

Les marqueurs moléculaires :

quelles utilisations possibles en cultures fourragères ?

Isabel Roldán-Ruiz, Jan de Riek, Hilde Muylle,

Joost Baert, An Ghesquiere, Muriel Vandewalle

Département de génétiques et d'amélioration des plantes, CLO-Gent, Caritasstraat 21, B-9090 Melle (Belgique) ;
i.roldan-ruiz@clo.fgov.be

Résumé

Au cours des dix dernières années le CLO-DvP a acquis une expérience dans le domaine de l'utilisation des marqueurs moléculaires chez les ray-grass. Les applications concernent : (1) l'étude de la diversité génétique et la caractérisation des ressources génétiques, (2) la sélection assistée par marqueurs moléculaires et (3) l'estimation de l'identité génétique du matériel de sélection et des variétés. Ces applications sont illustrées par des résultats obtenus dans différents projets de recherche de notre institut chez les ray-grass.

Notamment, la technologie AFLP a été capable de distinguer la structuration génétique spatiale parmi 80 populations d'une collection européenne. Cependant, cette différenciation était en partie masquée par la vaste variation génétique au sein des accessions. Par ailleurs, des distances génétiques obtenues par marqueurs AFLP ont pu être utilisées comme prédicateur de la performance hétérotique de ray-grass hybrides.

L'analyse QTL de la rouille couronnée a révélé 4 régions impliquées dans la résistance à cette maladie, situées sur 2 chromosomes et expliquant 45% de la variance phénotypique. Ces régions montrent des homologies avec les gènes de résistance à la rouille couronnée et à la rouille de la feuille chez d'autres graminées. La sélection pour la résistance à la rouille par ces marqueurs ADN a donné un meilleur résultat que la sélection phénotypique. La combinaison des sélection phénotypique et par marqueurs serait encore plus efficace. Une stratégie pour l'application de la sélection assistée par marqueurs moléculaires pour le rendement et la qualité du ray-grass italien est aussi expliquée.

Les *Lolium perenne*, *L. multiflorum* et *L. hybridum* ont pu être différenciés en utilisant de simples marqueurs RAPD spécifiques. L'analyse par marqueurs AFLP a montré qu'une déviation génétique liée au régime de coupe avant la production de semences d'une variété de ray-grass d'Italie est improbable. L'utilité des marqueurs moléculaires comme complément ou alternative aux tests de distinction basés sur des caractères morphologiques a été démontrée. Une méthode stricte d'analyse moléculaire de description de la parenté entre populations de ray-grass allogames a procuré un modèle qui devrait permettre de créer un protocole pour l'évaluation de cas possibles "d'essentielle dérivation" parmi les variétés de ray-grass commercialisées.

Introduction

– Types de marqueurs moléculaires

La génétique moléculaire a conduit à l'identification de trois types différents de marqueurs ADN pouvant être utilisés pour appuyer les programmes d'amélioration génétique :

- **Les mutations causales.** Ce sont des marqueurs ADN (polymorphismes de séquence ADN) localisés dans un gène directement impliqué dans le caractère concerné. Par exemple, une mutation dans un gène de résistance totale à une maladie peut conduire à la résistance à uniquement une race spécifique du pathogène. Bien que le criblage pour des mutations dans des gènes fonctionnels devienne techniquement possible, le lien entre une mutation et un phénotype observé est difficile. De plus, dans le cas de QTL (*Quantitative Trait Loci*, voir BARRE et JULIER article précédent), l'établissement des cartes génétiques peut nécessiter de larges populations.

- **Les marqueurs génétiques présumés non fonctionnels**, liés à un gène codant ou à un QTL. A l'inverse des mutations causales, les polymorphismes non fonctionnels ou anonymes sont abondants dans le génome et leur liaison avec un gène ou un QTL peut être établie par la preuve d'associations empiriques de marqueurs génétiques avec les phénotypes. Deux approches sont utilisées pour identifier les marqueurs indirects liés avec les caractères intéressants : des études sur le génome entier dans des populations spécialisées, telles que des croisements F2, des backcross, des lignées recombinantes, etc., et des études indirectes utilisant l'approche des 'gènes-candidats' dans des populations non structurées. Dans le dernier cas, des informations sur la séquence du gène ou la famille de gènes sont nécessaires, comme par exemple le NBS-profiling pour des gènes de résistance. Parce que les marqueurs 'gènes-candidats' concernent du polymorphisme dans une région supposée codante, ils sont souvent étroitement liés au gène (ou QTL). Pour les plantes, les deux approches sont fréquemment combinées aujourd'hui : la cartographie de 'gènes-candidats' dans des populations spécialisées. Le point critique est alors le choix des 'gènes-candidats' pour le caractère étudié.

- **Les marqueurs ADN anonymes**, distribués aléatoirement dans le génome. Dans certains cas, par exemple lors d'études de diversité génétique au sein de populations ou de variétés, il est conseillé d'appliquer des marqueurs qui ne sont pas liés à un quelconque caractère qui a été sujet à la sélection. La diversité des régions génomiques qui ont subi une forte sélection est attendue plus faible que dans d'autres régions ('non sélectionnées').

– Utilisation de la recherche par marqueurs ADN chez les ray-grass et autres espèces fourragères

Concernant les applications des marqueurs moléculaires dans les programmes d'amélioration, trois principaux champs d'application peuvent être identifiés : (i) l'analyse de la diversité génétique et la caractérisation des ressources génétiques, (ii) l'identification de marqueurs ADN liés aux caractères en vue de la sélection assistée, (iii) l'identification et la protection des variétés.

Les marqueurs non fonctionnels sont ceux principalement utilisés dans les **études de diversité génétique** liées à la caractérisation des ressources génétiques et dans l'identification des variétés. Pour ces applications, une image générale du génome total d'un génotype (ou groupe de génotypes ou population) est nécessaire en vue de le comparer avec d'autres génotypes (ou groupe de génotypes ou population).

Le chemin menant à l'**utilisation en sélection des marqueurs** (SAM : sélection assistée par marqueurs) **liés à un caractère** peut être divisé en plusieurs phases. Premièrement, les marqueurs associés au caractère étudié sont identifiés soit dans des populations adaptées, soit dans des populations non structurées. Dans ce processus, des connaissances sont acquises concernant la contribution des différentes régions génomiques impliquées (G), les effets de l'environnement sur l'expression des caractères (E) et l'interaction GxE. Quand une liaison relativement étroite entre le marqueur et le caractère est établie, une sélection visant ce marqueur peut remplacer l'évaluation phénotypique. La SAM devient intéressante lorsque le phénotypage en amélioration traditionnelle est coûteux, laborieux et dépendant des conditions environnementales, ou quand le caractère est

influencé par différentes composantes génétiques dont la détection individuelle est laborieuse. Les marqueurs offrent aussi la possibilité de sélectionner un caractère à un stade précédant le moment où il est exprimé dans la plante. Dans les programmes d'introgession, la SAM permet un gain significatif en termes de nombre de générations nécessaires pour réduire le génotype donneur à un minimum dans la lignée introgressée. Elle permet aussi l'introgession de segments de chromosome plus petits. La SAM rend aussi possible l'accumulation d'allèles bénéfiques multiples, par exemple pour des résistances pyramidales aux maladies ou pour l'amélioration de caractères qui ont une longue histoire de sélection.

La difficulté associée au développement d'approches par marqueurs ADN '*ready-to-use*' dans une culture donnée est fortement dépendante de la nature de la culture et du schéma d'amélioration utilisé : par exemple, le développement d'un système de marqueurs ADN pour l'**identification de variétés** dans une culture commercialisée comme hybrides-F1 (cas du maïs : une variété hybride est alors un génotype) est nettement plus aisé que dans une variété synthétique (cas du ray-grass : une variété synthétique est une population complexe de génotypes). Le degré d'hétérozygotie maintenu dans le programme d'amélioration est aussi un facteur important. C'est cependant dans une culture telle que celle du ray-grass qu'une grande partie de l'expérience de notre institut (Clo-DvP, Belgique) est basée. C'est pourquoi les différents sujets introduits ci-dessus seront illustrés par des exemples des ray-grass issus de résultats publiés ou non publiés obtenus au DvP au cours des dix dernières années.

1. Applications

1.1. Etude de la diversité génétique et caractérisation des ressources génétiques

Les méthodes classiques d'estimation de la variabilité génétique ou de la parenté de groupes de plantes se basent sur des caractéristiques morphologiques. Les marqueurs ADN évitent nombre de complications dues aux effets environnementaux agissant sur les caractères en regardant directement la variation existant au niveau de l'ADN. Les marqueurs ADN sont donc très utiles pour l'examen et la sélection de ressources génétiques dans les programmes de sélection. Cependant, il est important de réaliser que, dans la plupart des cas, l'utilisation de marqueurs ADN n'élimine pas complètement le besoin de faire des tests phénotypiques sur les plantes.

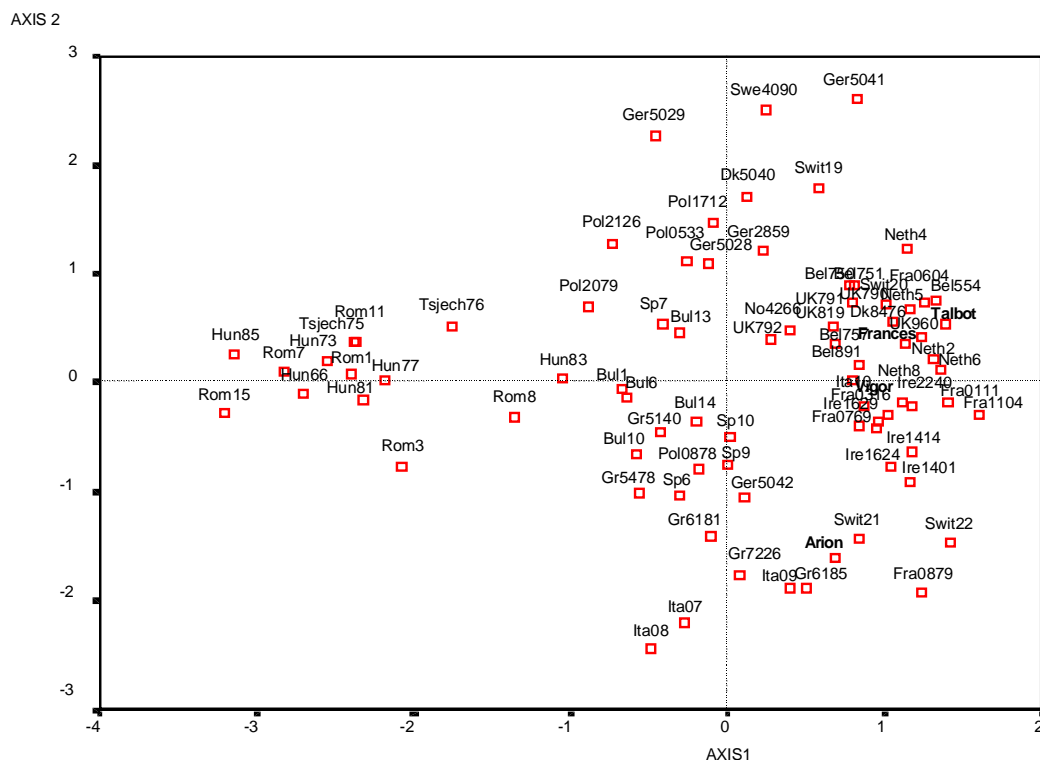
– Exemple 1 : Diversité génétique entre et au sein des populations de ray-grass de la collection ECP/GR au moyen de marqueurs AFLP

Ces dernières années, les gestionnaires de banques de gènes ont souvent eu recours à l'analyse génétique basée sur les marqueurs moléculaires afin de mieux décrire la variation génétique de leurs collections. La caractérisation moléculaire du matériel est vue comme une alternative ou un complément à l'évaluation extensive en champs. Dans notre institut, nous avons utilisé les marqueurs AFLP pour caractériser une partie de la collection européenne ECP/GR de *Lolium*. Les résultats ont été comparés à ceux de l'évaluation au champs (CALSYN *et al.*, 2003).

Une empreinte génétique a été réalisée à l'aide de cinq combinaisons d'amorces AFLP sur un total de 80 accessions avec 10 plantes par accessions. Quatre variétés ("Vigor", "Talbot", "Frances" et "Arion") faisaient partie du matériel analysé en tant que références. Les observations morphologiques et agronomiques de ces accessions ont été effectuées à Melle (Belgique) en 1996 et 1997.

Premièrement, une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée sur la matrice des distances génétiques de Nei (1987) calculées sur les données de fréquences des marqueurs par accession. Les accessions sont représentées sur les deux premiers axes de l'ACP qui expliquent respectivement 12,3 et 7,2% de la variation (FIGURE 1). Le premier axe sépare les accessions d'Europe de l'Est de celles d'Europe de l'Ouest; l'axe 2 sépare les accessions européennes du nord de celles du sud. Un certain nombre de groupes régionaux peuvent être identifiés dans ce graphique : deux groupes d'Europe centro-orientale (Roumanie, Hongrie et République Tchèque ; Bulgarie et Grèce) ; un groupe germano-polonais ; un groupe du sud de l'Europe (Italie et Espagne) ; un groupe nordique et un large groupe d'Europe occidentale (Belgique, Pays-Bas, Irlande, France et Royaume-Uni).

FIGURE 1 – Représentation de 80 accessions de ray-grass sur les deux premiers axes d'une ACP basée sur la distance euclidienne entre fréquences de marqueurs des différentes accessions. L'origine de l'accession est indiquée par les 3 premières lettres du nom du pays.



Une analyse de variance moléculaire (AMOVA ; SCHNEIDER *et al.*, 2000) a été effectuée sur la matrice des distances euclidiennes entre génotypes individuels. La diversité génétique a été divisée entre sites, entre accessions dans un même site et entre accessions en effectuant une analyse hiérarchique de la variance moléculaire. Le fait d'être significatif ou non était déterminé par un test de permutation (n=1000). Le groupement suivant les régions géographiques était basé sur les coordonnées des sites de collection (procurées par R. SACKVILLE-HAMILTON, IGER). Seulement 2,54% de la variation totale du jeu de données ont pu être attribués à des différences entre sites géographiques ; 3,65% de la variation correspondait à des différences entre accessions (dans un site), mais la majeure part de la variation (93,80%) était due à des différences au sein des populations (TABLEAU 1).

Nous avons pu conclure que la technologie appliquée était **capable de révéler une structuration géographique basée sur de la différenciation génétique**. Cependant, la différenciation génétique entre populations et régions géographiques est **masquée dans une certaine mesure par la vaste variation génétique au sein des accessions**.

TABLEAU 1 – Structure et résultats de l'AMOVA.

Source de variance	Degrés de liberté	Somme des carrés de écarts	Composantes de la variance	Pourcentage de la variance expliqué
Entre sites	16	4319,94	3,015**	2,54
Entre accessions dans un même site	52	7964,01	4,333**	3,65
Au sein des accessions	596	66528,60	111,252**	93,80
Total	666	78812,55	118,600	

** Significatif au niveau 0,05, évalué par 1 000 permutations

Nous avons aussi analysé le lien entre les résultats des observations au champ avec les résultats de l'analyse génétique. Pour rendre la comparaison possible, les données du champ ont été

transformées en une matrice de distances en comptant le nombre de caractéristiques significativement différentes entre paires d'accessions. Dans ce but, les données générées par les essais au champ de 1996 et 1997 ont été soumises à un test ANOVA conventionnel (chaque année considérée séparément ; deux systèmes de gestion et deux répétitions par année) et la différence significative a été testée par un test d'intervalle LSD. Au total, 40 caractéristiques (observation x année) ont été prises en compte. Cette matrice de distances a été utilisée dans une analyse de classification hiérarchique ascendante. Le dendrogramme a révélé trois groupes majeurs : (1) accessions de Belgique et des Pays-Bas avec "Talbot" et "Vigor" ; (2) accessions de France, Italie et Irlande avec "Frances" et (3) accessions d'Europe de l'Est. La structure majeure qui apparaît dans la FIGURE 1 est reflétée dans le dendrogramme.

– Exemple 2 : La distance génétique comme prédicteur possible de la performance hétérotique des ray-grass hybrides

Le but du projet européen 'NIMGRASS' était la réalisation d'une sélection assistée par marqueurs moléculaires pour l'efficacité de l'utilisation de l'azote (EUN) et pour la valeur nutritive du ray-grass anglais. En plus de l'identification de QTL et de la sélection assistée par marqueurs, un second aspect, important pour l'amélioration de la EUN, était l'**exploitation de l'effet d'hétérosis**. Ceci a été rendu possible par la mise à disposition de **lignées cytoplasmiques mâles-stériles (CMS)** et par la présence d'un effet d'hétérosis important pour le rendement et les teneurs en azote et en glucides solubles dans l'eau (TGS) (résultats non publiés de la société NPZ, Allemagne). Des études précédentes sur le maïs permettaient de postuler que la distance génétique (DG) entre parents est en partie liée avec l'hétérosis.

Des croisements tests furent effectués entre deux lignées CMS de NPZ et des pollinisateurs sélectionnés dans le pool génétique de la société Zelder (Pays-Bas) (TABLEAU 2). Les populations parentales et les hybrides ont été évalués au champ dans des essais à deux niveaux de fertilisation azotée aux Pays-Bas et en Allemagne. Le choix des croisements a été effectué sur la base de l'estimation des DG et sur l'estimation des valeurs génétiques. Les DG entre parents ont été calculées comme des distances de NEI sur la base des fréquences de marqueurs AFLP. La valeur génétique a été calculée par estimation de l'effet génotypique additif dans les essais au champ. Les critères suivant ont été appliqués :

- comme parent femelle, seulement les lignées mères primaires CMS 17 et CMS 41 furent utilisées ;
- les populations pollinisatrices avec une relativement large DG par rapport à la lignée mère CMS 41 et une faible DG par rapport à la lignée mère CMS 17, et vice versa ;
- les populations pollinisatrices avec une relativement large DG par rapport aux deux lignées mères.

Simultanément, une sélection plus ou moins équilibrée suivant les différentes caractéristiques agronomiques était maintenue (contrastes rendement, digestibilité, valeur nutritive, TGS et digestibilité des parois cellulaires). Un essai multi-sites au champ a été effectué avec les descendances des croisements afin d'évaluer l'effet de la sélection assistée par marqueurs sur la EUN, la valeur nutritive et la TGS, ainsi que l'usage potentiel de l'information de DG dans les programmes d'amélioration des ray-grass. Le TABLEAU 2 montre la relation entre l'effet d'hétérosis pour le rendement moyen en matière sèche et la distance génétique entre les partenaires des croisements.

Parmi les nouveaux hybrides produits, plusieurs étaient supérieurs à la moyenne de la variété de référence incluse dans l'essai. La comparaison des hybrides aux parents montrait un effet d'hétérosis (différence entre la F1 et la moyenne parentale) considérable pour le rendement en matière sèche chez le ray-grass anglais puisque les hybrides dépassaient la moyenne parentale de 7 à 25% en fonction du fond génétique (TABLEAU 2). Un effet d'hétérosis a aussi été trouvé pour la valeur nutritive et la TGS. Comme attendu, l'hétérosis augmente avec la distance génétique. La corrélation entre l'effet d'hétérosis et la DG est de 0,64 (ce qui est faible et non significatif). **Le croisement avec la plus grande DG présente aussi l'effet d'hétérosis le plus élevé et inversement** le croisement avec la plus faible DG l'effet d'hétérosis le plus faible, avec quelques inconsistances entre les deux. Ces résultats (GAUE *et al.*, 2003 ; LUESINK *et al.*, 2005) indiquent que **l'information de la DG entre parents pourrait être utile à l'amélioration des plantes herbacées**. Les résultats de l'étude de KÖLLIKER *et al.* (2004) sont similaires.

TABLEAU 2 – Relation entre l’effet d’hétérosis pour le rendement moyen en matière sèche (moyennes de tous les sites, niveaux d’azote et coupes) **et la distance génétique.** * : différence entre le rendement de la F1 et de la moyenne parentale (en tonne/ha ou en % de la moyenne parentale).

Pedigree	Rendement moyen en matière sèche (tonne/ha)			Hétérosis*		Distance génétique
	F1	Mère	Père	tonne/ha	%	Nei DG.10 ⁻²
CMS 41 x Zlp 90-020	12,67	11,63	11,69	1,01	8,7	3,90
CMS 17 x Zlp 90-020	12,70	10,55	11,69	1,58	14,2	3,68
CMS 41 x Zlp 88-098	12,63	11,63	11,25	1,19	10,4	4,04
CMS 17 x Zlp 88-098	12,38	10,55	11,25	1,48	13,6	4,88
CMS 41 x Tireno	12,57	11,63	11,90	0,80	6,8	3,33
CMS 17 x Tireno	12,72	10,55	11,90	1,49	13,3	3,81
CMS 41 x Zlp 96-024	12,93	11,63	10,42	1,90	17,2	6,82
CMS 17 x Zlp 96-024	13,07	10,55	10,42	2,59	24,7	7,39
CMS 41 x Zlp 94-153	12,48	11,63	10,72	1,30	11,6	4,47
CMS 17 x Zlp 94-153	12,90	10,55	10,72	2,26	21,3	4,75
CMS 41 x Zlp 88-005	12,78	11,63	11,70	1,11	9,5	3,74
CMS 17 x Zlp 88-005	12,84	10,55	11,70	1,72	15,4	4,85

1.2. Les marqueurs moléculaires comme outil de sélection

Les marqueurs moléculaires peuvent être utiles à différents stades de l’amélioration des cultures fourragères telles que le ray-grass. Ils peuvent être utilisés pour **étudier en profondeur la ségrégation et la liaison de gènes** ainsi que l’origine de la transmission des caractères héréditaires. Par exemple, il est possible de retracer l’origine de gènes de résistance jusqu’au géniteurs sauvages. Une fois que des **marqueurs liés à des gènes spécifiques** ont été identifiés, ils peuvent être utilisés dans les programmes d’amélioration pour augmenter la probabilité de sélectionner les individus, d’une population ou d’une descendance d’un croisement, qui possèdent la meilleure combinaison des propriétés désirées. Aussi, quand des marqueurs liés aux caractères ont été identifiés, il est possible de localiser les gènes responsables sur une carte génétique et de saturer la région génomique d’intérêt avec des marqueurs afin de **cartographier finement les gènes** responsables de l’expression du caractère. Finalement, la localisation précise de gènes permet **l’étude de la relation entre allèles pour des gènes particuliers** (par exemple des gènes de résistance) **entre génomes**.

Chez le ray-grass, de plus en plus de marqueurs liés à des caractères agronomiques importants sont rapportés (EUN et valeur nutritive : VAN LOO *et al.*, 2003 ; TGS et valeur nutritive : HUMPHREYS et TURNER, 2003 ; caractères morphologiques : YAMADA *et al.*, 2004 ; date d’épiaison : ARMSTEAD *et al.*, 2004 ; résistance à la verse : INOUE *et al.*, 2004). HUMPHREYS et TURNER (2003) ont appliqué la sélection par marqueurs moléculaires visant une TGS supérieure dans les populations dont les positions des QTL étaient originaires. La sélection a visé deux régions génomiques montrant une agglomération de QTL pour la teneur en polymère de fructane à la base de la tige, chaque région étant sélectionnée séparément. Les performances des descendances des parents ainsi sélectionnés allaient dans la direction prédite mais de manière non ou peu significative. L’utilisation d’un nombre plus élevé de descendances ou la sélection assistée combinant les différents QTL dans le même temps pourrait être plus efficace pour évaluer le SAM pour la TGS. VAN LOO *et al.* (2003) ont, quant à eux, identifié différents QTL pour la EUN et appliqué une sorte d’index de sélection pour la SAM en donnant un score positif à chaque allèle bénéfique de chaque QTL. Par sélection divergente, deux sous-populations de 50 plantes ont été créées. La EUN de ces populations descendantes a été déterminée par l’évaluation de paramètres de croissance sur un système hydroponique à faible apport d’azote. Une différence de 40% en rendement de matière sèche entre la sélection positive et la sélection négative a été observée. Ces résultats doivent encore être confirmés dans des essais en champs.

Deux exemples de projets réalisés dans notre institut visant à rechercher des marqueurs ADN liés à des QTL sont présentés ci-après.

– Exemple 1 : La rouille couronnée

La rouille couronnée, causée par le champignon biotrophe *Puccinia coronata*, affecte le rendement et la qualité des cultures fourragères et des gazons. La résistance à ce pathogène est donc un important critère de sélection de l'amélioration. La descendance (252 individus) d'un croisement entre une plante de ray-grass anglais (*Lolium perenne*) susceptible et une plante résistante a été analysée pour la résistance à la rouille. Une **carte génétique** intégrant les deux parents comprenant 227 marqueurs (AFLP, SSR, RFLP et STS) et faisant 744 cM a été générée en utilisant l'approche du pseudo-testcross à deux voies. L'analyse QTL **a révélé quatre régions chromosomiques impliquées dans la résistance à la rouille couronnée** : deux sont situées sur le groupe de liaison (LG) 1 (LpPc4 et LpPc2) et deux sur le LG2 (LpPc3 et LpPc1) expliquant respectivement 12,5%, 24,9%, 5,5% et 2,6% de la variance phénotypique. Un marqueur STS avec une homologie élevée avec le gène R connu se place sur la carte génétique à proximité du LpPc2 indiquant l'implication possible du gène R. La synténie au sein des graminées indique que LG1 et LG2 montrent des homologies au niveau des QTL avec le groupe des chromosomes A et B de l'orge contenant des gènes de résistance à la rouille couronnée et avec le groupe des chromosomes 1 des Triticeae contenant des gènes de résistance à la rouille de la feuille (MUYLLE, 2003).

Pour valider le potentiel de ces régions chromosomiques pour la SAM, des sélections divergentes ont été effectuées au sein de populations F1 utilisées pour la cartographie des QTL. **La présence de deux marqueurs AFLP (PC168-R1 et PC026-R3) associés à la résistance à la rouille dans les deux régions LpPc1 et LpPc2 a été utilisée comme critère de sélection.** Le progrès réalisé par sélection assistée a été comparé à la sélection phénotypique après un cycle de multiplication. La composition des différentes sous-populations sélectionnées et la moyenne des scores pour la résistance à la rouille de multiplications de ces sous-populations sont présentées dans le TABLEAU 3. L'évaluation de la résistance à la rouille (score 1= résistant, score 5 = sensible) des sous-populations montre que la sélection divergente par marqueurs a donné des sous-populations montrant des phénotypes moins extrêmes que celles sélectionnées phénotypiquement (scores moyens de 1,23 pour la sous-population M+, de 2,11 pour M-, de 1,00 pour la sélection phénotypique R et de 3,30 pour S). En général, les sous-populations multipliées présentaient un degré de sensibilité plus élevé que les populations originales mais la différence n'était significative ($P < 0,05$) que dans le cas de la sous-population R. En fait, la sous-population R multipliée (formée au départ de plantes F1 sélectionnées uniquement sur base phénotypique) présente un degré de sensibilité nettement supérieur (score moyen de 2,11) à celui des 11 plantes d'origine utilisées pour former la sous-population R (score moyen de 1,00). Sur la base des résultats présentés dans le TABLEAU 3, nous avons pu conclure que la sélection par marqueurs ADN a donné un résultat plus satisfaisant que la sélection phénotypique. Une efficacité encore supérieure peut être attendue de la combinaison de l'évaluation phénotypique

TABLEAU 3 – Sélection divergente basée sur l'information phénotypique ou moléculaire. Les plantes sélectionnées dans la population F1, avec (M+) ou sans (M-) les marqueurs sélectionnés pour leur liaison avec la résistance à la rouille couronnée ou avec un phénotype résistant (R) ou susceptible (S) ont été croisées. Un nombre donné de plantes de ces sous-populations a été évalué pour la résistance (score 1= résistant, score 5 = sensible). *SD : écart-type.

	Constitution des sous-populations				Evaluation des sous-populations multipliées	
	Nombre de plantes F ₁	Scores moyens (SD*) de résistance à la rouille	Présence de PC168-R1	Présence de PC026-R3	Nombre de plantes évaluées	Scores moyens (SD) de résistance à la rouille
Sélection par marqueurs						
M+	10	1,23 (0,32)	100%	100%	155	1,93 (1,34)
M-	8	2,11 (0,69)	0%	0%	185	2,22 (1,55)
Sélection phénotypique						
R	11	1,00 (0,00)	55%	81%	177	2,11 (1,57)
S	10	3,30 (1,03)	0%	30%	150	3,33 (1,47)

et de l'information des marqueurs ADN, puisque les plantes sélectionnées pour former la sous-population M+ présentaient un degré de susceptibilité supérieur à celui des plantes sélectionnées pour former la sous-population R (score moyen de 1,23 pour M+ et de 1,00 pour R). L'approche la plus appropriée serait donc de sélectionner les plantes avec les scores d'infection les plus bas, et qui contiennent aussi les marqueurs liés PC168-R1 et PC026-R3 (résultats soumis pour publication).

– Exemple 2 : Stratégie pour l'application de la sélection assistée par marqueurs moléculaires pour le rendement et la qualité du ray-grass italien

Une approche légèrement différente est actuellement testée chez le ray-grass italien non alternatif (*Lolium multiflorum*) (VANDEWALLE *et al.*, 2003). Dans ce cas, quatre populations F1 ont été utilisées et différentes caractéristiques ont été observées ou analysées sur plantes isolées pour cinq coupes : rendement en matière sèche (RMS), teneur en glucides solubles (TGS), digestibilité de la matière sèche (DMS), teneur en azote (%N), ainsi que la résistance à la rouille couronnée et la date d'épiaison. Le but est de **développer et d'évaluer une méthodologie pour simultanément identifier et combiner des génotypes contenant des régions génomiques liées à plusieurs caractères d'intérêt**, par le biais des marqueurs moléculaires. L'étude de la liaison entre marqueurs et l'analyse QTL des quatre populations a permis d'identifier des marqueurs liés aux RMS, TGS, DMS et %N.

Une sélection de plantes F1 élites a été effectuée sur la base des données phénotypiques. Ces plantes ont été autofécondées dans le but de générer des populations plus homozygotes. Dans chacune des 24 populations issues d'autofécondation ('S1'), 25 génotypes ont été analysés pour les marqueurs qui avaient été identifiés dans les populations F1 comme liés aux caractéristiques citées. Cette information a été utilisée pour réaliser une sélection divergente de plantes S1 possédant soit les allèles de marqueurs ADN positifs, soit les allèles de marqueurs ADN négatifs. Les plantes complémentaires de chaque groupe de sélection (RMS+, RMS-, TGS+, TGS-, DMS+, DMS-, %N+ et %N-) ont été placées en isolation pour la production de semences ('S2'). Les descendances S2 des différents groupes ont été semées dans deux sites pour l'évaluation du rendement et de la qualité. Les résultats de la SAM (disponible à la fin 2005) seront comparés à ceux obtenus par du matériel de même origine sélectionné par la méthode classique de sélection phénotypique. De cette manière, l'efficacité de la stratégie appliquée pour la SAM sera évaluée. La possibilité d'appliquer les marqueurs liés identifiés dans cette étude à d'autres populations sera envisagée par la suite.

Ces dernières années, une nouvelle tendance peut être observée dans ce genre d'études. Les marqueurs anonymes sont remplacés par des **marqueurs ADN ayant une information quant au gène ('gène-candidat')**. Ces marqueurs sont localisés dans les régions codantes du génome. En réalisant une analyse de liaison entre ce type de marqueurs et le phénotype, la probabilité d'identifier les régions génomiques à effets les plus importants sur le caractère étudié est augmentée. Un exemple est l'étude conduite actuellement dans notre institut concernant l'organisation génomique des gènes impliqués dans la réponse d'auto-incompatibilité chez le ray-grass anglais (VAN DAELE *et al.*, 2003). Dans ce cas, nous avons d'abord identifié les gènes en utilisant la technique cDNA-AFLP de profil d'expression génétique. Les fragments isolés ont ensuite été transformés en marqueurs ADN. L'étape suivante est la localisation chromosomique de ces fragments dans une population en ségrégation (en cours de réalisation).

1.3. Estimation de l'identité génétique du matériel de sélection et des variétés

L'estimation des similarités génétiques entre génotypes individuels ou entre variétés est une **composante vitale de l'amélioration et de la commercialisation des plantes**. Elle est indispensable, par exemple, aux améliorateurs pour estimer la diversité de leur pool génétique (voir plus haut), aux autorités testant la distinction variétale préalable à l'enregistrement, aux autorités de certification pour contrôler la multiplication et la commercialisation des lots de semences, aux sociétés d'amélioration pour prévenir les utilisations frauduleuses de leur variétés.... Actuellement, une mesure absolue de la similarité génétique n'est pas techniquement possible, étant donné que cela nécessiterait la comparaison de la séquence du génome entier et probablement la compréhension de son impact sur le phénotype. En conséquence, toute méthode utilisée pour étudier les différences entre variétés conduira à une mesure relative et les estimations de similarité ou de distinction refléteront aussi la méthode utilisée. Les approches d'estimation des similarités génétiques

peuvent être basées sur des caractères morphologiques et/ou biochimiques, comme ceux utilisés actuellement dans les programmes d'amélioration ou dans les tests DHS, et sur des comparaisons par marqueurs moléculaires. Compte tenu du fait que les différences entre génotypes ou entre variétés sont causées par des différences au niveau de l'ADN, **il peut être attendu que les marqueurs moléculaires, vu leur nature, donnent une représentation du génotype plus juste que les caractères morphologiques.** Les caractères morphologiques sont, eux, l'expression de la composition génomique de la variété en interaction avec l'environnement.

Pour ces raisons, plusieurs groupes de recherche, le nôtre inclus, ont étudié au cours de la dernière décennie **les possibilités d'utilisation des marqueurs ADN pour la détermination de l'identité génétique** du matériel d'amélioration et des variétés. Au moins quatre applications pouvant potentiellement utiliser les techniques de marqueurs ADN ont été identifiées :

- identification des espèces et/ou confirmation du caractère hybride de plantes obtenues après hybridation interspécifique ;
- contrôle de la stabilité variétale durant la multiplication ;
- évaluation de la distinction des variétés candidates ou utilisation comme outil de pré-screening dans le cadre des tests DHS ;
- estimation des distances génétiques entre variétés dans les conflits concernant les supposées « essentielles dérivations ».

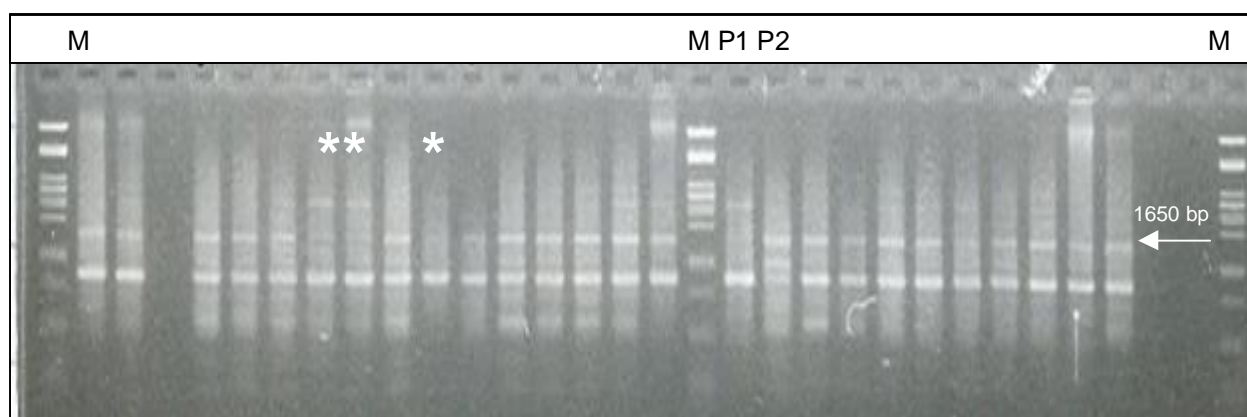
Dans la section suivante, nous discutons chacun de ces aspects par des exemples pris chez les ray-grass anglais et italien. Il est important de réaliser qu'en comparaison aux variétés de type lignée ou hybride, identifier et quantifier la similarité génétique de variétés ou lots de semences de ray-grass représente un problème complexe. La difficulté principale vient de la grande variabilité existant entre individus de ces populations hétérogènes.

– Exemple 1 : Identification des espèces et/ou confirmation du caractère hybride

Les quatre espèces ou sous-espèces de ray-grass utilisées en agriculture, *Lolium multiflorum* (Lm), *L. perenne* (Lp), *L. multiflorum westerwoldicum* (Lmw) et *L. x boucheanum* (Lxb) peuvent être différenciées sur la base de leur morphologie mais il n'y a pas de barrière absolue à leur croisement interspécifique. En fait, Lxb est l'hybride de Lp et Lm.

Au DvP, nous avons identifié un facteur de résistance à la rouille couronnée hérité maternellement chez le Lm cv. Axis. Dans un croisement, nous avons observé que les plantes issues de graines récoltées sur le parent résistant étaient plus résistantes que celles issues du parent sensible (ADAMS *et al.*, 2000). Par ailleurs, le DvP dispose de marqueurs ADN spécifiques par lesquels nous avons pu différencier Lm et Lxb (DE LOOSE *et al.*, 1994). Ces marqueurs ont été utilisés dans un programme d'introgression dont le but était d'introduire cette résistance héritée maternellement dans Lp. La résis-

FIGURE 2 – Empreinte génétique RAPD de P1 (parent Lm résistant), de P2 (parent Lp), et de la descendance récoltée sur P1. M : marqueur des longueurs. La bande de 1650 bp est spécifique à Lp. La majorité des plantes est le résultat du croisement entre Lm et Lp; les * indiquent les plantes qui sont issues d'autopollinisations de la plante Lm.



tance étant héritée uniquement maternellement, nous avons croisé une plante résistante de Lm (cv. Axis) avec plusieurs génotypes de Lp et nous n'avons récolté les graines que sur la plante résistante Lm. Pour s'assurer que les graines récoltées étaient bien le produit du croisement entre Lp et Lm, nous les avons analysées avec un marqueur ADN spécifique à Lp (paire d'amorces RAPD OPC15). Dans la FIGURE 2, les empreintes génétiques de la plante Lm, du pollinisateur Lp et de quelques plantes issues des graines récoltées sur la plante Lm résistante sont visibles.

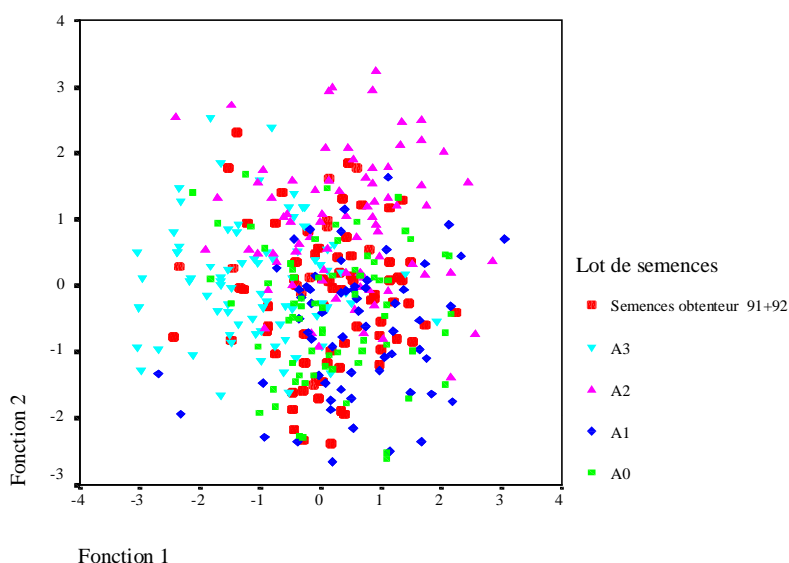
En utilisant ce marqueur ADN spécifique, il a donc été **possible de sélectionner les vraies descendance des plantes Lm et Lp, et d'éliminer les résultats d'autofécondation de Lm** (résultats non publiés). Ce marqueur RAPD, assez simple à utiliser, peut être employé en routine dans les programmes de croisements interspécifiques des deux espèces de *Lolium*. A l'époque de cette recherche, plusieurs variétés de Lm et Lp ont également été testées pour la présence ou l'absence de ce marqueur, et dans tous les cas le marqueur de 1650 bp était présent dans les plantes Lp mais pas dans les plantes Lm. Ce genre de marqueur peut être utile pour l'estimation de la pureté des semences.

– Exemple 2 : Stabilité des variétés durant la multiplication :
effets de régimes de coupe différents sur la stabilité génétique

La variété de ray-grass italien 'Bellem' est caractérisée par un très faible nombre d'inflorescences après la coupe de fourrage de printemps en comparaison avec d'autres variétés. Par contre, 'Bellem' a un rendement fourrager et une pérennité excellents, ce qui en fait une variété très appréciable. Nous avons présumé que la méthode de production de semences - coupe d'ensilage en mai suivie d'une repousse pour la production de semences - peut influencer à la fois le rendement potentiel en semences et la stabilité génétique, avec un recul possible de la performance agronomique. Sans connaître l'effet de la coupe de printemps sur la stabilité génétique, les semences de prébase et de base ont toujours été produites sans effectuer cette coupe, ceci par précaution afin de conserver la variété intacte et de conserver ses excellentes performances.

En 1994 et 1995, un essai a été réalisé dans lequel le même lot de semences de prébase de 'Bellem' fut semé et soumis à quatre régimes de coupe différents avant la production de semences : A0 = pas de coupe, A1 = coupe précoce, A2 = coupe intermédiaire, A3 = coupe tardive. Une expérience de contrôle post-récolte a été réalisée au champ en 1996 et 1997 pour les quatre lots de semences produits. La semence de l'obteneur (*breeder's seeds*) a été introduite dans l'essai comme contrôle. Pour chaque lot de semences, 6 répétitions de 16 plantes individuelles ont été évaluées. La date d'épiaison, la hauteur au printemps, la croissance du premier mois, la longueur et la largeur de la feuille culinaire, et le nombre d'épis par plante après la coupe ont été observés. Les cinq lots de semences ont aussi été analysés par marqueurs AFLP. Une analyse discriminante a été appliquée pour l'étude de la différenciation génétique des plantes analysées.

FIGURE 3 – Représentation des plantes sur les 2 premiers axes discriminants basés sur les données des marqueurs AFLP. Aucune différence significative n'apparaît entre les lots de semences dans cette figure.



Dans le contrôle post-récolte, pour tous les caractères morphologiques considérés, les cinq lots de semences de 'Bellem' n'ont montré aucune déviation de caractère et leur uniformité n'était pas significativement différente. L'analyse par marqueurs AFLP n'a mis en évidence aucune différence génétique significative entre les différents lots de semences (FIGURE 3). Ces résultats (RIJCKAERT *et al.*, 1998) montrent qu'**une déviation génétique liée au régime de coupe et à la méthode de production des semences est improbable.**

– Exemple 3 : Evaluation de la distinction des variétés candidates

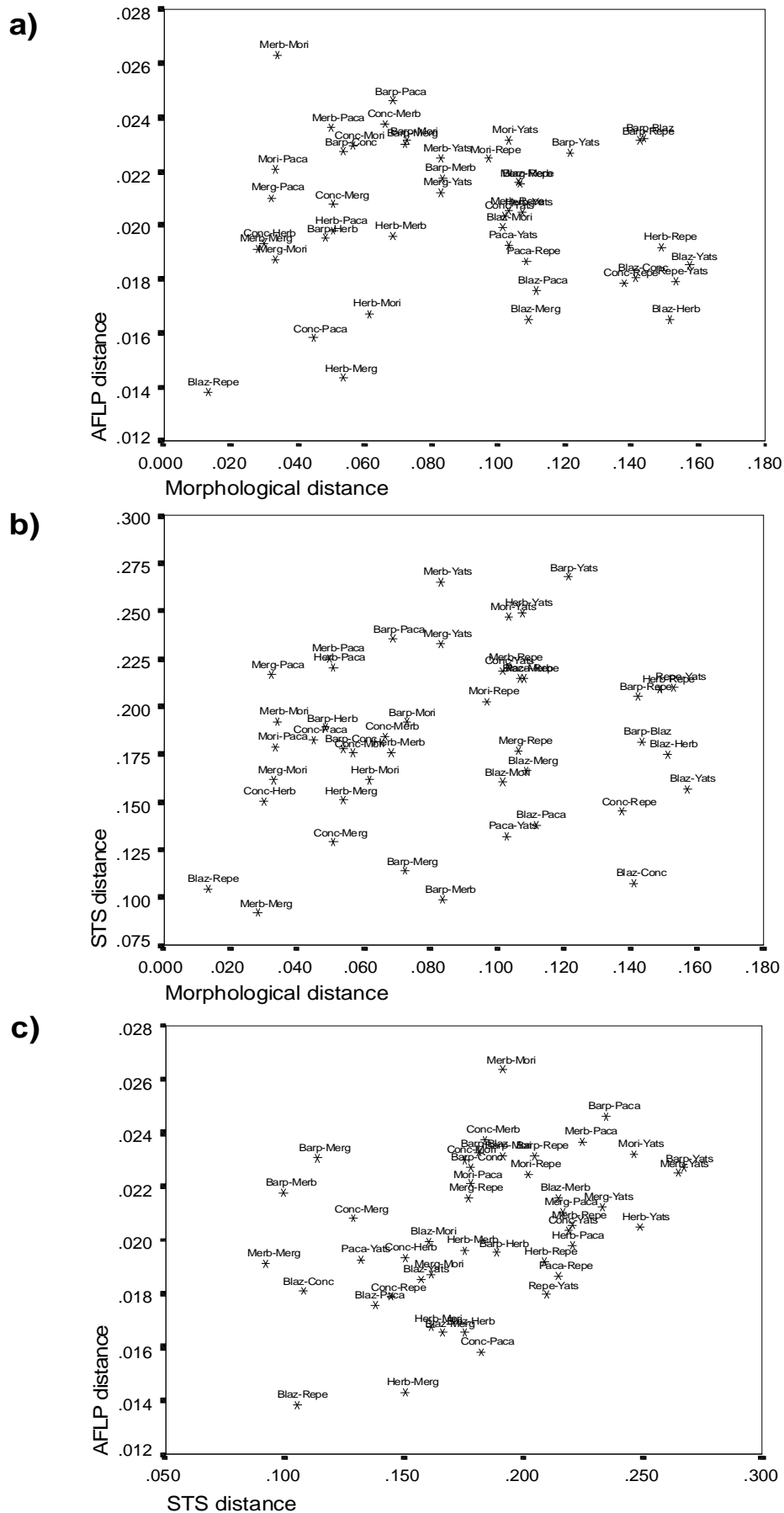
La protection intellectuelle par attribution de droits aux sélectionneurs et les enregistrements nationaux imposent une méthodologie très stricte pour l'évaluation des différences entre variétés dans de nombreux pays. En général, les législations nationales se conforment à la convention de l'Union internationale pour la protection des nouvelles variétés de plantes (UPOV). Distinction, homogénéité et stabilité (DHS) sont estimées dans des tests comparatifs dans lesquels les variétés candidates et enregistrées sont cultivées ensemble. Des caractères morphologiques spécifiques aux différentes cultures sont mesurés et testés statistiquement selon les règles prescrites. Dans de nombreuses cultures, incluant les ray-grass, la tâche devient très ardue, principalement de par le fait que la taille des collections de référence augmente continuellement.

Le DvP, en collaboration avec l'Université de Wageningen (Pays-Bas), la Plant Testing Station (Northern Ireland), l'INRA (France) et le GEVES (France), a démontré **l'utilité des marqueurs moléculaires comme complément ou alternative aux tests de distinction basés sur les caractères morphologiques** (ROLDAN-RUIZ *et al.*, 2001). Nous avons exploré la parenté entre un nombre de variétés de ray-grass en utilisant l'information morphologique et les données AFLP et STS, avec une attention spéciale sur les divergences ou convergences entre les méthodes. Le matériel végétal consistait en 16 variétés de ray-grass anglais diploïdes, comprenant à la fois des types fourragers (14) et des types gazons (2), avec des représentants de toutes les classes de maturité (2 précoces, 8 intermédiaires et 6 tardifs). Ces variétés étaient originaires de programmes d'amélioration d'Europe, d'Amérique et de Nouvelle-Zélande dont les méthodes de sélection varient grandement. L'évaluation morphologique, copiant les essais officiels d'enregistrement et suivant les directives UPOV, a été réalisée sur trois années consécutives (1996, 1997 et 1998) pour l'ensemble des caractères approuvés par la liste nationale anglaise et l'enregistrement aux droits des sélectionneurs. Les méthodes statistiques approuvées par l'UPOV pour la détermination DHS des variétés candidates ont été appliquées. Les 16 variétés ont toutes été analysées par marqueurs AFLP (entre 18 et 54 plantes par variété). Dix de ces variétés ont été analysées par marqueurs STS (20 plantes par variété). Les distances euclidiennes ont été calculées sur les données morphologiques. Pour les données AFLP, la distance de 'Roger' a été utilisée. Une forme adaptée de celles-ci a été calculée pour les données STS, afin de tenir compte du fait que les loci STS varient dans leurs nombres d'allèles par locus.

Toutes les variétés ont été confirmées morphologiquement distinctes et les marqueurs STS et AFLP ont livré suffisamment de diversité génétique pour les différencier. Les distances obtenues par les différentes approches ont été comparées par calcul des coefficients de Pearson et par construction de graphique de comparaison des distances entre variétés (FIGURE 4). Les résultats montrent que les distances entre variétés varient selon les méthodes, spécialement entre la morphologie et les marqueurs moléculaires. La corrélation entre distances morphologiques et AFLP était de $r = -0,06$ ($p < 0,375$) ; entre distances morphologiques et STS de $r = 0,18$ ($p < 0,12$) et entre distances AFLP et STS de $r = 0,42$ ($p < 0,003$) (chacune basée sur 1000 permutations). Les meilleures correspondances entre les trois méthodes concernaient des paires de variétés qui étaient soit très proches, soit très distantes. De plus, plusieurs liens entre variétés concordait avec l'historique de l'amélioration des variétés. Par exemple, Blazer et Repell, de très petite distance génétique avec les différentes méthodes utilisées (voir FIGURE 4), sont les deux variétés de type gazon et sont aussi toutes deux dérivées de ressources génétiques américaines. Merbo et Merganda (FIGURE 4), aussi très similaires selon la morphologie et les marqueurs STS, sont des variétés sélectionnées dans des écotypes belges par le même améliorateur.

Ces résultats démontrent que **les différences moléculaires entre variétés n'impliquent pas des différences morphologiques équivalentes.** Par conséquent, la même décision quant à la distinction à l'enregistrement ne peut être attendue des marqueurs moléculaires et des méthodes DHS actuelles

FIGURE 4 – Comparaison des distances entre variétés a) morphologiques vs. AFLP; b) morphologiques vs. STS; c) STS vs. AFLP. Codes des variétés : Barp = Barpolo, Blaz = Blazer, Conc = Concile, Herb = Herbie, Merb = Merbo, Merg = Merganda, Mori = Morimba, Paca = Pacage, Repe = Repell, Yats = Yatsyn.



basées sur la morphologie. Les marqueurs moléculaires devraient être capable de distinguer les variétés de ray-grass, mais s'ils sont adoptés pour l'enregistrement, **la définition de la 'variété' devrait alors être adaptée** dans ce sens. De plus, l'étude montre qu'il est peu probable que les techniques moléculaires utilisées soient adaptées au pré-screening des variétés de ray-grass. En effet, le but d'un pré-screening serait de subdiviser les variétés candidates en groupes, afin de réduire le nombre de contrôles et de comparaisons par paires à examiner dans les tests morphologiques. Cela supposerait que ce pré-screening subdivise les variétés en groupes qui soient distinguables aussi par les caractères morphologiques utilisés pour l'enregistrement. La présente étude montre que ce ne serait pas le cas, puisque les différences morphologiques et moléculaires ne sont pas corrélées. Une manière alternative de travailler malgré ces faibles corrélations serait de n'utiliser que des marqueurs moléculaires liés avec les caractères phénotypiques employés en test DHS. Cependant, cette approche n'est pas applicable aujourd'hui aux ray-grass à cause du **nombre insuffisant de marqueurs moléculaires connus liés à des caractères phénotypiques spécifiques**.

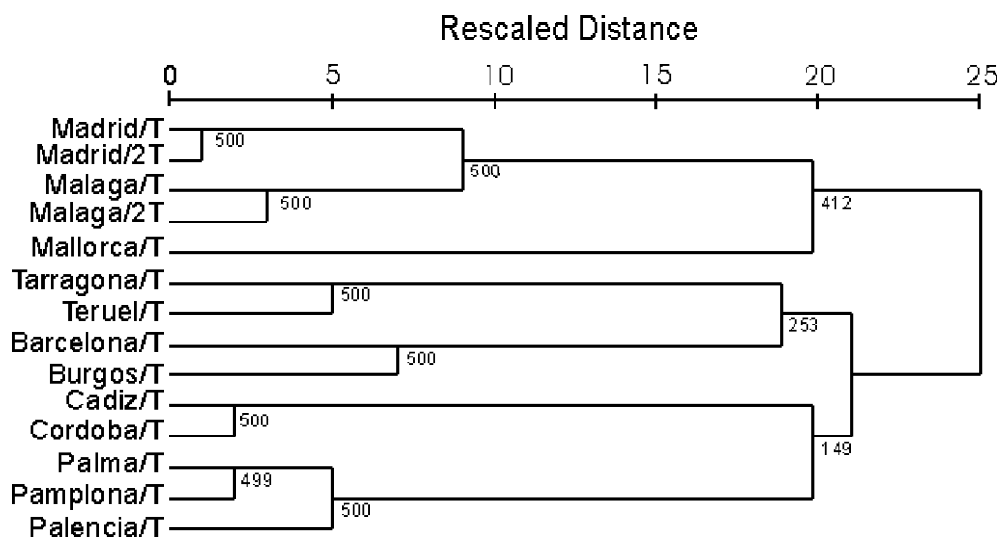
– Exemple 4 : Les conflits concernant les « essentielles dérivations »

La convention UPOV la plus récente (1991) a introduit la **notion légale d'essentielles dérivations**. Elle définit une essentielle dérivation (ED) comme une variété dont il est montré qu'elle dérive de manière prédominante d'une variété initiale (IV), dont elle est **clairement distincte mais** dont elle est **semblable pour l'expression de caractères essentiels**. Si cela est prouvé, une partie des royalties de l'ED devrait aller à l'obteneur de l'IV. Les ED potentielles doivent être distinctes des IV enregistrées selon le jugement des autorités nationales qui testent les variétés. Ensuite, l'établissement de la parenté de l'ED avec l'IV est de la responsabilité de l'obteneur de cette dernière. Aucune méthodologie n'a encore été fixée dans le cas des ray-grass. L'organisation des obtenteurs (FIS, ancien ASSINSEL) tente d'établir des seuils de détermination des essentielles dérivations pour chaque culture.

Le DvP a coordonné un projet de recherche visant à procurer des informations pouvant aider à développer un protocole d'évaluation des cas possibles d'essentielles dérivations chez le ray-grass anglais (ROLDAN-RUIZ *et al.*, 2000). Nous avons testé la capacité des marqueurs AFLP à donner une estimation fiable et pertinente de la conformité génétique. Des graines de 12 accessions de ray-grass anglais diploïdes, comprenant 5 groupes d'accessions très apparentées, ont été utilisées dans cette étude. Les accessions ont été dénommées selon des villes espagnoles et les accessions apparentées ont reçu un nom avec la même lettre initiale. Les groupes B, C et M comprenaient une IV et une ou deux ED 'déclarées'. Le groupe P était formé de trois populations synthétiques issues de polycross dans lesquelles un nombre variable de parents communs avaient été utilisés et donc simulant un cas de ED. Le groupe T représentait un groupe contenant deux variétés peu apparentées, avec un fond génétique commun, mais non considérées comme liées par une relation d'ED. Pour deux accessions (Madrid/T et Málaga/T), un extra échantillon de plantes a été examiné (Madrid/2T et Málaga/2T) dans le but d'estimer la distance génétique entre deux échantillons indépendants de la même accession. Le nombre de plantes par accession variait entre 52 et 60. Chaque plante individuelle a été analysée par 5 combinaisons d'amorces AFLP. Les 12 accessions incluses dans cette étude ont aussi été observées morphologiquement par GILLILAND *et al.* (2000). Ils ont trouvé que toutes les accessions étaient équivalentes à des variétés distinctes, exceptés Palma et Pamplona qui étaient une paire non distinguable et Cádiz et Córdoba qui étaient distinctes mais de manière très minime. Il a été conclu que les accessions choisies étaient un matériel approprié pour l'étude des relations d'ED puisqu'il comprenait des groupes d'accessions avec à la fois des origines distinctes et communes.

Afin de comparer les similarités entre toutes les accessions, les données de présence/absence des marqueurs AFLP ont été converties en valeurs de fréquences. Un vecteur de fréquences de marqueurs AFLP a été obtenu pour chaque accession. Les carrés des distances euclidiennes entre paires d'accessions ont été calculés sur la base des vecteurs de fréquences de marqueurs. La matrice des distances a été utilisée pour construire un dendrogramme (FIGURE 5) selon l'algorithme de groupement UPGMA. Le dendrogramme a livré les 5 groupes attendus. Les valeurs de distances les plus basses ont été obtenues au sein des groupes. Les échantillons répétés de Madrid/T et Madrid/2T ont montré les paires les plus similaires. Les échantillons répétés T et 2T de Madrid et Málaga étaient correctement groupés mais les répétitions de Málaga n'étaient pas autant similaires que les accessions apparentées telles que Cádiz et Córdoba ou Palma et Pamplona.

FIGURE 5 – Dendrogramme UPGMA basé sur les distances euclidiennes au carré entre accessions. Les accessions Madrid/2T et Málaga/2T représentent des échantillons répétés de Madrid/T et Málaga/T respectivement. Les nombres situés aux fourches indiquent le nombre de fois que le groupe constitué des accessions à la gauche de cette fourche est apparu durant la procédure de ré-échantillonnage.



La méthodologie développée dans cette étude a donc été capable de produire **une mesure robuste des similarités génétiques par marqueurs AFLP**. Cela est crédité par la correspondance des résultats avec la filiation connue des accessions examinées et avec les observations morphologiques. Cependant, il est important de reconnaître que les résultats détaillés dans cette étude ne sont valides que pour les accessions analysées en combinaison avec la méthode spécifique utilisée. Néanmoins, **une méthode stricte de description de la parenté entre populations de ray-grass allogames a été mise au point**. Cette méthode procure un **modèle** à partir duquel il devrait être possible de créer un protocole pour l'évaluation de cas possibles de ED parmi les variétés de ray-grass commercialisées. La discussion politique et méthodologique sur ce sujet est toujours en cours dans les forums internationaux.

Conclusion

Les marqueurs moléculaires ont un potentiel d'utilisation dans les différents aspects de l'amélioration des cultures fourragères. Les applications concernent : (1) l'étude de la diversité génétique et la caractérisation des ressources génétiques, (2) la sélection assistée par marqueurs moléculaires et (3) l'estimation de l'identité génétique du matériel de sélection et des variétés. Les principaux résultats ont été obtenus chez les ray-grass (projets de recherche de notre institut, mais aussi par ceux d'autres groupes de recherche) qui sont diploïdes et qui sont les plus cultivés dans les régions tempérées, mais peu de données existent pour des espèces telles que la fétuque des prés et quasiment aucune ne concerne les espèces polyploïdes comme la fétuque élevée et la luzerne. A l'heure actuelle, les marqueurs moléculaires confirment et renforcent les observations phénotypiques mais, dans la plupart des cas, leur utilisation n'élimine pas le besoin de faire des tests phénotypiques sur les plantes. Des marqueurs plus performants et moins chers, ainsi que l'intégration de toutes les données disponibles, devraient permettre de les utiliser de manière plus routinière dans les programmes de sélection.

Références bibliographiques

- ADAMS E, ROLDÁN-RUIZ I, DEPICKER A, VAN BOCKSTAELE E, DE LOOSE M (2000) A maternal factor conferring resistance to crown rust in *Lolium multiflorum* Lam. cv. Axis. *Plant Breeding* 119:182-184.
- ARMSTEAD IP, TURNER LB, FARREL M, SKOT L, GOMEZ P, MONTOYA T, DONNISON IS, KING IP & HUMPHREYS MO (2004) Synteny between a major heading-date QTL in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and the *Hd3* heading-date locus in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 822-828.
- CALSYN E, GHESQUIERE A, BAERT J & DE RIEK J (2003) Proceedings of the 8th meeting of ECP/GR Working Group on Forages, Linz, Oostenrijk, 10-12 april 2003, in press.
- DE LOOSE M, VAN LAECKE K & VAN BOCKSTAELE E (1994) RAPD markers as a tool for rye-grass identification. *Acta horticulturae* 355: 23-25.
- EXCOFFIER L, SMOUSE PE & QUATTRO JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- GAUE I, LUESINK W, WOLTERS L, DOLSTRA O, & FRAUEN M (2003) Performance of F1-hybrids in *Lolium perenne* under different nitrogen regimes. *Vortrage für Pflanzenzüchtung* (59). Proc. of the Eucarpia meeting on Grass Breeding, Braunschweig, Germany, 22-25 September 2002.
- GILLILAND TJ, COLL R, CALSYN E, DE LOOSE M, VAN EIJK MJT & ROLDÁN-RUIZ I (2000) Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties, I. Morphology and Biochemical characterisation. *Molecular Breeding* 6/6: 569-580.
- HUMPHREYS MO & TURNER L (2003) Nutritive quality QTL and marker assisted selection in ryegrass. *Vortrage für Pflanzenzüchtung* (59). Proc. of the Eucarpia meeting on Grass Breeding, Braunschweig, Germany, 22-25 September 2002, 280-289.
- INOUE M, GAO Z, HIRATO M, FUJIMORI M & CAI H (2004) Construction of a high-density linkage map of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) using restriction fragment length polymorphism, amplified fragment length polymorphism, and telomeric repeat associated sequence markers. *Genome* 47: 57-65.
- KOLLIKER R, BOLLER B & WIDMER F (2004) Development of molecular marker diversity in polycross breeding populations of *Lolium perenne*. *Genetic Variation for Plant Breeding*. Proc. of the 17th Eucarpia General congress, Tulln, Austria, 8-11 September 2004.
- LUESINK W, INGWERSEN B, WOLTERS L, & DE RIEK J (2005) Breeding of CMS-F1-Hybrids in *Lolium perenne* with improved nitrogen use efficiency. XX international Grassland Congress, University College Dublin, Ireland, 26 June – 1 July 2005.
- MUYLLE H (2003) Genetic analysis of crown rust resistance in ryegrasses (*Lolium* spp.) using molecular markers. PhD thesis, Gent University.
- NEI M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Colombia university press, 512 p. New York.
- RIJCKAERT G, ROLDÁN-RUIZ I, DE LOOSE M & VAN BOCKSTAELE E (1998) Effect of time of spring defoliation on seed yield and genetic shift of Italian ryegrass cv. Bellem (*Lolium multiflorum* Lam.). In: COST 828 Actions – Seed science in the field of genetically controlled stress physiology, INRA, Toulouse, France, 11-14 November 1998.
- ROLDÁN-RUIZ I, CALSYN E, GILLILAND TJ, COLL R, VAN EIJK MJT, DE LOOSE M (2000) Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties, II. AFLP characterisation. *Molecular Breeding* 6/6: 593-602.
- ROLDÁN-RUIZ I, VAN EEUWIJK FA, GILLILAND TJ, DUBREUIL P, DILLMANN C, LALLEMAND J, DE LOOSE M, BARIL CP (2001) A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 1138-1150.
- SCHNEIDER S, ROESSLI D, EXCOFFIER L (2000) Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. *Genetics and Biometry Laboratory*, University of Geneva, Switzerland.
- VAN DAELE I, VAN BOCKSTAELE E, ROLDÁN-RUIZ I (2003) Identification and mapping of SI-related genes in *Lolium perenne*. *Proceedings of the 3rd International Symposium, Molecular Breeding of Forage and Turf*, Dallas (Texas) (11), 127-131.
- VANDEWALLE M, CALSYN E, VAN BOCKSTAELE E, BAERT J, DE RIEK J (2003). DNA-markers for yield and quality traits in Italian Ryegrass. Proc. of the 25th Eucarpia of the Fodder Crops and Amenity Grasses Section meeting. Brno, Czech Republic, 1-4 September, 2003. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 39: 140-146.
- VAN LOO EN, DOLSTRA O, HUMPHREYS MO, WOLTERS L, LEUSINK W, DE RIEK J, & BARK N (2003) *Vortrage für Pflanzenzüchtung* (59). Proc. of the Eucarpia meeting on Grass Breeding, Braunschweig, Germany, 22-25 September 2002, 270-280.
- YAMADA T, JONES ES, COGAN NOI, VECCHIES AC, NOMURA T, HISANO H., SHIMAMOTO Y, SMITH KF, HAYWARD MD, FORSTER JW (2004) QTL analysis of morphological, developmental, and winter hardiness-associated traits in perennial ryegrass. *Crop Science* 44, 3 : 925-935.