 10 espèces de graminées prairiales

Espèces*	Nombre de couples d'amorces	% de couples d'amorces
<i>L. perenne</i>	358	100
<i>L. multiflorum</i>	342	96
<i>F. arundinaceae</i>	350	98
<i>F. pratensis</i>	332	93
<i>F. glaucescens</i>	339	95
<i>F. rubra falax</i>	312	87
<i>F. nigrescens</i>	294	82
<i>F. ovina</i>	279	78
<i>D. glomerata</i>	283	79
<i>A. myosuroides</i>	248	69
<i>A. capillaris</i>	275	77

\*: Les espèces ont été classées selon leur proximité phylogénétique avec le ray-grass anglais (d'après Catalan et al (1997) et Torrecilla et Catalan (2002))

### 3- Polymorphisme de séquence chez le ray-grass anglais

Sur les 363 couples d'amorces amplifiant chez le ray-grass anglais, 343 ont été utilisés pour amplifier sept génotypes de cette espèce : 4 génotypes de variétés fourragères (Aberavon, Carillon, Gagny, Vigor) et 3 génotypes de variétés à gazon (Concerto, Marathon, Transate). La taille des amplicons variait de 150 bases à plus de 2 000 bases (Figure 3). Les amplicons ont été séquencés en utilisant les techniques 454 FLX et Junior (Roche) avec un système de marquage permettant d'identifier chaque génotype. Après analyse des données de séquençage, le nombre d'amplicons pour lesquels une information de séquence fiable (plus de 30 lectures pour 90% de l'amplicon) a été obtenu et variait de 83 à 203 selon les génotypes (Tableau 2). Ce nombre relativement faible est dû à une profondeur de séquençage trop faible pour certains génotypes et à une différence d'amplification ou de séquençage entre amplicons.

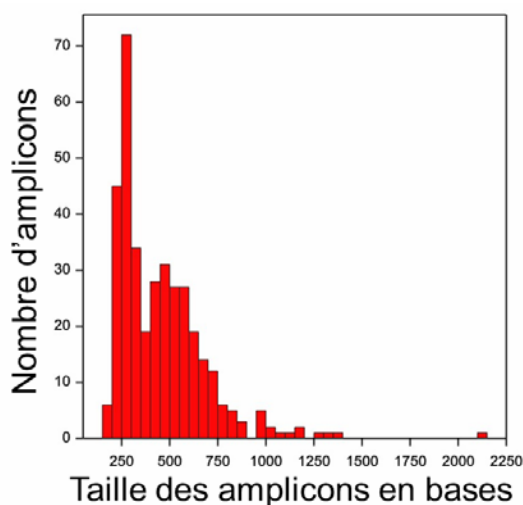


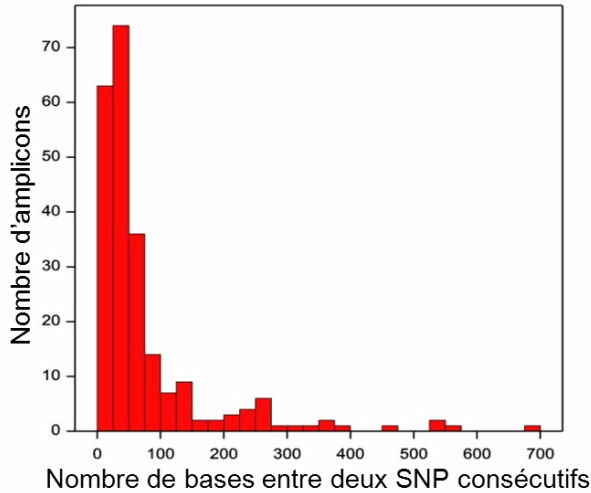
Figure 3 : Histogramme de la taille des amplicons

Tableau 2 : Nombre d'amplicons pour lesquels une séquence a été obtenue et niveau d'homozygotie

Variétés	Nombre d'amplicons	Nombre d'amplicons homozygotes	Pourcentage d'amplicons homozygotes
Aberavon	125	69	55
Carillon	83	50	60
Concerto	157	90	57
Gagny	203	101	50
Marathon	105	62	59
Transate	203	143	70
Vigor	150	85	57
Total	1026	600	58

Sur 251 amplicons (94 114 bases) pour lesquels une information de séquence était disponible, des SNPs ont été recherchés à la fois au sein des génotypes (hétérozygotie) et entre génotypes. Un total de 2 819 SNPs a été ainsi identifié. Le taux de polymorphisme variait de zéro SNP observé pour un seul amplicon à 700 bases / SNP (Figure 4) avec une médiane à 42 bases / SNP. Ce polymorphisme observé sur un nombre limité de génotypes est équivalent à celui classiquement observé chez le ray-grass anglais (Auzanneau et al., 2007). Le niveau d'homozygotie s'est révélé supérieur à celui attendu pour une espèce supposée très polymorphe et fortement auto-incompatible. Le pourcentage d'amplicons homozygotes atteint en effet 70% pour un génotype de la variété Transate (Tableau 2). Ce résultat pourrait être expliqué d'une part par un taux d'autofécondation supérieur à celui attendu au sein des polycross et d'autre part par le fait que certains allèles pourraient avoir des fréquences très élevées

dans les variétés. Ceci a été observé pour le gène Flowering Locus T dans une variété avec un allèle dont la fréquence atteignait 95% (Skot et al., 2011). Il semblerait que pour un locus donné, il existe de nombreux allèles très différents (beaucoup de SNP) au sein du ray-grass anglais, mais que, selon les populations, un nombre très limité d'allèles prévalent. Ceci reste à vérifier sur différentes populations (variétés et populations naturelles) et sur différents loci.



**Figure 4 :** Taux de polymorphisme intra- et inter-génotype par amplicon mesuré par le nombre moyen de bases entre SNPs.

Les SNP recherchés pour le génotypage des descendants d'un polycross doivent être hétérozygotes chez au moins un parent du polycross. Parmi les 294 SNPs identifiés sur les amplicons dont l'information de séquence était disponible pour les sept génotypes de ray-grass anglais, 19% ne présentaient du polymorphisme qu'entre parents et seulement 38% étaient hétérozygotes chez plus d'un génotype (Tableau 3). De ce fait, pour la majorité des amplicons, il a fallu développer des marqueurs SNP spécifiques d'un parent. Ceci signifie que pour suivre les allèles de l'ensemble des parents dans la descendance d'un polycross, il faudra utiliser plusieurs SNPs par locus (amplicon).

**Tableau 3 :** Pourcentage de SNP hétérozygotes chez plusieurs génotypes

Nombre de génotypes hétérozygotes	Pourcentage de SNP
0	19*
1	42
2	21
3	11
4	2
5	4
6	0
7	0

\*19% des SNP présentaient un polymorphisme uniquement entre génotypes

## Conclusion

Ces travaux ont permis le développement de 363 couples d'amorces répartis sur le génome des graminées et amplifiant des amplicons chez le ray-grass anglais. Ces amorces ont montré une excellente transférabilité aux principales espèces de graminées fourragères des régions tempérées (ray-grass d'Italie, fétuques et dactyle) moins étudiées au niveau génomique. Un polymorphisme important a été révélé chez le ray-grass anglais, mais de façon différente selon les génotypes. Les SNPs hétérozygotes chez un génotype (et donc informatifs pour la suite) ne sont en effet que rarement hétérozygotes chez les autres génotypes. Ceci a deux conséquences importantes. La première est qu'il est nécessaire de séquencer les génotypes d'intérêt (parents des polycross) pour identifier le polymorphisme informatif et développer des marqueurs SNP basés sur ce polymorphisme. La deuxième



est qu'il sera nécessaire de développer plusieurs marqueurs SNP par locus pour suivre les différents allèles dans la descendance d'un polycross. L'avantage de cette stratégie de séquençage d'amplicons, puis de développement de marqueurs SNP, applicable dans les populations à fort déséquilibre de liaison, sera à évaluer au cours du temps. La diminution du coût de séquençage permettra éventuellement de séquencer l'ensemble du génome des parents des polycross. De plus, de nouvelles opportunités pourront être offertes par le développement des techniques de génotypage par séquençage basées sur le séquençage d'une partie du génome (réduction de la complexité) pour l'ensemble des individus à génotyper.

### Remerciements :

Cette étude a été financée par le ministère de l'agriculture dans le cadre d'un contrat de branche (C2004-14), par l'INRA dans le cadre d'une AIP Bioressource (SNP-PRAIRIES) et par l'Association des Créateurs de Variétés Fourragères (ACVF). Les auteurs remercient : - P. Cormenier, D. Cadier, F. Durand, S. Delaunay, Jean-François Bourcier et Magali Caillaud (UR P3F Lusignan) pour leur travail sur les plantes et au laboratoire, - C. Pont (équipe de J. Salse) pour le logiciel COS-finder, - A. Bérard, A. Chauveau, R. Bounon, M. Tchoumakov (EPGV), C. Cruaud, P. Wincker, C. Caloustian, M. Delépine (Genoscope-CNG) pour leur travail de séquençage, - A. De la Soujole et M. Lécivain (SICASOV) pour la gestion du projet. Ils remercient également I. Armstead (IBERS Pays de Galle) et T. Asp (Univ. Aarhus, Danemark) pour la mise à disposition de séquences de ray-grass anglais ainsi que C. Délye et D. Allard pour la fourniture de feuilles de vulpin et d'agrostis.

### Références bibliographiques

- Andersen J.R., Jensen L.B., Lubberstedt T.L., 2006. Vernalization response in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) involves orthologues of diploid wheat (*Triticum monococcum*) VRN1 and rice (*Oryza sativa*) Hd1. *Plant Molecular Biology* 60, (4) 481-494.
- Auzanneau J., Huyghe C., Julier B., Barre P., 2007. Linkage disequilibrium in synthetic varieties of perennial ryegrass. *Theor Appl Genet* 115, 837-847.
- Auzanneau J., Huyghe C., Escobar-Gutiérrez A.J., Julier B., Gastal F., Barre P. (2011) Association study between the Gibberellic Acid Insensitive gene and leaf length in a *Lolium perenne* L. synthetic variety. *BMC Plant Biology* 11: doi:10.1186/1471-2229-11-183
- Barre P., Julier B., 2005. Recherche de QTL chez les espèces fourragères pérennes des régions tempérées. *Fourrages* 183, 405-418
- Barre P., Moreau L., Mi F., Turner L., Gastal F., Julier B., Ghesquière M., 2009. Quantitative trait loci for leaf length in perennial ryegrass. *Grass and Forage Science* 64, 310-321.
- Barrett B.A., Faville M.J., Sartie A.M., Jahufer M.Z.Z., Crush J.R., Hume D.E., Woodfield D.R., Easton H.S., 2007. QTL development and validation in forage plant mapping populations. Breeding and seed production for conventional and organic agriculture. Proceedings of the XXVI meeting of the EUCARPIA fodder crops and amenity grasses section, XVI meeting of the EUCARPIA Medicago spp group, Perugia, Italy, 2-7 September 2006. 307-311.
- Bushman B.S., Larson S.R., Tuna M., West M.S., Hernandez A.G., Vullaganti D., Gong G., Robins J.G., Jensen K.B., Thimmapuram J., 2011. Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) EST and SSR marker development, annotation, and transferability. *Theor Appl Genet*. 123, 119-29.
- Catalan P., Kellogg E.A., Olmstead R.G., 1997. Phylogeny of *Poaceae* subfamily *Pooideae* based on chloroplast *ndhF* gene sequences. *Mol. Phy. Evol.* 8, 150-166.
- Huyghe C., Duru M., Peyraud J.L., Lherm M., Gensollen V., Bournoville R., Couteaudier Y., 2005. Prairies et cultures fourragères: au carrefour des logiques de production et des enjeux environnementaux. INRA Editions, 209 p.
- International Brachypodium Initiative, 2010. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463(7282), 763-768

- Jensen L.B., Andersen J.R., Frei U., Xing Y.Z., Taylor C., Holm P.B., Lubberstedt T.L., 2005. 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.
- Kellogg E.A., 2001. Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiol* 125, 1198–1205
- Miura Y., Hirata M., Fujimori M., 2007. Mapping of EST-derived CAPS markers in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) *Plant breeding* 126, 353-360.
- Pauly L., Flajoulot S., Garon J., Julier B., Béguier V., Barre P. (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.* DOI 10.1007/s00122-011-1775-5
- Quraishi U.M., Abrouk M., Bolot S., Pont C., Throude M., Guilhot N., Confolent C., Bortolini F., Praud S., Murigneux A., Charmet G., Salse J., 2009. Genomics in cereals: from genome-wide conserved orthologous set (COS) sequences to candidate genes for trait dissection. *Funct. Integr. Genomics*. 9(4), 473-484
- Saha M.C., Rouf Mian M.A., Eujayl I., Zwonitzer J.O., Wang L., May G.D., 2004. Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species. *Theor Appl Genet* 109, 783-791.
- Skot L., Humphreys J., Humphreys M.O., Thorogoud D., Gallagher J., Sanderson R., Armsted I.P., Thomas I.D. 2007. Association of candidate genes with flowering time and water-soluble carbohydrate content in *Lolium perenne* (L.). *Genetics* 177, 535-547.
- Skøt L., Sanderson R., Thomas A., Skøt K., Thorogood D., Latypova G., Asp T., Armstead I., 2011. Allelic variation in the perennial ryegrass FLOWERING LOCUS T gene is associated with changes in flowering time across a range of populations. *Plant Physiol.* 155, 1013-1022.
- Studer B., Asp T., Frei U., Hentrup S., Meally H., Guillard A., Barth S., Muylle H., Roldan-Ruiz I., Barre P., Koning-Boucoiran C., Uenk-Stunnenberg G., Dolstra O., Skot K.P., Turner L. 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.) *Molecular breeding* 21, 533-548.
- Tamura K., Yonemaru J., Hisano H., Kanamori H., King J., King I.P., Tase K., Sanada Y., Komatsu T., Yamada T., 2009. Development of intron-flanking EST markers for the *Lolium/Festuca* complex using rice genomic information. *Theor Appl Genet* 118(8), 1549-1560.
- Torrecilla P., Catalán P., 2002. Phylogeny of broad-leaved and fine-leaved *Festuca* lineages (*Poaceae*) based on nuclear ITS sequences. *Systematic Botany* 27, 241-251.