HAL open science

La productivité semencière : l'enjeu du développement des hybrides Festulolium entre fétuque et ray-grass chez les graminées fourragères

Marc Ghesquière, Thierry Bourgoin, Jacques Hacquet

▶ **To cite this version:**

Marc Ghesquière, Thierry Bourgoin, Jacques Hacquet. La productivité semencière : l'enjeu du développement des hybrides Festulolium entre fétuque et ray-grass chez les graminées fourragères. Innovations Agronomiques, 2016, 50, pp.21-38. 10.15454/1.4721079268561484E12 . hal-01578285

HAL Id: hal-01578285

https://hal.science/hal-01578285v1

Submitted on 28 Aug 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

Innovations Agronomiques 50 (2016), 21-38

La productivité semencière : l'enjeu du développement des hybrides *Festulolium* entre fétuque et ray-grass chez les graminées fourragères

Ghesquière M.[1], Bourgoin T.[2], Hacquet J.[3]

[1] INRA, Unité de Recherche Pluridisciplinaire Prairies et Plantes Fourragères, Le Chêne, RD 150, BP 80006, 86600 Lusignan
[2] FNAMS, Fédération Nationale des Agriculteurs Multiplicateurs de Semences, 74, rue Jean-Jacques Rousseau, 75001 Paris
[3] Agri-Obtentions, Plate-forme Technique d'Innovation Variétale, 86600 Lusignan

Correspondance : Marc.Ghesquiere@lusignan.inra.fr

Résumé :

Les *Festulolium* sont des hybrides interspécifiques entre fétuque et ray-grass développés pour améliorer la production fourragère sous stress climatique, température et déficit hydrique. Il existe à ce jour 36 variétés inscrites au catalogue Européen dont 4 seulement au catalogue Français. Modifiée en 2004, la définition de *Festulolium* par l'Union Européenne peut recouvrir désormais une très grande diversité de formes ; 9 combinaisons amphiploïdes et plus de 60 formes introgressées à des degrés divers, de 14 à 42 chromosomes, dans 4 espèces de fétuque et 3 espèces de ray-grass dont le ray-grass hybride. Dans ce continuum de variation, le degré d'innovation en matière de performances fourragères reste encore fortement corrélé, et négativement, à la productivité en semences, ce qui conditionne fortement le développement des variétés. Le projet a eu pour objectif d'apporter de nouvelles données de variabilité génétique de la productivité de semences et des composantes de la fertilité, en essai et multiplication, entre variétés et descendances, et jusqu'au niveau de la plante individuelle pour en évaluer l'intérêt comme critère de sélection. Les résultats montrent que la productivité de semences est suffisamment restaurée chez des *Festulolium* après une seule génération de rétrocroisement dans un ray-grass de niveau tétraploïde, quel qu'il soit. En revanche, les formes amphiploïdes, qu'elles soient issues de *F. glaucescens* ou de *F. pratensis*, présentent un net déficit de productivité, aggravé d'une faculté germinative se dégradant rapidement après la récolte. L'amélioration de la productivité semencière doit ainsi constituer un objectif prioritaire chez les *Festulolium* amphiploïdes pour mieux faire valoir leur potentiel d'innovation dans un contexte de changement climatique. Pour encourager cet investissement de long terme, il est indispensable que la structure génétique des variétés de *Festulolium* candidates soit mieux identifiée à l'inscription et puisse déterminer des épreuves VATE également mieux ciblées.

Mots-clés: Amphiploïde, Introgression, Hybride interspécifique, Fétuque, Ray-grass, Stress abiotique, Tolérance à la sécheresse, Pérennité

Abstract: Seed productivity: a challenge for the development of *Festulolium* hybrid varieties between Fescue and ryegrass in the forage grasses

Festulolium are interspecific hybrids between *Festuca* and *Lolium* species bred to improve forage performances under climate stresses as low and high temperature and water deficit. Thirty-six varieties are presently registered in the European Union list of which, only four are in the French list. The *Festulolium* definition changed in 2004 in extending potentially to nine amphiploid combinations and more than sixty forms at various degree of introgression, diploid to hexaploid, into four fescue species and three *Lolium* species including hybrid rye-grass. In this range of continuous variation, the forage performances among *Festulolium* varieties are still negatively correlated with seed productivity which closely determines availability and benefits for end-users. The project aimed to provide further data on genetic variability of seed productivity and its components as pollen fertility among present varieties and

breeding plant material, up to individual plant level to be used as breeding criteria. The results showed that seed productivity is sufficiently restored in *Festulolium* as soon as they derive from one generation of back-crossing into any tetraploid ryegrass species. By contrast, amphiploid *Festulolium* whatever they come from, *F. pratensis* or *F. glaucescens*, still remained of low seed productivity which germination rate may fail rapidly to meet the 80 % requirement for seed marketing. Remodelling the genome balance in such *Festulolium* by speeding up interspecific recombination and using molecular tools seem the only mean to increase seed productivity before conventional breeding can take place usefully. To support this considerable long term investment by plant breeders, better identification of genetic structure of candidate *Festulolium* varieties is required, also defining better adequate tests for VCU.

Keywords: Amphiploid; Introgression; Interspecific hybrid; Fescue; Ryegrass; Abiotic stress; Drought tolerance; Persistency

1 - Intérêt des *Festulolium*

Les *Festulolium* sont des hybrides entre deux genres de graminées fourragères cultivées, les fétuque (*Festuca* sp.) et les ray-grass (*Lolium* sp.). Reconnus de façon ponctuelle mais depuis longtemps par les taxonomistes, ce n'est que dans les années 1950 que les travaux pour évaluer leur potentiel en amélioration fourragère ont démarré, parallèlement à la maîtrise des croisements contrôlés et du doublement artificiel du nombre chromosomique chez les graminées.

L'intérêt de l'hybridation fétuque x ray-grass s'impose assez facilement au plan agronomique ; le genre fétuque se caractérise par une excellente pérennité, en particulier par une tolérance aux stress climatiques, thermiques et hydriques extrêmes ; en revanche, leur teneur en fibres, la présence de composés biochimiques volatils, en font généralement des fourrages de digestibilité médiocre, peu appétant au pâturage. Les espèces de fétuque se caractérisent également par une vitesse d'installation lente conduisant à une faible productivité totale en première année et imposant une bonne maîtrise des adventices lors du semis.

Sur tous ces aspects, les espèces du genre *Lolium* font un contrepoint presque caricatural des fétuques. Avec une installation rapide et répondant fortement à la fertilisation azotée, ce sont les espèces permettant une production fourragère maximum dans les mois suivant le semis ; le ray-grass d'Italie (*L. multiflorum*) est ainsi souvent cultivé en culture dérobée avant une production estivale (maïs, Sorgho, Tournesol), leur digestibilité et appétibilité sont excellentes, la capacité de tallage élevée du ray-grass anglais (*L. perenne*) en fait une espèce idéale pour le pâturage (et le gazon).

La faiblesse des espèces du genre *Lolium*, et qui a suscité les travaux d'hybridation avec celles du genre *Festuca*, tient dans leur manque de pérennité. La pérennité du ray-grass d'Italie ne dépasse pas deux années et dans les situations climatiques les plus favorables ; celle du ray-grass anglais peut être nettement plus longue ; cependant, des températures élevées, associées à de forts déficits hydriques, bloquent rapidement toute croissance en limitant considérablement la productivité annuelle. En situation de prairies multispécifiques, et de façon caractéristique en mélange avec la fétuque élevée, l'arrêt de croissance du ray-grass anglais en conditions chaudes et sèches lui fait perdre l'avantage d'un tallage élevé et conduit à sa quasi-disparition dès la seconde année.

2 - Structure génétique et productivité en semences des *Festulolium* : approche historique

Le complexe *Festuca-Lolium* emprunte beaucoup à la structure de la diversité génétique des *Triticeae* et l'utilisation qui en est faite en amélioration avec les hybrides blé x seigle de *Triticale*. Des différences importantes existent cependant entre les deux systèmes dans le nombre des espèces susceptibles d'être utilisées en croisement, leur statut d'espèces cultivées ou spontanées et leur niveau de

différenciation, chromosomique notamment. Ainsi, et compte-tenu de la disponibilité désormais de formes tétraploïdes chez la fétuque des prés et les deux espèces de ray-grass, 6 combinaisons amphiploïdes (2n=4x=28) sont possibles, qui ont toutes été obtenues à ce jour et jusqu'à une échelle permettant une expérimentation agronomique. Si l'on ajoute le ray-grass hybride, amphiploïde lui-même *L. multiflorum* x *L. perenne*, ce sont 9 combinaisons amphiploïdes, d'hybrides simples ou trois voies, qu'il est possible de développer en variétés de *Festulolium*.

Jusqu'en 2004, la définition de *Festulolium* par l'UPOV se limitait à la seule combinaison *L. multiflorum* x *F. pratensis* avec une unique variété, *Paulita* (Netzband, 1991) inscrite au catalogue européen. L'extension de la définition par la directive 2004/55/EC a considérablement bouleversé le contexte de l'inscription des variétés de *Festulolium* et leur développement sur le marché des semences. Selon la nouvelle définition, pouvait être qualifié de *Festulolium*, « tout hybride résultant de croisement d'une espèce de ray-grass avec une espèce de fétuque », mais sans faire référence au nombre chromosomique ni à la généalogie de la variété, en particulier si sa sélection avait comporté des étapes de rétrocroisement dans l'une ou l'autre espèce parentale. Ainsi, d'une seule forme amphiploïde, la nouvelle définition pouvait-elle concerner désormais non seulement l'ensemble des 9 combinaisons amphiploïdes évoquées plus haut mais aussi les 63 combinaisons qu'il est possible de dériver par introgression des 3 x 3 = 9 hybrides amphiploïdes par les 6 + 1 = 7 espèces parentales si l'on ajoute la fétuque élevée.

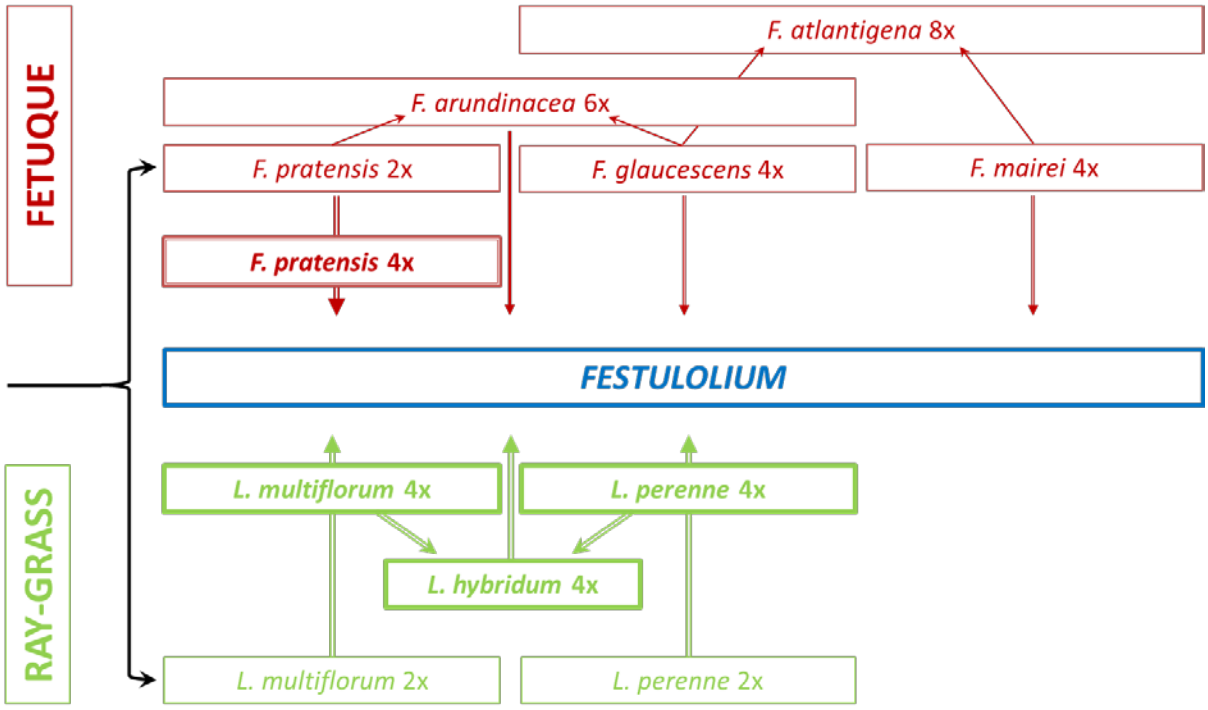

Figure 1 : Le complexe polyploïde *Festuca-Lolium* et les espèces progénitrices des variétés de *Festulolium* : 9 combinaisons amphiploïdes 4x et 63 combinaisons possibles par introgression de 2x à 6x (2x=14 chromosomes). *F. pratensis* et *L. multiflorum* dérivent d'un ancêtre commun. Les flèches obliques rouges décrivent la différenciation naturelle en espèces par allopolyploïdisation chez le genre *Festuca*. Il est admis que *L. perenne* dérive de *L. multiflorum* au cours de sa migration en Europe. Les flèches doubles indiquent un doublement artificiel du nombre chromosomique, il existe toutefois des formes spontanées de fétuque des prés tétraploïdes, *F. pratensis* subsp. *apennina*. *F. glaucescens* est aussi dénommée *F. arundinacea* subsp. *fenas*. Il existe enfin une forme décaploïde, 10x, de fétuque, *F. letourneuxiana*, dérivé allopolyploïde de *F. atlantigena* et d'une autre espèce diploïde non déterminée (Ghesquière et Jadas-Hécart 1995).

La forme de variétés synthétiques chez les espèces fourragères n'oblige pas plus dans un cadre interspécifique qu'elles soient fixées ni même à l'équilibre du point de vue génétique ; la seule condition permettant l'inscription au catalogue européen étant la satisfaction de règles DHS définies par l'UPOV, de plus, sur une base seulement phénotypique. Sans contrainte a priori sur le nombre de rétrocroisements des plantes-mères de variétés de *Festulolium*, ni contrôle a posteriori de leur degré d'introgression réel par des méthodes de cytogénétique moléculaire encore peu accessibles, la nouvelle définition a eu pour conséquence de rendre éligible comme *Festulolium* un gradient extrêmement continu de variétés, depuis la fétuque (des prés ou élevée) jusqu'au ray-grass (d'Italie ou anglais). Distinguables au sens de l'UPOV, des variétés de *Festulolium* pouvaient néanmoins rester très proches des performances agronomiques des espèces parentales dont elles dérivaient par rétrocroisement, au point de ne pas dégager de différences significatives en essai ou considérées comme telles par les utilisateurs.

L'extension de la définition en 2004 a été concomitante avec la 5ème extension de l'Union Européenne à 25 pays-membres dont la Pologne et la République Tchèque, pays à forte expérience sur *Festulolium* mais sans réel moyen d'évaluation officielle jusqu'alors. Le catalogue communautaire s'est trouvé ainsi augmenté de façon automatique en variétés de *Festulolium* mais dont la valeur d'utilisation était pratiquement inconnue dans la plupart des pays de l'UE. L'ouverture de l'UE a été aussi l'occasion d'une réorganisation des entreprises de semences pour adapter leur recherche et la diffusion des variétés au nouveau marché européen. En reprenant la station de recherche publique de *Hladke Životice* en République Tchèque, la société danoise *DLF-Trifolium* s'est trouvée à la tête du plus important, et diversifié, portefeuille de variétés de *Festulolium* jamais sélectionnées jusqu'alors (Fojtik, 1994) ; la reprise par la même société du programme de sélection fourragère de *Limagrain* avec l'établissement d'accords commerciaux en France ouvrait un marché sans précédent aux variétés de *Festulolium* qu'elle détenait désormais.

En France, le catalogue *Festulolium* n'a été ouvert qu'en 2005 avec l'inscription d'une variété amphiploïde *L. multiflorum* x *F. pratensis* (*Lifema*) puis de 3 variétés issues de la nouvelle combinaison amphiploïde, *L. multiflorum* x *F. glaucescens*, sélectionnée par l'unité INRA de Lusignan, *Lueur* en 2007 puis *Luxane* et *Lusilium* en 2008. Parallèlement, deux variétés de *Festulolium* sous la nouvelle définition, *Lofa* et *Matrix*, connaissaient un développement exceptionnel en Europe, et en France en particulier (plus de 2 000 qx/an). Bénéficiant du statut de variété communautaire, il n'était pas nécessaire de ré-inscrire ces deux variétés à un catalogue national prévoyant des épreuves VATE, comme en France, mais qui auraient permis de vérifier leur valeur agronomique. Il était notoirement connu que les variétés *Lofa* et *Matrix* dérivaient toutes deux de rétrocroisement, dans le ray-grass d'Italie pour *Lofa*, dans le ray-grass anglais, diploïde de surcroît, pour *Matrix*, mais sans savoir quel était le niveau réel de l'introgression. Ultérieurement, Kopecky et al (2006) montraient par cytogénétique moléculaire que celle-ci avait été restrictive au point de ne plus trouver trace de génome de fétuque dans les deux variétés. Rapidement, celles-ci se sont avérées décevantes en matière de pérennité et/ou de maintien de la productivité en conditions sèches, et d'autant plus que leur commercialisation comme *Festulolium* ou d' « hybride Fétuque x ray-grass » laissait supposer des performances au moins de niveau intermédiaire aux espèces parentales. L'image du *Festulolium* renvoyée par *Lofa* et *Matrix* en France a d'ailleurs été tellement dégradée depuis lors qu'elles n'y sont plus commercialisées actuellement que comme ray-grass et non plus de *Festulolium*.

Par contraste, le marché des variétés de *Festulolium* à structure typiquement amphiploïde comme *Lifema* et *Lueur* ne se développait pratiquement pas en France alors que leur valeur agronomique avait été mieux reconnue, au moins au travers des épreuves VATE réalisées pour leur inscription. Si la structure génétique des variétés de *Festulolium* paraissait déterminer encore étroitement leur valeur innovante d'hybride interspécifique, il semblait de plus en plus évident qu'elle déterminait non moins directement leur productivité en semences, mais en sens inverse ; de sorte que les *Festulolium* méritant le plus leur dénomination restaient introuvables sur le marché et que les *Festulolium* les plus

disponibles ne présentaient rien de la valeur hybride attendue, à la grande confusion des prescripteurs et utilisateurs.

Dans ce contexte, le projet initié en 2008 a eu pour objectif de documenter plus précisément la productivité en semences des variétés de *Festulolium*, ses relations avec la structure génétique et les espèces impliquées dans l'hybridation ou l'introgression, et d'évaluer dans du matériel en sélection des critères et méthodes susceptibles de l'améliorer.

3 - Matériel végétal

Le matériel végétal expérimenté dans le cadre du projet a consisté en :

- 12 variétés de *Festulolium* ou variétés candidates à l'inscription : 8 à structure amphiploïde, dont 5 par *F. pratensis* et 3 par *F. glaucescens*, et 2 variétés issues d'introgression, soit dans le ray-grass d'Italie, soit dans le ray-grass anglais (Tableau 1) ;
- 10 variétés témoins ou population des 3 espèces parentales de fétuque et 2 espèces de ray-grass, incluant le ray-grass hybride ;
- 212 descendances demi-frères issues du programme de création variétale engagé depuis 1983 par l'INRA à partir de la combinaison *L. multiflorum* x *F. glaucescens* et ayant abouti à l'inscription des variétés *Lueur*, *Lusilium* et *Luxane*. 176 descendances étaient à structure amphiploïde, 27 provenaient d'introgression dans le ray-grass anglais et 9 dans le ray-grass d'Italie ; l'ensemble regroupait 15 polycross dont la totalité des descendances avaient été récoltées individuellement ;
- 12 populations consistant en un mélange équilibré (M1) de toutes les descendances issues d'un même polycross et de même structure génétique, amphiploïde ou introgressée, et pour 4 d'entre eux, jusqu'à 2 générations successives de multiplication et de récolte aussi en mélange (M2 à M4) ;
- la toute première population F2 des hybrides *L. multiflorum* x *F. glaucescens* obtenus en 1987 et à partir de laquelle toutes les autres populations ont été sélectionnées (Ghesquière et al, 1996).

Festulolium issus d'introgression	Combinaison parentale	1ère année d'inscription	Mainteneur	Référence
Lofa	Lm (Fa)	2000	DLF - Trifolium Hladke Životice, s.r.o. (CZ)	Fojtik (1994)
F99.4	Lm (Fg)	Expérimental	INRA/URP3F	
FBA-01.1	Lp (Fg)	Expérimental	INRA/URP3F	
Duo^{AO}	Lp (Fp)	?	USA	
Festulolium amphiploïdes				
Paulita^{AO}	Fp x Lm	2004	DLF Trifolium A/S	Netzband (1991)
Felopa	Fp x Lm	1998	Danko Hodowla Roślin sp. z.o.o. (PO)	Zwierzykowski et al (1998)
Sulino^{FNAMS}	Fp x Lm	1998	Danko Hodowla Roślin sp. z.o.o. (PO)	
Lifema	Lm x Fp	2006	Eurograss Breeding GmbH (DE)	
Achilles^{FNAMS}	Lm x Fp	2005	DLF - Trifolium Hladke Životice, s.r.o. (CZ)	
Lueur	Lm x Fg	2007	Agri-Obtentions (FR)	Ghesquière et al (1993, 1996)
Luxane	Lm x Fg	2008 (2011)	Agri-Obtentions (FR)	
Lusilium	Lm x Fg	2008 (2011)	Agri-Obtentions (FR)	
		Témoins d'espèce parentale		
Lm	Lm x Lp	Fp	Fa	Fg

Tonyl	*AberExcel*	*Préval*[FNAMS]	*Aprilia*[FNAMS]	
Fastyl[AO]	*Delicial*[AO]	*Stella*[AO]	*Barolex*[AO]	*F. glaucescens*[AO]
			Dulcia[AO]	
			Lunibelle[AO]	

Tableau 1 : Dénomination des variétés témoins et de *Festulolium* utilisées en commun ou spécifiquement par la FNAMS ou *Agri-Obtentions* (AO) dans les essais de production de semences. L'espèce receveuse des variétés de *Festulolium* issues d'introgression précède l'espèce donneuse entre parenthèses ; l'espèce utilisée comme parent femelle précède l'espèce utilisée comme parent mâle chez les variétés de *Festulolium* amphiploïdes. Fp : *F. pratensis* ; Fg : *F. glaucescens* ; Fa : *F. arundinacea* ; Lm : *L. multiflorum* ; Lp : *L. perenne*. Les variétés de *Festulolium* et de ray-grass hybride Lm x Lp sont toutes tétraploïdes ; les variétés témoins d'espèce pure sont toutes présentes sous leur nombre chromosomique naturel sauf *Tonyl* et *Lunibelle*, de 4x et 12x (resp.). L'année indique la date de 1ère inscription dans un des pays-membres de l'UE avec éventuellement l'année de radiation du catalogue entre parenthèses.

4 - Méthodes

Les expérimentations ont consisté en essais parcellaires de production de semences suivant les protocoles de la FNAMS. Le projet a mis en œuvre 6 essais :

- un essai de 244 génotypes implanté par *Agri-Obtentions* sur le site de Lusignan en Oct. 2007 et récolté deux années de suite, en 2008 et 2009. Compte-tenu du nombre exceptionnellement élevé de génotypes, deux répétitions en parcelles de 3.1 m² ont été utilisées. Outre les 225 génotypes échantillonnant les différentes générations de sélection, l'essai incluait 10 variétés inscrites de *Festulolium* ou expérimentales et 9 variétés témoins d'espèces pures (Tableau 1).
- 5 essais identiques de 14 variétés suivis par la FNAMS et dans 2 lieux, Lusignan et Bourges, selon différentes modalités :
    - Lusignan :
        - essai B : semis le 8 sept 2008, récolte en 2009 puis 2010 ;
        - essai C : semis le 19 mars 2009, sous couvert de pois, récolte en 2010 puis 2011 ;
        - essai D : semis le 2 sept 2009, récolte en 2010 puis 2011.
    - Bourges
        - semis le 9 sept 2008, récolte en 2009 ;
        - semis le 2 sept 2009, récolte en 2010 puis 2011.

  Les 5 dispositifs ont tous été constitués de parcelles de 2m x 10 m en 4 blocs complets, les 14 génotypes comprenaient 4 témoins d'espèces et 10 variétés de *Festulolium*, dont 8 communes avec l'essai implanté par *Agri-Obtentions* (Tableau 1). Outre les données de production de semences, diverses observations ont été réalisées en parcelle : précocité d'épiaison, densité de tiges à la récolte, remontaison en été.

Une des originalités du projet a consisté à mesurer la productivité de semences au niveau de plantes individuelles par la récolte de cent tiges échantillonnées par plante et après ensachage pour éviter tout égrenage. L'objectif était d'évaluer différents effets, critiques pour raisonner l'amélioration de la productivité semencière par sélection : 1) effet dispositif, plante espacée *vs*. parcelle dense ; 2) effet isolement pollinique, polycross *vs*. pépinière et 3) héritabilité de la productivité de semences, plante-mère *vs*. descendance demi-frère. En conditions espacées, la valeur propre d'une plante a été estimée comme la moyenne de 5 à 10 de ses clones, soit en randomisation dans un polycross (isolement), soit sur une même ligne dans une pépinière de conservation (fécondation libre). Par contraste, la valeur des plantes-mères en descendance a toujours été évaluée en dispositif expérimentaux à 3 blocs complets au moins, que ce soit en conditions de plantes espacées (3 blocs x 10 plantes/bloc), ou denses (3 blocs x 1 parcelle/bloc), mais toujours en conditions non isolées et de ce fait, favorables à la fécondation par la simple présence de témoins d'espèces pures.

Les récoltes individuelles ont été battues manuellement tandis que les récoltes en parcelles ont été battues mécaniquement mais de façon à ne pas écarter les graines de faible taille, caractéristiques de l'hybridation interspécifique par un faible développement de l'albumen malgré la formation d'un embryon viable. En parcelle, le différentiel de poids à la récolte en sortie de moissonneuse avec celui après battage fin a été utilisé pour estimer un taux de stérilité à cette échelle, graines sans albumen et enveloppes de fleurs non fécondées, entre les différentes formes de *Festulolium*. En tri manuel, la présence de sclérotes d'ergot a été souvent remarquée, ce qui témoigne aussi d'une fécondation anormalement étalée du fait d'un déficit quantitatif de pollen dont profite le champignon pour s'installer.

Le poids de 1000 grains a été évalué dans les quelques mois suivant la récolte des essais au compteur de grains Numigral ainsi que la faculté germinative après priming dans de l'eau à 4°C. La faculté germinative a été ré-évaluée une nouvelle fois en juin 2011 pour l'ensemble des essais récoltés en 2009 et 2010 pour contrôler son évolution au cours du temps.

La fertilité mâle a été estimée par coloration de pollen au carmin acétique à 1% de façon classique par dénombrement visuel entre grains bien colorés et grains insuffisamment colorés ou déformés après saupoudrage d'anthères mures sur une lame et calcul du pourcentage de grains fertiles. Une méthode plus quantitative de la fertilité a été expérimentée en réalisant une suspension homogène dans un microtube de la totalité des grains de pollen contenus dans les trois anthères d'une fleur et comptage du nombre total de grains fertiles. Le comptage a été effectué après saisie d'image à la loupe binoculaire sous grossissement X2 ou X67 et par au moins six champs échantillonnés sur une lamelle 24 x 40 mm. Pour raccourcir les observations, deux macros ont été programmées sous le logiciel Image J et évaluer la possibilité d'un dénombrement automatique des grains de pollen après saisie à la caméra des champs à la binoculaire. En 2011, plus de 7000 lames ont été ainsi préparées pour un total de 835 fleurs récoltées. La période de collecte de pollen se réduisant au mois de juin, les prélèvements d'inflorescence ont été réalisés par échantillonnage en parcelle et pépinière dans les essais disponibles sur le site de Lusignan : témoins d'espèce pure en fétuque (*Aprilia*) et ray-grass (*Tonyl*), variétés de *Festulolium* amphiploïdes (*Felopa*, *Lifema*, *Lueur*) et introgressées (*FBA-01.1* et *F99.4*) et 5 descendances amphiploïdes *L. multiflorum* x *F. glaucescens* à production de semences contrastée (*9277, 9423, 9424, 8927 et 8943*).

5 - Résultats

5.1 Productivité de semences en multiplication

Les Ets Jouffray-Drillaud ont rapporté les résultats de leurs campagnes de multiplication 2006 et 2007 de la variété *Felopa* (*L. multiflorum* x *F. pratensis*) engagées sur des surfaces de 2 à 11 ha dans 6 départements, Vienne, Vendée, Deux-Sèvres, Cher, Loir et Cher et Sarthe. En première année, le rendement a dépassé 7.7 q/ha et jusqu'à atteindre 11.3 q/ha dans 6 lieux sur 7 avec un seul rendement très faible dans la Sarthe (2.6 q/ha). La faculté germinative était cependant déjà inférieure au seuil réglementaire de 80 % dans 5 lieux sur 7. La seconde année de récolte a été en revanche très décevante avec des rendements inférieurs à 4.7 q/ha sur les 5 implantations qui avaient été maintenues, toutes à moins de 80 % de faculté germinative et pour tomber à moins de 68 % un an après la récolte. Ces mauvais résultats ont conduit les Ets Jouffray-Drillaud à renoncer dès le début du projet à poursuivre la multiplication de la variété *Felopa*, sélectionnée en Pologne mais dont la France pouvait présenter un marché intéressant.

5.2 Productivité de semences en essai

La productivité moyenne a été très variable entre essais, de 11.45 q/ha à 5.22 q/ha, systématiquement plus élevée à Bourges qu'à Lusignan, et en première année de récolte qu'en seconde année. La sécheresse exceptionnelle du mois d'avril 2011 a eu un impact considérable sur la production de la dernière série d'essais semée en 2009 ; en deuxième année de récolte, leur production n'a pas

dépassé 3.75 q/ha au point de ne pas permettre de différencier significativement les variétés. De façon générale, les essais montrent qu'une conduite annuelle de la production de semences des variétés de *Festulolium*, après un semis d'automne précoce, reste la plus favorable. Il n'a pas été vu d'avantage particulier à un semis de printemps sous couvert de pois, la plante de couverture pouvant être trop compétitive vis-à-vis de la variété de *Festulolium*.

Entre espèces parentales, les rendements du ray-grass d'Italie et, dans une moindre mesure, ceux du ray-grass hybride ont été très supérieurs à ceux des deux variétés témoins de fétuque, notamment à Bourges ; ce n'est qu'à Lusignan, en conditions plus sèches et en deuxième année de récolte, que les témoins de fétuque élevée ont pu dépasser les variétés de ray-grass. Les variétés de *Festulolium* se classent ensuite assez directement suivant leur nature avec, dans l'ordre, les variétés issues d'introgression, les variétés amphiploïdes par *F. pratensis* puis celles par *F. glaucescens*, avec une forte variabilité au sein de chacun de ces deux derniers groupes (Figure 2).

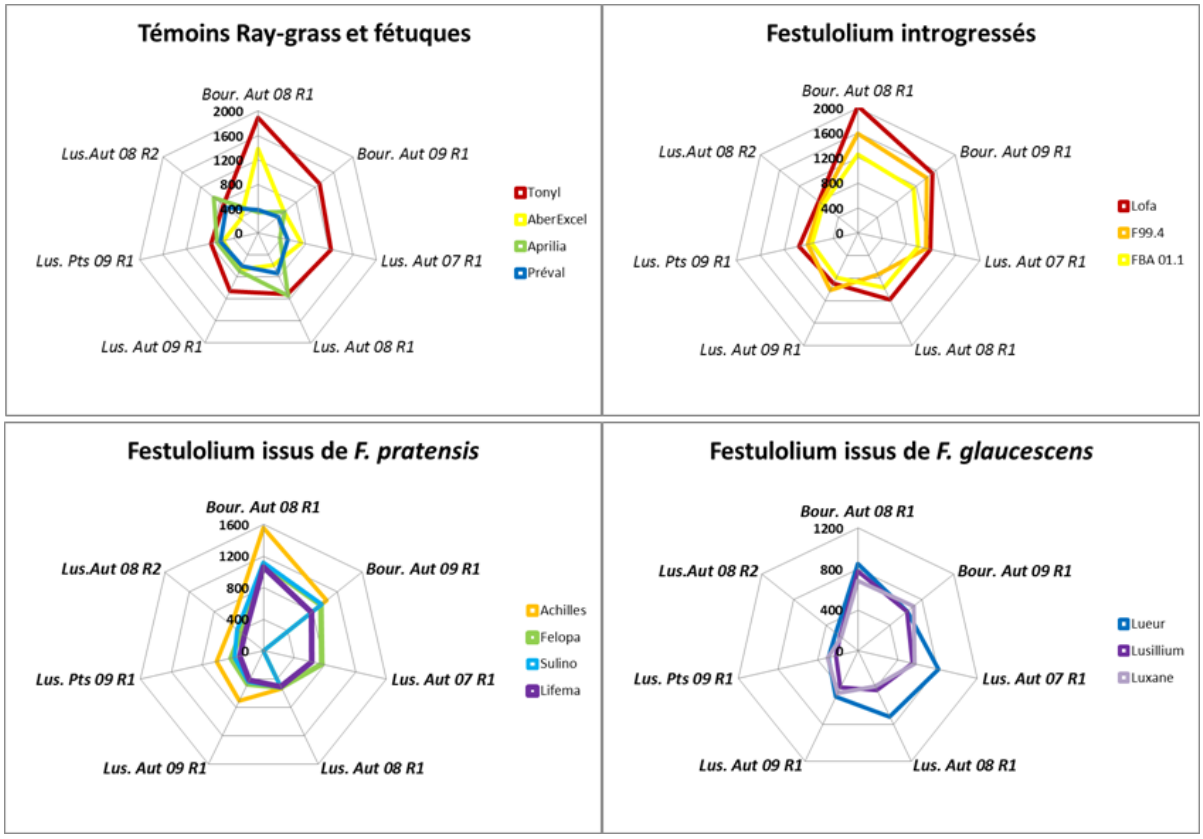

Figure 2 : Productivité semencière (en kg/ha) observée entre variétés de *Festulolium* issues d'introgression dans le ray-grass ou amphiploïdes par *F. pratensis* ou *F. glaucescens*. Résultats de 3 essais semés à Lusignan (Lus.) à l'automne (Aut.) 2008 et 2009 ou au printemps (Pts) 2009 et de 2 essais semés à Bourges (Bour.) à l'automne 2008 et 2009, récoltés en première année (R1) ou deuxième année (R2). Echelle différente entre figures.

Les caractères d'implantation, de précocité, de verse à la récolte ou de densité d'épis ne sont pas apparus particulièrement corrélés au rendement en semences ni limitant entre variétés de *Festulolium*, même parfois à un niveau plus favorable que celui des témoins de fétuque des prés ou fétuque élevée en première année de récolte. Parmi les composantes du rendement, le poids spécifique des grains rapproche nettement les variétés amphiploïdes par *F. glaucescens* des témoins fétuque avec les plus faibles valeurs mais relativement insensiblement aux conditions de sécheresse de 2011 alors que celle-ci a beaucoup diminué le poids spécifique de l'ensemble des autres variétés, témoins et *Festulolium* de toutes origines (Figure 3).

La variabilité de la productivité de semences observée entre *Festulolium* permet dans certains cas de remettre en question leur structure génétique réelle. Ainsi, la variété *Achilles* paraît plus proche d'un *Festulolium* issu d'introgression que d'un réel amphiploïde; toutefois, sa plus grande précocité d'épiaison (-3 à -11 jours) a pu contribuer à une productivité supérieure, notamment en année sèche. La variété amphiploïde *Paulita*, observée seulement dans l'essai implanté à Lusignan en 2007, se montre aussi d'une productivité plus proche d'une variété introgressée que de celle d'un amphiploïde. Cette variété parmi les *Festulolium* les plus anciens confirmerait le caractère évolutif des combinaisons amphiploïdes chez lesquelles une perte des chromosomes de fétuque a pu être observée au cours de générations successives de multiplication (Zwierzykowski et al, 2006), et qui pourrait alors être associée à une restauration significative de la production de semences. Un défaut de productivité du témoin de fétuque élevée en première année de récolte, à Bourges notamment et à Lusignan après un semis tardif, est également observé et doit être imputable à un manque de vernalisation auquel la fétuque est nettement plus sensible que le ray-grass. Hormis ces situations, les variétés de *Festulolium* amphiploïdes restent caractérisées par un rendement de l'ordre de 50 % inférieure au témoin Fétuque élevée. Parmi celles-ci, et seulement dans la situation particulière des conditions séchantes de Lusignan, seule une variété issue de *F. glaucescens* (*Lueur*) dépasse une variété amphiploïde tirée de *F. pratensis* (*Felopa*).

Figure 3 : Poids spécifique moyen des 3 essais à Lusignan et des 2 essais à Bourges récoltés en 2009 et 2010 contre celui à la récolte 2011 (2 essais à Lusignan, 1 essai à Bourges). Témoins parentaux en symbole plein, vert : Fétuques, orange : ray-grass ; *Festulolium* en symbole ouvert, issus d'introgression : orange ; amphiploïde par *F. pratensis* : violet, par *F. glaucescens* : vert.

5.3 Variabilité génétique de la productivité en semences et amélioration

L'étude s'est basée sur la première récolte en 2008 de l'essai suivi par *Agri-Obtentions*, d'un niveau moyen nettement plus élevé qu'en seconde année et plus significatif entre descendances.

La régression du poids de semences à la récolte et après battage montre que le taux de déchets se monte à 28 % parmi les témoins variétaux d'espèces pures et de *Festulolium*. Le taux s'élève ensuite à 37 % entre descendances issues d'introgression dans le ray-grass anglais pour atteindre 48 % en moyenne parmi les 176 descendances amphiploïdes. Relativement aux témoins, un niveau amphiploïde entraine ainsi un déficit de productivité de semences de 38 %, mais se rétablissant à 13 % après une première génération de rétrocroisement (Figure 4).

Ceci étant, une grande variabilité est observée entre descendances (figure 5); la variance génétique totale de la productivité a été estimée à 1.35 q/ha pour une variance erreur de 1.99 q/ha. Entre polycross, et dans les polycross, la variance génétique reste du même ordre de grandeur, 42 % et 58% respectivement. Cependant, la variance moyenne entre descendances après une génération de rétrocroisement dans *L. perenne*, 2.80 q/ha, est significativement supérieure à celle entre

descendances amphiploïdes (F = 1.23, P = 0.023). Cela confirme que l'appariement entre chromosomes homologues reste très fort chez les amphiploïdes *L. multiflorum* x *F. glaucescens* et que le maintien d'un niveau élevé d'hétérozygotie à l'échelle du génome qui en résulte reste profondément antagoniste de la productivité semencière.

Figure 4 : Taux de déchets (g/g) à la récolte entre descendances demi-frères de *Festulolium* issus de *F. glaucescens*, soit amphiploïde, soit par introgression, dans *L. multiflorum* ou dans *L. perenne*. Première année de récolte (2008) de l'essai semé par *Agri-Obtentions* à Lusignan à l'automne 2007.

La distribution de la productivité de l'ensemble des descendances amphiploïde, couvrant jusqu'à 7 générations de sélection, est presqu'exactement centrée sur la valeur observée chez la population F2 initiale, 6.16 q/ha. Comparé aux trois variétés inscrites à partir de cette population, leur performance montre qu'il y a eu amélioration significative de la productivité en semences chez la variété *Lueur* (8.1 q/ha) mais diminution chez les deux autres, Lusilium (5.5 q/ha) et Luxane (5.7 q/ha).

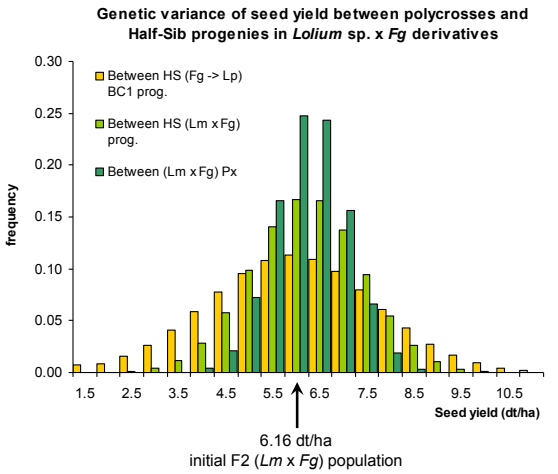

Figure 5 : Distribution de la productivité de semences (q/ha), 1) entre descendances demi-frères, soit amphiploïdes *L. multiflorum* x *F. glaucescens*, soit après rétrocroisement dans *L. multiflorum* ou *L. perenne* et 2) entre polycross, sur plusieurs générations de sélection. La productivité de la population F2 génératrice de l'ensemble des descendances observées est estimée à 6.16 q/ha.

Toutefois, comme dans le cas des variétés *L. multiflorum* x *F. pratensis* et réciproques, on observe bien que les 2 à 4 générations de multiplication nécessaires à la production de semences commerciales, tendent bien à augmenter la productivité, de l'ordre de 20% en moyenne, parmi les 6 généalogies suivies depuis le polycross initial.

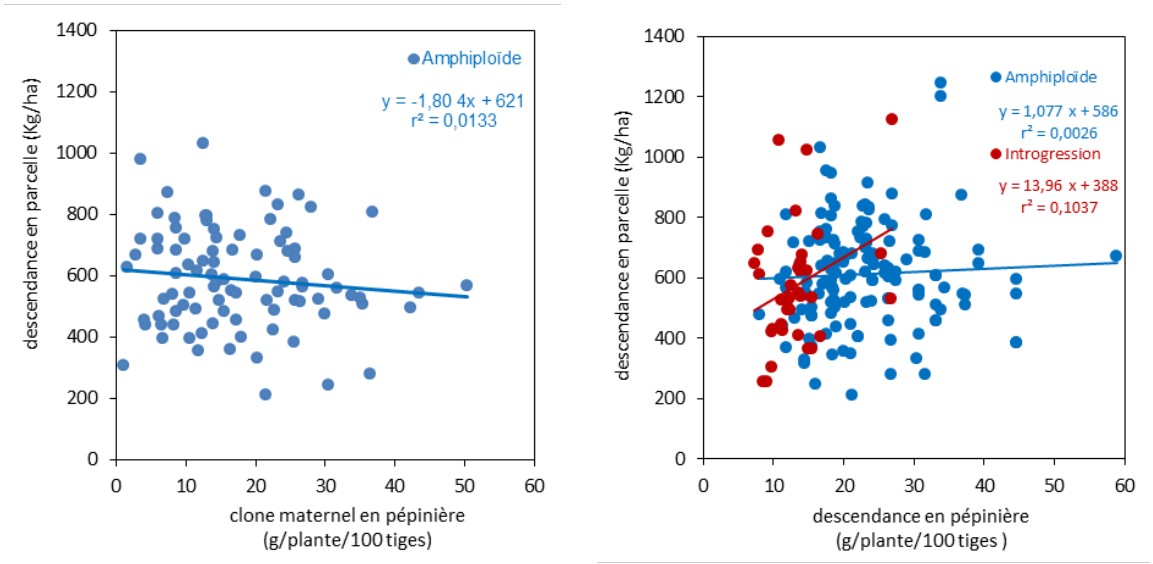

Figure 6 : Relation de la productivité de semences de descendances demi-frères entre plantes espacées en pépinière et en parcelles d'essai : plantes espacées des descendances elles-mêmes (gauche), plante-mères des descendances (droite).

A l'échelle de plantes espacées, la relation de la productivité de semences entre plantes-mères et descendances, définition même de l'héritabilité du caractère, est extrêmement faible, voire négative, et ne peut constituer un niveau de sélection efficace (Figure 6). A même génération, le contraste du poids moyen de grains par tige entre les deux structures génétiques suggère que le nombre de grains par tige des formes amphiploïdes est supérieur à celui des formes introgressées, et d'autant plus que le poids spécifique du grain est nettement défavorable aux premières (Figure 3). La taille des tiges et leur ramification fréquente en panicules peuvent être une explication à cette supériorité ; quoiqu'il en soit, le contraste de la corrélation entre formes amphiploïdes et introgressées souligne clairement que le poids de grains par tige en plantes espacées ne constitue plus du tout une prédiction pertinente de la productivité de semences en parcelles d'essai quand la structure de la variété est amphiploïde et que des limitations d'une autre nature doivent intervenir, plus liées à la fertilité intrinsèque des organes sexués qu'à leur nombre, et plus intensément que lorsque la structure génétique est issue d'introgression.

5.4 Fertilité pollinique

Les essais de dénombrement des grains de pollen par analyse d'image ont donné de bonnes corrélations en 2010 (r^2 = 0.80) mais qui n'ont pas été confirmées en 2011 en raison d'une plus grande variabilité de coloration des préparations et sans doute aussi, d'une plus grande gamme de variabilité génétique observée. En effet, à faible niveau de fertilité, les grains de pollen sont de petite taille, déformés, irrégulièrement colorés, ce qui explique leur mauvais dénombrement par le traitement d'image. La récapitulation des observations visuelles en 2010 et 2011 permet de montrer cependant qu'il existe une relation typiquement curvilinéaire entre nombre de grains de pollen et taux de fertilité, en échelonnant successivement, et dans un sens défavorable, les témoins parentaux, les *Festulolium* issus d'introgression puis les amphiploïdes. Ainsi, une réduction du taux de fertilité à 90 % entraîne-t-elle une réduction de 25 % du nombre de grains de pollen, mais de 75 % lorsque la fertilité tombe à 50 %.

L'étude des sources de variation montre qu'elles sont toutes hautement significatives sur les deux composantes qui ont été mesurées. La variation individuelle intra-variété ou descendance reste cependant majoritaire pour le taux de fertilité alors que le nombre de grains de pollen différencie plus fortement entre populations, mais avec une forte composante non génétique comme l'année et/ou la

date de semis en parcelle ainsi que la densité du dispositif (pépinière *vs*. parcelle). Toujours au moins supérieur à 95 % chez les témoins d'espèce pure, le taux de fertilité pollinique ne diminue que légèrement vers 90% entre variétés de *Festulolium* mais pour tomber à 72.3% chez la variété *Lueur*. Le nombre de grains de pollen paraît plus sensible en diminuant déjà chez certaines variétés introgressées (*F99.4*) ou amphiploïde (*Lifema*), mais pour tomber encore à la moitié des espèces parentales chez la variété *Lueur*. A cette échelle, la relation avec la production de semences n'est pas immédiate puisque les conditions d'isolement pollinique ne sont pas réalisées en essai ; on note cependant que malgré des composantes de fertilité pollinique nettement plus favorables chez *Lifema* et *Felopa* que chez *Lueur*, la production de semences reste du même ordre de grandeur, aux environs de 300 kg/ha. Inversement, le choix de descendances contrastées amphiploïdes, et donc de même nature que la variété *Lueur*, montre que les deux descendances les plus productives en semences (9423 et 9277) sont aussi celles où la fertilité du pollen paraît simultanément rétablie en nombre et qualité.

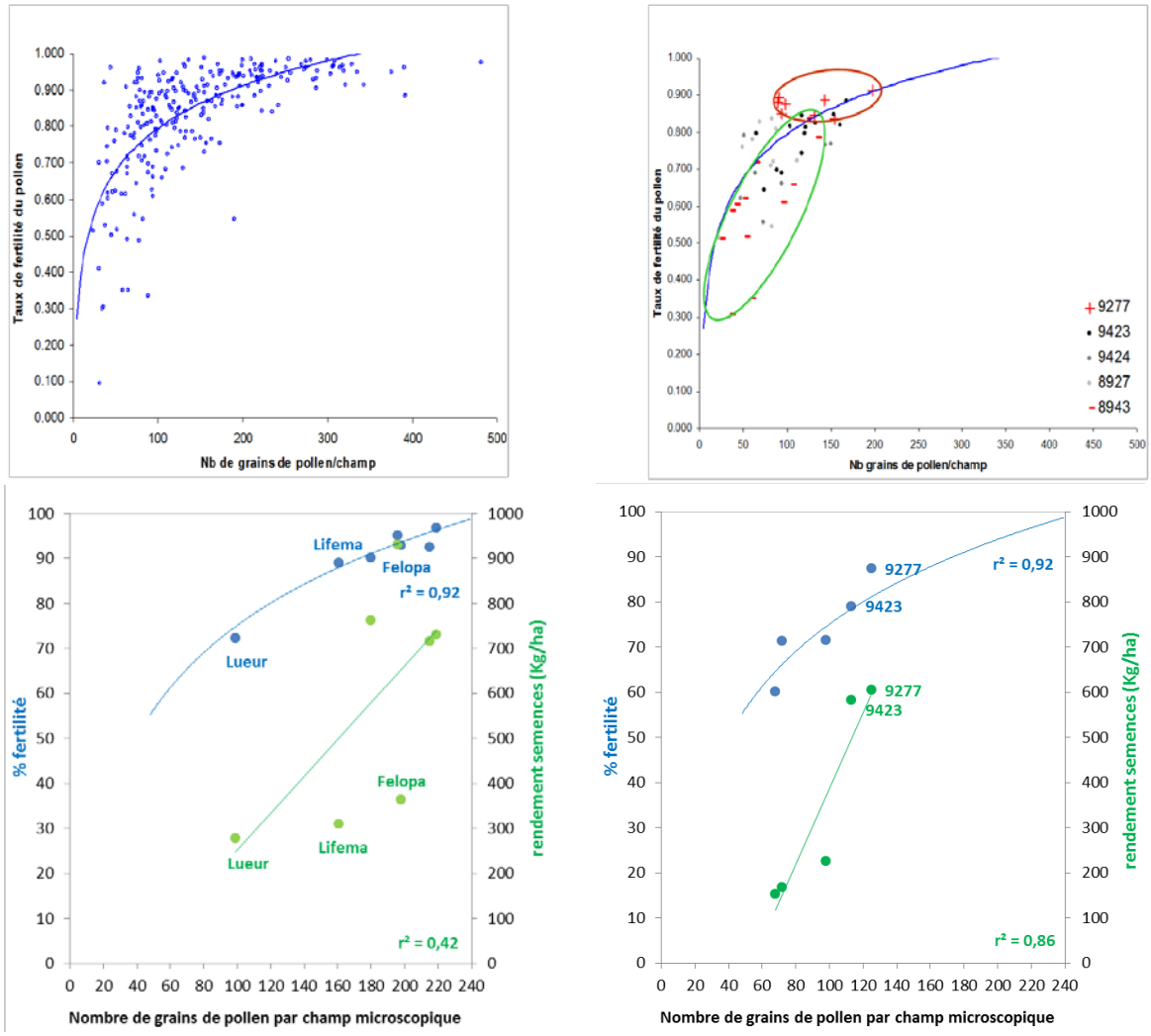

Figure 7 : Relation entre nombre de grains de pollen et taux de fertilité, au niveau d'individus en pépinière (haut) et comme facteur d'impact sur la production de semences en parcelle d'essai (bas) ; sur la gamme de variation totale observée, espèces parentales, *Festulolium* amphiploïdes et introgressés (gauche) et parmi 5 descendances *L. multiflorum* x *F. glaucescens* sélectionnées sur leur productivité contrastée en semences en 2ème année de récolte (droite).

Les résultats permettent d'esquisser un premier modèle de l'impact de la fertilité, qualitative et quantitative, du pollen sur la productivité en semences. Chez les espèces pures, les grandes variations observées montrent qu'elles n'ont sans doute pas de signification particulière sur la production de

semences et que celle-ci dépend avant tout de composantes en nombre d'organes (tiges et fleurs) et de l'année de récolte, toujours défavorable au ray-grass d'Italie en seconde année. C'est dans ce cadre qu'il faut ranger aussi les formes introgressées. La relation est plus déconcertante parmi les amphiploïdes au sens où des composantes de la fertilité pollinique proche de la normalité chez des hybrides de *F. pratensis* peuvent ne pas avoir d'effets positifs sur la productivité semencière comme les variétés *Lifema* et *Felopa* chez lesquelles la stérilité femelle devrait alors rester à un niveau élevé malgré une restauration apparente de la fertilité mâle. Le défaut de fertilité serait à un niveau plus critique chez les amphiploïdes issus de *F. glaucescens* au point de développer une relation plus étroite cette fois entre fertilité mâle et femelle et affecter plus directement une production de semences en deuxième année qui ne dépasse pas le tiers de celle du témoin de fétuque élevée.

5.5 Faculté germinative

Ce critère dont l'importance avait été soulignée en début de projet par les Ets Jouffray-Drillaud a été réexaminé sur l'ensemble des récoltes 2009 et 2010 des essais réalisés à Bourges et à Lusignan. Parmi les témoins d'espèces parentales, la variation de la faculté germinative ne pose pas problème comme on pouvait s'y attendre, mais est déjà détectable chez les *Festulolium* introgressés ; ainsi, le taux de germination passe en dessous du seuil de commercialisation de 80 % chez deux populations issues de *F. glaucescens* (*F99.4* et *F01.1*) pour une des récoltes parmi les six observées et, de façon symptomatique, en deuxième année d'essai, c'est à-dire celle où la productivité tend à diminuer significativement chez le matériel d'origine interspécifique. Parmi les variétés amphiploïdes, quelles soient issues de *F. glaucescens* ou de *F. pratensis*, le seuil de 80 % n'est jamais atteint dès la récolte pour se dégrader encore une à deux années plus tard et rejoindre les valeurs observées par Jouffray-Drillaud chez la multiplication de la variété *Felopa.*

Il est intéressant de signaler que la variété *Achilles* est la seule variété dont le taux de germination ne franchit le seuil de 80 % que dans deux récoltes sur six. C'est la variété la plus productive en semences parmi les amphiploïdes (Figure 2), celle aussi dont l'équilibre génomique a le plus évolué (Kopecky et al, 2006). Très sensible aux effets du milieu et de l'année de récolte en général, et pour cela peu héritable s.l., le taux de germination des semences pourrait être une estimation indirecte assez correcte de la fertilité globale des plantes qui les ont produites. Ainsi, une sélection sur descendances du taux de germination initial et/ou de son maintien au cours du temps, pourrait-elle être pratiquée en amont, entre plantes-mères d'un même polycross par exemple ; seules les descendances à meilleure faculté germinative seraient implantées pour des essais de valeur agronomique ou directement pour de la production de semences et validation. Une économie de moyens substantielle pourrait être ainsi réalisée ou permettre d'évaluer un plus grand nombre de descendances pour une intensité de sélection plus forte. La variabilité génétique s.s. du taux de germination n'a pu être évaluée dans le cadre de ce projet mais une sélection à ce niveau permettrait d'évaluer rapidement et à faible coût les perspectives d'un nouveau développement à court terme de *Festulolium* amphiploïdes.

6 - Discussion

La production grainière reste un caractère extrêmement variable chez les graminées pérennes et que les sélectionneurs reconnaissent difficile à améliorer ; dans un essai de progrès génétique sur 40 ans chez le ray-grass anglais, le rendement en semences varie de 9.8 à 15.7 q/ha, sans progrès significatif sur la période ni même par rapport à des témoins de populations spontanées (Sampoux et al, 2011).

Dans le cadre de ce projet, de très grandes variations de productivité en semences ont été observées du fait du niveau interspécifique étudié ; la productivité des variétés de Festulolium se détermine encore étroitement suivant leur structure génétique, amphiploïde *vs*. introgression. Cela ne doit pas surprendre pour au moins deux raisons ; d'une part, les variétés de *Festulolium* ne sont guère distantes des hybrides primaires par plus d'une dizaine de générations, de sorte que les effets de la recombinaison

génétique et de la sélection ne font que commencer à se développer ; d'autre part, l'appariement préférentiel entre chromosomes homologues ralentit considérablement le processus de la recombinaison chez un amphiploïde. Si la fertilité est affectée en premier lieu par l'état hétérozygote à un grand nombre de loci simultanément chez un hybride interspécifique, le premier levier susceptible de rétablir la fertilité et par là, une productivité de semences correcte, est de loin l'introgression et non la recombinaison.

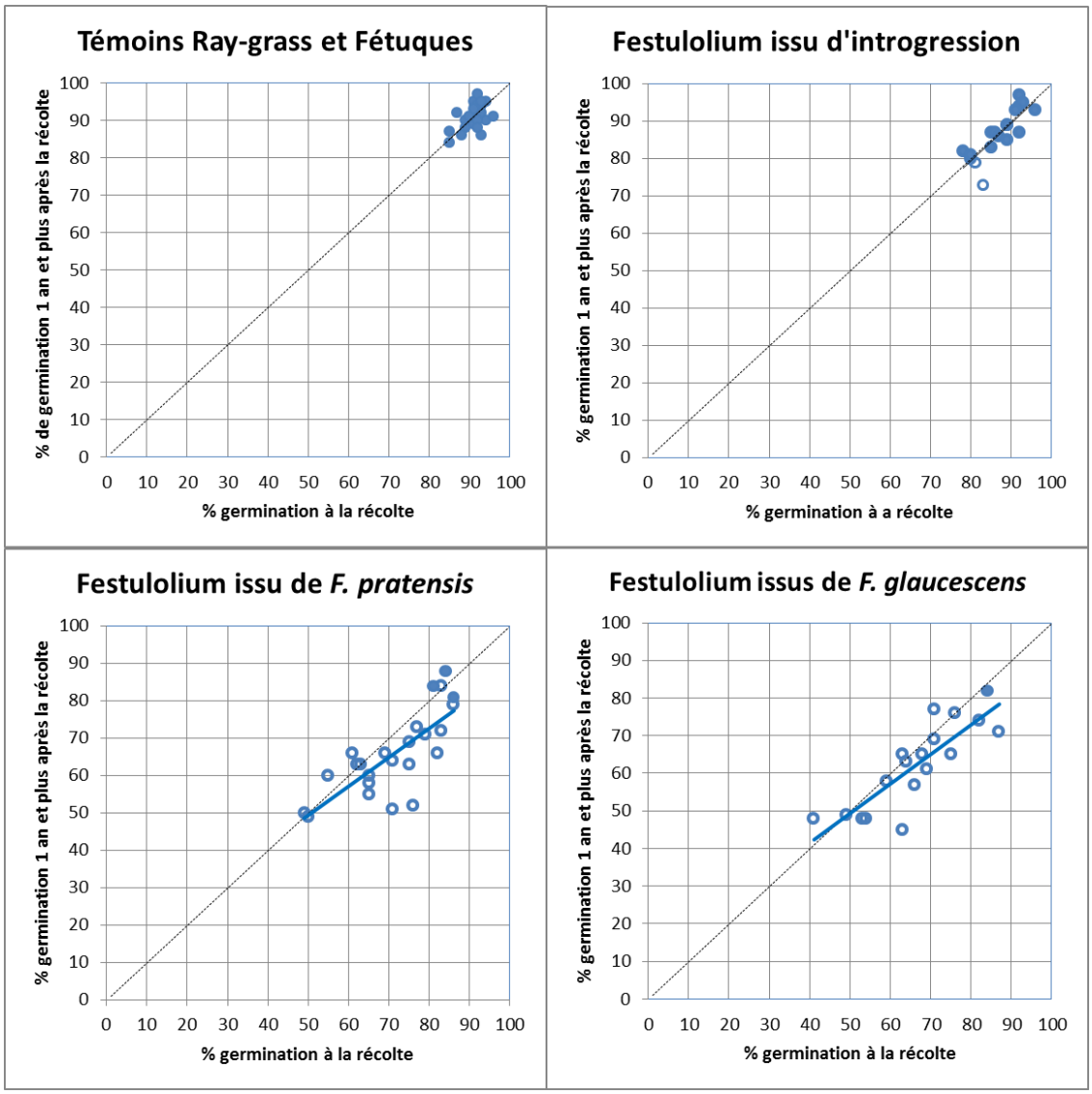

Figure 8 : Faculté germinative (%) observées entre témoins parentaux de ray-grass et fétuque et variétés de *Festulolium* issus d'introgression dans le ray-grass ou amphiploïdes par *F. pratensis* ou *F. glaucescens.* Résultats de trois essais semés à Lusignan à l'automne 2008, 2009 et au printemps 2009 et de 2 essais semés à Bourges à l'automne 2008 et 2009. La faculté germinative en abscisses est celle à la récolte, en 2009 ou 2010, et en ordonnées, celle observée en juin 2011. Les symboles pleins remplissent le seuil minimum réglementaire de commercialisation de 80 %.

Les variétés de *Festulolium* issues d'introgression dans le ray-grass d'Italie ou anglais présentent ainsi une productivité en semences apparemment rétablie en première année de récolte, avec des taux de germination répondant aux normes et relativement stables sur deux années. Les variétés *F99.4* et *FBA-01.1* permettent de définir un seuil minimum de l'introgression à réaliser pour cela au sens où toutes les

plantes mères des deux variétés sont issues d'une seule génération de rétrocroisement dans un ray-grass tétraploïde. La restauration de la productivité en semences semble ensuite ne faire que se poursuivre au cours des générations de sélection/multiplication successives avec l'élimination préférentielle des chromosomes de fétuque mais aussi des caractères agronomiques qu'ils peuvent porter comme on l'a vu avec les variétés *Lofa* et *Matrix*.

La productivité de semences dans l'autre direction d'introgression possible, l'espèce fétuque, n'a pas été expérimentée dans le cadre de ce projet bien que des variétés introgressées dans la fétuque élevée aient été développées, toutes en République Tchèque, mais diversement inscrites dans les catalogues de l'UE, soit comme Festulolium (*Felina*, *Fojtan*), soit comme fétuque élevée (*Hykor*, *Korina*). Leur productivité de semences n'est pas référencée mais l'examen de leur composition génomique suggère que celle-ci ne pourrait pas être aussi bien restaurée que par introgression dans le ray-grass. En effet, de nombreux chromosomes de ray-grass sont encore présents, et à l'état non recombiné, dans une garniture chromosomique de fétuque déjà très complexe puisque la fétuque élevée hexaploïde rassemble les deux génomes ancestraux de *F. pratensis* et *F. glaucescens* (Kopecky et al, 2006).

En fait, la question de la production de semences chez les *Festulolium* issus d'introgression se déplace plutôt sur celle de leurs performances agronomiques relativement aux espèces parentales et eu égard à l'importance quantitative de la réduction de l'introgression. Autrement dit, en quoi l'introgression permet-elle une amélioration plus substantielle ou qui n'aurait pas été possible par sélection intra-spécifique conventionnelle ? Ceci renvoie directement à des questions de déterminisme des caractères que l'on souhaite améliorer par introgression, nombre de loci nécessaires et effets attendus, et à la puissance des tests qu'il est possible de réaliser en expérimentation officielle.

Les variétés amphiploïdes soulèvent un jeu de questions diamétralement opposées où la productivité en semences reste centrale. L'étude de la fertilité mâle semble montrer que la stérilité induite par *F. glaucescens* dans un amphiploïde serait plus profonde que par *F. pratensis* ; ceci étant, l'impact sur la productivité de semences apparaît *in fine* du même ordre et rédhibitoire dans les deux cas en ce qui concerne la faculté germinative. L'abandon de la multiplication de *Felopa* en France par les Ets Jouffray-Drillaud, la décision de non développement de *Lueur* puis la radiation de ses deux variétés sœurs, *Lusilium* et *Luxane*, trois ans à peine après leur inscription, montrent bien le caractère critique de la production de semences de *Festulolium* amphiploïdes. La production de semences chez ce type de *Festulolium* est très peu documentée dans la bibliographie, et seulement chez les amphiploïdes par *F. pratensis*. Toutefois, la faiblesse des rendements en multiplication et leur surestimation en essai avaient déjà été remarquées (Ghesquière et al, 2011). En revanche, l'absence de signalement d'une faculté germinative problématique est plus surprenante puisque celle-ci touche directement à l'autorisation de commercialisation. Il est possible que l'utilisation presqu'exclusive des variétés fourragères sous forme de mélange dans les pays sélectionneurs et utilisateurs de *Festulolium* ait contribué à occulter jusqu'à présent cet aspect.

Est-il possible d'améliorer la productivité en semences des *Festulolium* amphiploïdes ? L'étude génétique des relations de ce caractère entre plantes et descendances est compliquée par la confusion de l'effet de la densité du dispositif sous lequel le rendement en semences est évalué, pépinière ou parcelle dense. Ainsi, il apparaît que non seulement toute sélection massale est inefficace mais aussi toute sélection sur descendance qui serait basée sur la moyenne de la productivité en plantes espacées en pépinière. Les essais en parcelles, même s'ils surestiment la production en première année par rapport à une multiplication, ont permis de dégager un écart-type génétique de l'ordre de 1.2 q/ha entre descendances, et dont semble avoir déjà profité plus ou moins directement la variété *Lueur* au cours des huit générations en moyenne qui la séparent des hybrides F1. Mais un effort de sélection sans doute d'une toute autre ampleur serait nécessaire pour amener à court terme ce type de *Festulolium* à une productivité permettant la commercialisation, de l'ordre d'une dizaine de q/ha, et encore faudrait-il que la question de la dégradation de la faculté germinative soit simultanément résolue.

Une sélection sur composante de la fertilité male et/ou femelle paraît possible compte-tenu de la variabilité observée. Cette option a été tentée sur plusieurs générations d'amphiploïdes par *F. pratensis*. Sur une même généalogie de *F. pratensis* x *L. multiflorum*, la fertilité femelle (*seed set*) passe de 28.4 % en F2, à 61.0 % en F4 pour se stabiliser autour de 55 % en F6, proche du niveau des espèces parentales estimé à 60 % (Zwierzykowski et al, 1993). La fertilité mâle et surtout femelle, chez une généalogie amphiploïde avec l'autre espèce de ray-grass (*F. pratensis* x *L. perenne*) semble plus faible et/ou moins répondre à la sélection: de 45 % et 15.6 % en F1 (respectivement), à 65 % et 33% en F6 (Zwierzykowski et al, 2006), elle atteint 76.5 % et 27.5 % en F7 puis 78.3 % et 38.2 % en F8 mais sans être significativement augmentée (Zwierzykowski, non publié). Chez l'amphiploïde tiré de *F. glaucescens*, une estimation de la fertilité femelle par le nombre de graines par épillet en fécondation libre, soit 1.95 en F3 (Ghesquière et al, 1993) suggère que le *seed set* doit rester inférieur à 30 %. Lorsqu'il y a réponse à la sélection et significative sur la fertilité mâle, Il n'est pas complètement clair si celle-ci est directe ou simplement associée à une contre-sélection naturelle des chromosomes de *F. pratensis.* On observe en effet que la proportion de chromatine hybridée à une sonde génomique de *F. pratensis* diminue régulièrement au cours des générations de multiplication/sélection d'amphiploïdes *F. pratensis* x *L. perenne* (Zwierzykowski et al, 2006). Le même phénomène est observé mais à un rythme beaucoup plus lent chez les amphiploïdes *L. multiflorum* x *F. glaucescens* (Kopecky et al, 2006). Quoiqu'il en soit, la chute de production de semences en multiplication, sous isolement pollinique, par rapport à celle d'un essai en station, sous fécondation libre, montre bien qu'il reste un déficit quantitatif de pollen chez les deux formes de *Festulolium* amphiploïdes ; autrement dit, qu'une fertilité pollinique même rétablie dans le meilleur des cas à plus de 90 % n'est pas suffisante à elle seule pour garantir le rétablissement d'une production de semences satisfaisante.

Par ailleurs, une sélection sur descendance de la fertilité du pollen resterait lourde à conduire si elle devait être réalisée par dénombrement visuel. Le projet n'a fait que l'effleurer mais un dénombrement quantitatif pourrait être une alternative si elle pouvait être réalisée par cytométrie en flux en déterminant notamment le nombre total de grains de pollen contenus en moyenne dans les 3 anthères d'une même fleur. Comme on l'a vu précédemment, le maintien d'une faculté germinative sur plus d'une année est un caractère apparemment plus sensible chez les amphiploïdes que chez les formes introgressées ; sous l'hypothèse que la faculté germinative d'une population ou descendance est fortement corrélée à la fertilité de la ou les plante(s)-mère(s) dont elles sont issues, ce serait également un moyen simple pour pratiquer de fortes sélections initiales à condition toutefois que les populations et descendances aient été toutes récoltées et les semences conservées dans des conditions les plus comparables possibles.

L'accélération des générations de recombinaison, la mise en œuvre des outils de la génomique sont aussi de nouveaux moyens pour tenter de restaurer la productivité en semences en remodelant directement l'équilibre génomique des structures amphiploïdes. Si la productivité de semences pouvait être associée à un jeu de marqueurs également en déséquilibre de liaison avec l'origine des espèces parentales, il serait possible d'éliminer les combinaisons alléliques interspécifiques les plus délétères à la production de semences tout en préservant une balance génomique globale la plus équilibrée possible entre les deux espèces, seul moyen actuellement et en l'absence de déterminismes plus fins, pour maintenir l'expression de performances agronomiques réellement innovantes.

7-Conclusion

La production de semences reste un aspect particulièrement sensible du développement des variétés de *Festulolium.* Après un pic de production en 2004-2005 de 5 823 quintaux, la vente de semences de *Festulolium* en France est retombée à 980 q en 2012-13. On note que la variété *Achilles*, inscrite en France en 2007, commence à apparaître significativement aux cotés des variétés *Lofa* et *Matrix*, toujours prédominantes sur le marché. De façon significative, la variété *Achilles* est celle dont on a

souligné à plusieurs reprises le caractère évolué de son équilibre génomique parmi les *Festulolium* amphiploïdes, sans doute à mi-chemin entre formes typiquement introgressées et amphiploïdes plus strictes comme *Lueur* et *Lifema* mais dont on ne voit pas trace sur le marché.

A signaler que l'année 2014 a été l'occasion d'inscrire une nouvelle variété de *Festulolium* en France, *Hipast*, simultanément avec une inscription en République Tchèque et au Danemark. Cette variété est une forme introgressée mais dans la fétuque élevée cette fois et ainsi, à 42 chromosomes et non plus 28. Il est intéressant de noter que c'est la prise en compte depuis 2013 de la valeur alimentaire dans les épreuves VATE qui a été décisive pour reconnaitre l'apport de ce *Festulolium* par rapport au témoin de fétuque élevée. Les 4 variétés inscrites désormais au Catalogue Français réalisent ainsi, et dans l'ordre *Achilles-Lifema-Lueur-HiPast*, une progression remarquablement continue de la variation phénotypique, depuis le ray-grass d'Italie jusqu'à la fétuque élevée, et susceptible d'aider au classement des futures variétés candidates pour les confronter à des témoins pertinents en essai VATE.

On voit ainsi que l'identification précise de la structure génétique/génomique des variétés de *Festulolium* devient de plus en plus indispensable à leur développement sous une définition élargie ; elle ne peut que renforcer l'attractivité des catalogues nationaux auprès des obtenteurs, stimuler une innovation d'autant plus sur du long terme si elle doit s'atteler à la productivité en semences, et documenter précisément les prescripteurs, ceci dans un contexte de changement climatique qui appelle une innovation particulière en matière de fourrages pérennes.

Remerciements

L'article est une synthèse du projet : *Productivité semencière des variétés de graminées fourragères : facteurs de variation et d'évolution génétique au travers des hybrides Festulolium inscrits au catalogue, soutenu par le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche (2009-2012)* ;

Convention : N° C2008-15 INRA LUSIGNAN
Programme 206 – Sous /section 10 (ancien programme 227 – Sous /section 12)
Date de notification : 21 Octobre 2011
Modifié par avenant n° 1 du 16 Juillet 2010 et n° 2 du 10 Octobre 2011

Les auteurs remercient MM. C. Beugnon puis X. Martin (Ets Jouffray-Drillaud) pour les données de multiplication en vraie grandeur de la variété *Felopa*, indispensables à la compréhension des difficultés rencontrées chez les variétés de *Festulolium* ; MM. B. de Goyon puis D. Minard au titre de Contrôleur national du SOC ainsi que MM A. Besnard (Arvalis Institut du Végétal) et G. Sicard (GEVES Angers) pour leur vif intérêt et soutien tout au long de ce projet.

Références bibliographiques

Durand J.L., Bariac T., Ghesquière M., Biron P., Richard P., Humphreys M.W., Zwierzykowski Z., 2007. Ranking of the depth water extraction by individual grass plants using natural 18O isotope abundance. Environ. Exp. Bot. 60, 137-144.

Fojtik A., 1994. Methods of grass improvement used at the Plant Breeding Station Hladké Životice. Genet. Pol. 35A, 25-31.

Ghesquière M., Zwierzykowski Z., Poisson C., Jadas-Hécart J., 1993. Amphitetraploid *Festulolium* : chromosome stability and fertility over intercrossing generations. In: Proc. XVIIth Intern. Grassland Congress, 451-453, Palmerston North, New-Zealand, Feb. 1993.

Ghesquière M., Jadas-Hécart J., 1995. Les Fétuques ou le genre *Festuca*. In : Prosperi J.M., Balfourier F., Guy P. (Eds). Ressources Génétiques des Plantes Fourragères et à gazon, INRA-BRG, Paris, pp 53-59.

Ghesquière M., Emile J-C., Jadas-Hécart J., Mousset C., Traineau R., Poisson C., 1996. First in-vivo assessment of feeding value of *Festulolium* hybrids derived from *Festuca arundinacea* var. *glaucescens* and selection for palatability. Plant. Breed. 115, 238-244.

Ghesquière M., 2007. Note sur la diversité des variétés de *Festulolium*. Fourrages 191, 377-379.

Ghesquière M., Bourgoin T., 2010. Seed yield of new *Festulolium* varieties bred from *F. arundinacea* var. *glaucescens*. 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, La Rochelle, France, 11–14 May 2009, Springer Science+Business Media B.V. doi:10.1007/978-90-481-8706-5_78. pp. 529-534.

Ghesquière M., Humphreys M.W., Zwierzykowski Z., 2010. *Festulolium*. In: Boller, B., Posselt, U.K., Veronesi, F. (Eds). Fodder crops and amenity grasses, Handbook of plant breeding 5, Springer Science+Business Media, LLC 2010, doi: 10.1007/978-1-4419-0760-8_12. pp. 293-316.

Hacquet J., 2009-10-11. Graminées porte-graine (*Festulolium*, fétuque des prés, fétuque élevée, ray-grass d'Italie et hybride) Comportement et Productivité Grainière des Variétés : Etude des interactions génotype x milieu. Rapports de campagne annuels des essais conduits à Lusignan et Bourges par la FNAMS dans le cadre du projet.

Humphreys M., Thomas H.M., Morgan W.G., Meredith M.R., Harper J.A., Thomas H., Zwierzykowski Z., Ghesquière M., 1995. Discriminating the ancestral progenitors of hexaploid *Festuca arundinacea* using *in-situ* hybridization. Heredity 75, 171-174.

Kopecký D., Loureiro J., Zwierzykowski Z., Ghesquière M., Doležel J., 2006. Genome constitution and evolution in *Lolium* x *Festuca* hybrid cultivars (*Festulolium*). Theor. Appl. Genet. 113, 731-742.

Netzband K., 1991. Breeding of tetraploid *Festulolium* fodder grasses with different maturity. In: Den Nijs A.P.M., Elgersma A. (Eds), Fodder crops breeding: achievement, novel strategies and biotechnology. Proceedings of the XVI Eucarpia Fodder Crops Section Meeting, Wageningen, the Netherlands, 18-22 Nov.1990. pp. 47-48.

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., Viguié 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 and Crop Science 123, 117-129.

Zwierzykowski Z., Jokś W., Naganowska B., 1993. Amphitetraploid hybrids *Festuca pratensis* Huds. x *Lolium multiflorum* Lam. [= x *Festulolium* braunii (K. Richter) A. Camus]. Biul IHAR 188:61–69 (in Polish with English summary).

Zwierzykowski Z., Tayyar R., Brunell M., Lukaszewski A.J., 1998. Genome recombination in intergeneric hybrids between tetraploid *Festuca pratensis* and *Lolium multiflorum*. J. Hered. 89, 324-328.

Zwierzykowski Z., Kosmala A., Zwierzykowska E., Jones N., Jokś W., Bocianowski J., 2006. Genome balance in six successive generations of the allotetraploid *Festuca pratensis* x *Lolium perenne*. Theor. Appl. Genet. 113, 539-547.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL)