



**HAL**  
open science

## Possibilités nouvelles offertes par les biotechnologies chez les plantes fourragères

Bernadette Julier, Marc M. Ghesquière

► **To cite this version:**

Bernadette Julier, Marc M. Ghesquière. Possibilités nouvelles offertes par les biotechnologies chez les plantes fourragères. Fourrages, 1996, 147, pp.273-292. hal-02686602

**HAL Id: hal-02686602**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02686602>**

Submitted on 13 Oct 2022

**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.

# Possibilités nouvelles offertes par les biotechnologies chez les plantes fourragères

B. Julier, M. Ghesquière

Les biotechnologies, qu'elles relèvent des techniques de culture *in vitro* déjà un peu anciennes ou des nouvelles techniques de manipulation de l'ADN du génome, ouvrent de nouvelles perspectives pour l'étude et l'amélioration des plantes fourragères.

## RÉSUMÉ

*Les biotechnologies permettent de contourner des difficultés rencontrées dans la sélection des plantes fourragères, souvent autopolyploïdes et allogames. Avec les techniques de culture in vitro, il est possible de modifier leur système de reproduction naturelle : la multiplication à l'identique d'un génotype, les croisements interspécifiques, le changement du niveau de ploïdie permettant de nouvelles combinaisons génétiques. Les techniques de biologie moléculaire apportent de nouvelles possibilités pour la connaissance du génotype : établissement des cartes génétiques, distinction des variétés et identification des marqueurs de caractères agronomiques (QTL). Les techniques de transformation génétique consistent à introduire des gènes étrangers, pour étudier leur fonctionnement et aussi pour améliorer les espèces. Les biotechnologies sont des outils puissants qui complètent les méthodes classiques d'amélioration et d'évaluation des variétés.*

## MOTS CLES

Biotechnologie, dactyle, fétuque des prés, fétuque élevée, fétuque rouge, luzerne, méthode, ray-grass anglais, ray-grass d'Italie, sélection variétale, trèfle violet

## KEY-WORDS

Biotechnology, cocksfoot, cultivar breeding, Italian ryegrass, lucerne, meadow fescue, method, perennial ryegrass, red clover, red fescue, tall fescue

## AUTEURS

I.N.R.A., Station d'Amélioration des Plantes Fourragères, F-86600 Lusignan

On définit les biotechnologies végétales comme l'ensemble des manipulations faisant intervenir des méthodes non naturelles de reproduction des plantes ou de recombinaison des gènes. Ces manipulations se pratiquent en laboratoire et interviennent à tous les niveaux du cycle des végétaux.

Les biotechnologies sont classées en trois grandes familles. L'une concerne les méthodes de culture *in vitro*, la seconde regroupe les techniques de manipulation et de caractérisation du génome, la troisième enfin, intégrant tout un ensemble de techniques de biologie cellulaire et moléculaire, a pour objet la transformation génétique des plantes.

Nous détaillerons dans ce qui suit l'apport des biotechnologies pour l'amélioration des plantes fourragères. Ces dernières posent **des problèmes particuliers en sélection : une autopolyploïdie fréquente** (c'est-à-dire la présence en quatre ou six exemplaires de l'ensemble des chromosomes, comme chez la luzerne, la fêtuque, le dactyle et certains ray-grass et trèfles violets) rend malaisé le choix des individus élites et la stabilisation de leurs descendance. **A cause de l'allogamie et de l'hermaphrodisme des espèces fourragères, les variétés ne sont le plus souvent que des variétés synthétiques**, c'est-à-dire de petites populations où règne encore une certaine variabilité génétique, partiellement en équilibre. Ces variétés synthétiques apparaissent ainsi comme une formule variétale bâtarde, entre les variétés-lignées des espèces autogames comme le blé et les variétés-hybrides des espèces allogames dont on sait contrôler la fécondation, comme le maïs ou le tournesol. Cette hétérogénéité génétique des variétés augmente l'importance des effets de compétition dans les couverts. En outre, **la pérennité des plantes fourragères amplifie les effets liés au milieu**. Ces particularités incitent à recourir aux biotechnologies pour surmonter les limites des méthodes classiques d'amélioration de ces espèces qu'impose leur biologie.

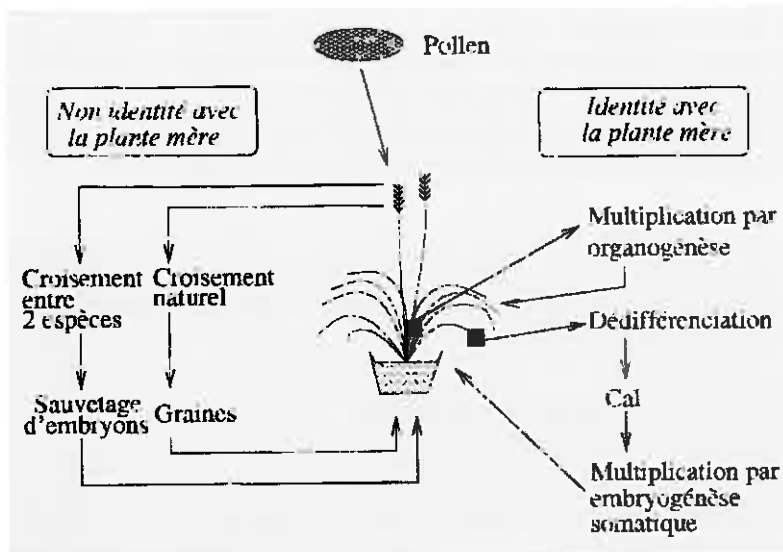


FIGURE 1 : Place des techniques de culture *in vitro* dans le cycle de reproduction d'une plante.

FIGURE 1 : Place of *in vitro* cultures in the reproductive cycle of a plant.

Les biotechnologies sont utiles à l'amélioration des plantes à deux niveaux. Elles permettent des manipulations impossibles ou difficiles par les méthodes traditionnelles et elles fournissent des outils d'étude scientifique du génome, du développement des plantes et de la différenciation cellulaire. Les techniques qui composent les biotechnologies ont en général été élaborées sur des espèces modèles (tabac, tomate...) puis adaptées aux autres espèces par de légères modifications. Nous ne détaillerons pas ici ces biotechnologies, mais nous les aborderons simplement suivant l'objectif poursuivi en amélioration des plantes.

## Pallier les limites de la reproduction naturelle

Classiquement, le cycle d'un végétal part de plantes parents qui, après croisement, donnent, sous forme de graines, une descendance de génotype hybride entre le père et la mère (figure 1).

### ■ Multiplier à l'identique

Chez les plantes fourragères, un degré élevé d'hétérozygotie, une hérédité complexe chez les espèces autopolyploïdes et un régime de reproduction allogame empêchent la multiplication à l'identique d'un génotype en de nombreux exemplaires. Les techniques de culture *in vitro* permettent de s'affranchir de ces contraintes.

**L'organogénèse** (figure 1) consiste à prélever un tissu comprenant des zones méristématiques actives (bourgeons), à le cultiver sur des milieux nutritifs adéquats pour régénérer directement des plantules. **L'embryogénèse somatique** (figures 1 et 2), partant d'un explant (tige, limbe ou pétiole), passe au contraire par une phase de **dédifférenciation**, aboutissant à la formation d'un cal dans lequel des structures embryonnaires se forment. Du fait de cette phase embryonnaire, la morphologie des plantules ainsi régénérées ressemble davantage à celle de plantes issues de graines que par la technique d'organogénèse.

A partir de cellules de la plante, on peut aussi obtenir **des protoplastes, cellules isolées dépourvues de leur paroi**. Des cals embryogènes peuvent être formés à partir de protoplastes, aboutissant à des embryons de génotype identique à celui de la plante-mère (figure 2).

L'embryogénèse somatique est la méthode la plus efficace pour obtenir des plantes génétiquement identiques et remplace les laborieuses techniques de bouturage. **Les embryons somatiques peuvent aussi être encapsulés pour donner des semences artificielles.**

L'utilisation de l'embryogénèse somatique est envisagée en création variétale de luzerne (McKERZIE, 1994). L'objectif est de produire des variétés hybrides de clones (figure 3). Dans ce schéma, les parents seraient multipliés par embryogénèse somatique et semés en rangs

alternés au moyen de semences artificielles. En faisant l'hypothèse d'une allogamie préférentielle, les graines récoltées, majoritairement hybrides de clones, fourniraient la génération commerciale.

### ■ Sauver des hybrides interspécifiques

Dans le cas où les deux parents appartiennent à des espèces ou des genres différents, mais néanmoins proches, le croisement est souvent possible mais l'embryon formé dans la graine n'est pas viable à la suite de la dégénérescence de l'albumen. **Le sauvetage d'embryons permet alors de régénérer une plante** (figure 1). Cette technique, qui consiste à prélever l'embryon encore immature et à le déposer sur

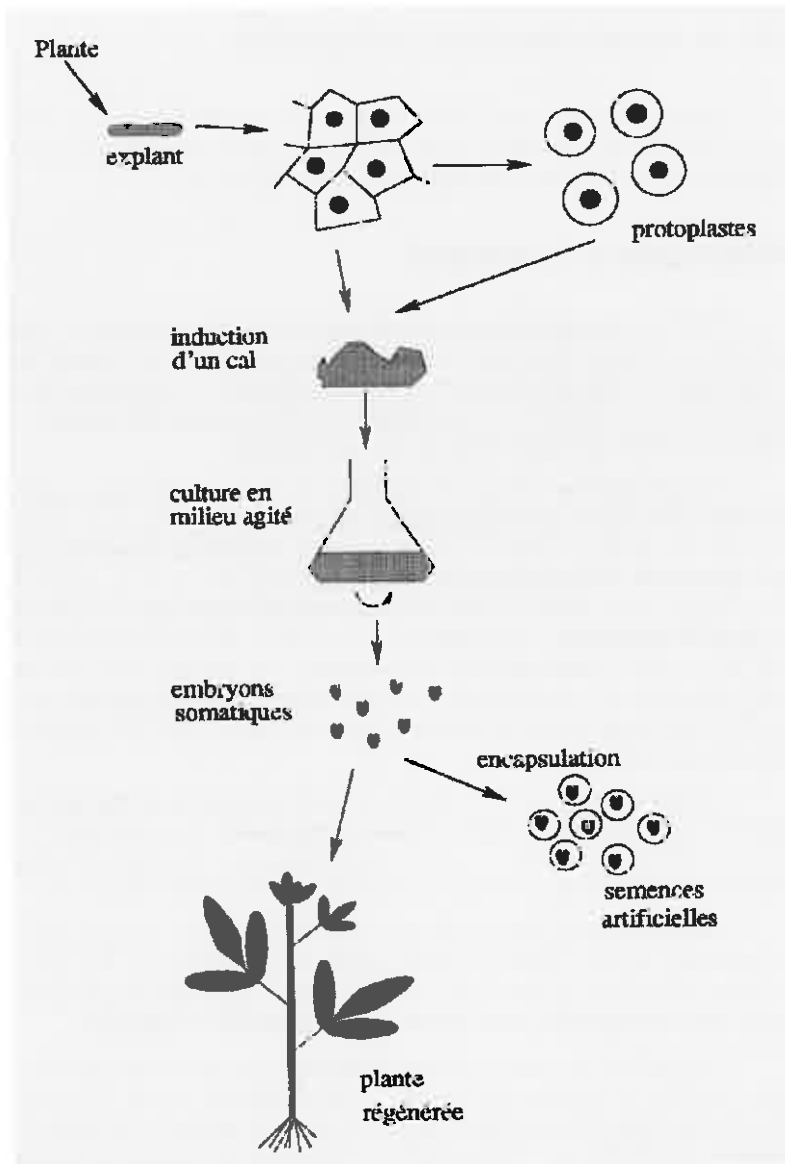
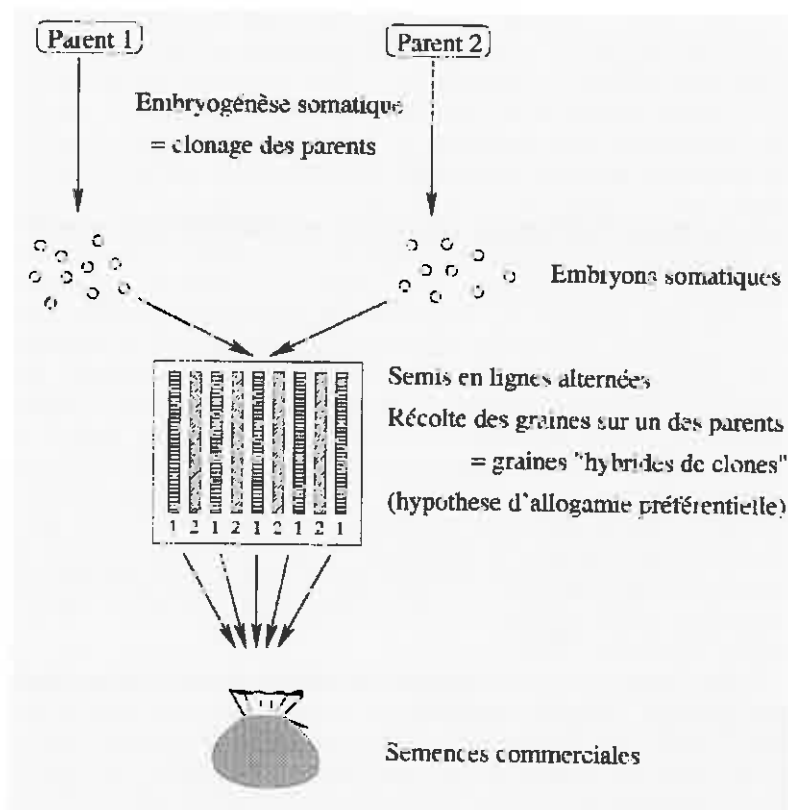


FIGURE 2 : La technique d'embryogénèse somatique.

FIGURE 2 : Technique of somatic embryogenesis.

FIGURE 3 : Utilisation de l'embryogénèse somatique pour la création de variétés hybrides de clones chez la luzerne.

FIGURE 3 : Utilization of somatic embryogenesis for the creation of hybrid varieties of lucerne clones.



milieu nutritif, est couramment employée en hybridation interspécifique fétuque élevée x ray-grass. Dans la plupart des cas, les hybrides de première génération ainsi régénérés ont ensuite une fertilité suffisante pour se passer de culture *in vitro* dans les générations ultérieures de sélection.

### ■ Elargir et remanier la variabilité génétique

Lorsque les barrières de reproduction deviennent insurmontables, le sauvetage d'embryons n'est plus d'aucune utilité et il faut recourir à l'**hybridation somatique par fusion de protoplastes** si l'on veut obtenir certaines combinaisons hybrides pratiquement impossibles à produire par fécondation naturelle (ARCIONI *et al.*, 1992). SPANGENBERG *et al.* (1995a) ont obtenu, par fusion de protoplastes, des "**cybrides**" entre fétuque élevée et ray-grass d'Italie. Ils montrent également que l'utilisation de protoplastes de fétuque élevée métaboliquement inactivés et de protoplastes de ray-grass d'Italie, préalablement irradiés, permet de moduler l'apport de chromosomes de ray-grass dans le génome de la fétuque.

**La fusion de protoplastes ouvre aussi la perspective de réarrangements des gènes non-nucléaires**, gènes portés essentiellement par les mitochondries et les chloroplastes du cytoplasme. En effet, lors

de la fécondation naturelle, seul le gamète femelle contribue, par son apport de cytoplasme, à la variabilité génétique extra-nucléaire. En hybridation fétuque x ray-grass où l'espèce ray-grass est utilisée le plus souvent comme parent femelle, la fusion de protoplastes permet une contribution plus équilibrée de la variabilité génétique d'origine cytoplasmique des deux partenaires. La stérilité mâle nucléo-cytoplasmique étant contrôlée par des gènes mitochondriaux, il est aussi envisagé d'utiliser l'**hybridation somatique asymétrique pour transférer rapidement des cytoplastes** induisant la stérilité mâle chez les ray-grass (CREEMERS-MOLENAAR *et al.*, 1992), pour finalement produire des semences hybrides F1. L'approche est à mettre en parallèle avec des transferts par rétrocroisements, forcément longs, voire impossibles si le cytoplaste mâle-stérile provient d'une espèce trop distante. Au niveau interspécifique, l'équipe de l'*Institut for Plant Sciences* à Zurich poursuit la même approche avec des fusions ray-grass anglais + fétuque rouge ou vulpin des prés pour combiner des caractères de qualité et de pérennité. Les retombées variétales possibles de ces programmes restent lointaines et devront être rapprochées des programmes d'hybridation interspécifique fétuque élevée x ray-grass, à base de sélection classique, entrepris par d'autres équipes (THOMAS et HUMPHREYS, 1991 ; HUMPHREYS et THOMAS, 1993 ; THOMAS, 1994 ; GHESQUIÈRE *et al.*, 1996).

En conclusion, **les techniques de culture *in vitro* permettent une maîtrise du cycle cellulaire** qui n'est pas possible autrement. Elles peuvent être appliquées en routine sur toutes les plantes fourragères, aussi bien graminées que légumineuses. Cependant, si l'obtention de protoplastes à partir d'un explant est possible sur toutes les espèces fourragères, la formation d'un cal à partir de protoplastes reste difficile chez les graminées. La maîtrise de ces techniques est liée à la compréhension des équilibres entre hormones de croissance dans les processus de différenciation et au type d'explant utilisé. Ces techniques présentent l'inconvénient de ne pas être toujours transférables à tous les individus d'une espèce même si celle-ci "répond" dans son ensemble positivement à la culture *in vitro*. Chez la luzerne, l'aptitude à l'embryogénèse somatique est dépendante du génotype (BIANCHI *et al.*, 1988) et ce caractère est sous la dépendance de deux gènes (HERNANDEZ-FERNANDEZ et CHRISTIE, 1989).

Toutes ces techniques de culture *in vitro* sont susceptibles d'entraîner des mutations. L'utilisation de conditions de milieu particulières augmente leur fréquence. Si beaucoup de ces mutations n'ont guère d'intérêt, certaines présentent un intérêt agronomique (ARCIONI *et al.*, 1987 ; DEMARLY, 1992). Cependant, leur caractère aléatoire rend leur valorisation délicate dans le cadre de programmes de sélection ou de recherche.

## Manipuler le niveau de ploïdie

Une première façon de modifier le génome des végétaux consiste à **manipuler globalement leur nombre de chromosomes, ou niveau de ploïdie**. Ceci peut se faire soit dans le sens d'un doublement (**tétra-**

**ploïdisation**), soit dans le sens d'une réduction (**haploïdisation**). D'un point de vue technique, la vulgarisation de la **cytométrie en flux** contribue au développement à grande échelle de ces programmes grâce à la rapidité de tri qu'elle permet en comparaison avec les comptages chromosomiques au microscope.

## ■ La tétraploïdisation

Elle est utilisée pour obtenir l'expression d'un nouveau phénotype ou pour exploiter la variabilité interspécifique. C'est l'une des plus anciennes "biotechnologies", appliquée chez les ray-grass, le trèfle violet et, plus secondairement, chez la fétuque des prés. La méthode la plus pratiquée consiste en un trempage d'apex dans une solution de colchicine bloquant la formation du fuseau chromatique lors du cycle mitotique. Les chromosomes ne pouvant migrer en anaphase I, il en résulte une cellule-fille possédant deux fois le nombre de chromosomes de la cellule-mère.

Les possibilités de phénomènes naturels de **non-réduction gamétique**, en particulier chez le dactyle (CASLER et HUGESSEN, 1988 ; LUMARET, 1991), le trèfle violet (PARROT *et al.*, 1985), le ray-grass (SALA *et al.*, 1989) et la luzerne (VERONESI *et al.*, 1986) ont été également explorées. Son intérêt réside en une production de gamètes dépourvus d'effets de dépression de consanguinité. Cette voie de tétraploïdisation n'a pas donné lieu, jusqu'à présent, à une utilisation significative en amélioration des espèces fourragères.

Le doublement du niveau de ploïdie conduit à une augmentation de la taille des cellules, une augmentation volumique du rapport noyau/cytoplasme ainsi qu'une augmentation du rapport volume/surface cellulaire. Les progrès agronomiques enregistrés chez les variétés tétraploïdes concernent l'appétence, liée à une teneur en matière sèche plus faible de quelques points et à une augmentation de la taille des organes chez le trèfle violet (MOUSSET-DECLAS et JAM, 1990), et une production supérieure chez le ray-grass (FEUERSTEIN et PAUL, 1991). On remarque aussi une meilleure résistance au flétrissement bactérien chez les variétés de ray-grass d'Italie tétraploïde par rapport aux variétés diploïdes. D'une façon générale, les effets propres à la tétraploïdisation sont souvent difficiles à identifier car confondus aux effets liés à l'origine du matériel et à la sélection à l'intérieur de chaque niveau de ploïdie.

Parallèlement à cet objectif de modification du phénotype, la **tétraploïdisation a été aussi largement utilisée en hybridation interspécifique** pour bénéficier des effets génétiques du doublement du nombre chromosomique. On peut ainsi rétablir la fertilité des hybrides directs entre espèces relativement distantes, comme le ray-grass et la fétuque, ou incompatibles comme les types européen et méditerranéen de fétuque élevée. La tétraploïdisation facilite aussi le rétablissement des associations en paires de chromosomes homologues (bivalents) à la méiose, permettant, par exemple, une stabilité et une homogénéité supérieures chez les variétés de ray-grass hybride.



## ■ L'haplo-diploïdisation

### L'haplo-diploïdisation a pour objectif l'obtention de matériel fixé permettant d'envisager la production de variétés hybrides F1.

Chez les espèces allogames, la vigueur est souvent associée à un degré élevé d'hétérozygotie. La recherche de variétés hybrides simples ou doubles passe alors par la création et la sélection de lignées fixées. Alors que cette étape est bien maîtrisée et peut être accélérée chez le maïs, elle ne peut être envisagée facilement chez les espèces fourragères. L'alternative pour ces espèces consiste donc à réduire dans un premier temps le nombre chromosomique par culture de gamètes, **androgénèse** le plus souvent, puis de rétablir le niveau initial de ploïdie par traitement à la colchicine comme précédemment (KASPERBAUER *et al.*, 1980 ; OLESEN *et al.*, 1988). Pratiquement, les techniques d'androgénèse consistent à mettre en culture *in vitro* des anthères immatures sur lesquelles on observe une néoformation de cals puis une embryogénèse qui permet d'obtenir des plantules. Bien que l'on ne trouve plus guère de publications dans ce domaine depuis les années 1990, il semble que certaines entreprises privées maîtrisent maintenant suffisamment la méthodologie pour envisager la production de ray-grass hybride F1 simple ou double. Outre la perspective variétale, l'haploïdisation est une méthode qui tend à se développer en hybridation interspécifique, en particulier ray-grass x fétuque, pour stabiliser rapidement du matériel introgressé au niveau tétraploïde.

Il existe, pour mémoire, d'autres alternatives à l'haploïdisation pour l'obtention de variétés hybrides F1. L'une d'elles fait appel à l'utilisation de substances **gamétocides**. Les matières actives élaborées par les sociétés Rohm et Haas, reprises ensuite par ICI Seeds, pour les espèces de grande culture (blé, maïs, tournesol) se sont révélées cependant très délicates d'emploi sur graminées fourragères. **L'auto incompatibilité**, contrôlée par deux gènes chez le ray-grass, a été aussi largement expérimentée à la Station d'Aberystwyth au Pays de Galles (HAYWARD, 1988). La stratégie passe par la création de lignées, plus ou moins fixées et autocompatibles en régime d'autofécondation forcée, mais suffisamment autoincompatibles en pollinisation libre pour assurer un taux d'intercroisement élevé lorsqu'on les met en présence l'une de l'autre dans un dispositif de production de semences en lignes alternées. Cependant, l'utilisation de l'autoincompatibilité ne semble pas se développer significativement en création variétale fourragère. Une dernière possibilité recourt, d'une façon analogue à de nombreuses espèces allogames, à l'utilisation de la **stérilité mâle nucléo-cytoplasmique**. L'avantage cette fois des espèces fourragères est qu'il n'est pas forcément nécessaire de restaurer la fertilité de la variété commerciale puisque le produit final consiste dans le cas présent, en une biomasse végétative. Chez le dactyle, où on a trouvé des individus mainteneurs de stérilité (MOUSSET, 1992), la production de semences consisterait à cultiver en lignes alternées une population mâle-stérile (4 lignes sur 5) servant de parent femelle, et une variété synthétique (1 ligne sur 5) servant de parent mâle. La variété commerciale serait soit un hybride, si les graines étaient récoltées sur le parent mâle stérile, soit un mélange d'hybride et de variété synthétique si les graines étaient récoltées sur les deux parents. Des formules hybrides

sont actuellement en expérimentation à la Station I.N.R.A. de Lusignan. L'intérêt agronomique de ce type de matériel hybride résiderait dans sa vitesse d'implantation et sa vigueur avec des productions en fauche au printemps très supérieures lors des premières exploitations.

## Caractériser le génome

L'essor des techniques de biologie moléculaire depuis les années 1980 fait qu'**il est maintenant envisageable d'accéder à la connaissance du génotype** soit dans un but de description, soit pour renforcer l'efficacité des méthodes de sélection classiques. Cependant, le génome des végétaux reste d'une taille considérable par rapport à celui de certaines bactéries ou champignons, ce qui exclut un séquençage exhaustif du génome. *Arabidopsis thaliana*, une espèce de la famille des *Brassicaceae* dont le génome est considéré comme le plus petit chez les végétaux, renferme au sein de 5 paires de chromosomes, plus de 100 millions de paires de bases codant pour 14 000 à 20 000 gènes transcrits. De plus, le génome est structuré en nombreuses régions non codantes ; au niveau même des gènes, leur séquence en bases nucléotidiques est fragmentée en secteurs qui seront épissés après la transcription en ARNm (exons) tandis que les secteurs abandonnés (introns) ne seront pas traduits en protéines de structure ou enzymes.

Dans ce contexte, c'est bien une approche par balisage de la structure du génome qui s'impose et **la recherche de marqueurs moléculaires est devenue un enjeu majeur** dans la plupart des programmes d'amélioration des plantes. Les marqueurs moléculaires révèlent un polymorphisme au niveau des protéines (isoenzymes) ou directement au niveau de l'ADN (marqueurs RFLP, RAPD par exemple). Ils sont mis en évidence, après des procédures variées d'extraction et de révélation, sous forme de bandes dans des gels d'électrophorèse (SANTONI, 1996 ; LEFEBVRE et CHÈVRE, 1995). Ils permettent d'associer à un génotype la présence ou l'absence d'une bande ou d'un ensemble de bandes. Les marqueurs moléculaires étant des caractères à hérédité mendélienne et étant disponibles en grand nombre, ils permettent certaines applications telles que l'établissement de cartes génétiques, l'identification des variétés et le repérage de gènes impliqués dans des caractères agronomiques.

## ■ Cartographier le génome

L'établissement de **cartes génétiques** de marqueurs moléculaires (c'est-à-dire leur assignation à des chromosomes et l'estimation de leur distance relative en termes de taux de recombinaison) n'en est qu'à ses débuts chez les espèces fourragères. Chez les légumineuses, *Medicago truncatula*, espèce diploïde de luzerne annuelle, a fait l'objet de trois cartes indépendantes par BRUMMER *et al.* (1993), ECHT *et al.* (1993) et KISS *et al.* (1993). Des cartes, encore partielles, ont aussi été publiées chez la fétuque élevée (XU *et al.*, 1995) et le ray-grass (EVANS

et al., 1991 ; HAYWARD et al., 1994). La polyploïdie, fréquente chez les espèces fourragères, explique en partie le retard pris par rapport à d'autres espèces et justifie d'aborder la cartographie génétique par des espèces diploïdes apparentées aux espèces cultivées (ray-grass d'Italie et/ou fétuque des prés diploïdes pour la fétuque élevée hexaploïde ; *M. truncatula* diploïde pour la luzerne cultivée tétraploïde). Le manque de matériel adéquat pour des études de ségrégation (F2, rétrocroisements) ou la difficulté à l'obtenir en effectif suffisant sont aussi des handicaps ainsi que la dispersion et le faible niveau des moyens de recherche accordés généralement aux espèces fourragères.

## ■ Identifier et classer les variétés

Les marqueurs moléculaires, indépendamment de l'établissement de cartes génétiques, offrent aussi **de nouvelles perspectives pour décrire, et donc protéger, du matériel génétique**. Leur multiplicité, leur indépendance vis-à-vis des effets du milieu et leur contrôle génétique simple (monogénique et additif le plus souvent) permettent en effet de dresser de véritables **cartes d'identité des variétés** ou de tout autre matériel génétique d'intérêt (lignées), avec un pouvoir discriminant jusqu'à présent inégalé. Chez les ray-grass, cette approche est déjà engagée depuis longtemps à l'aide de loci enzymatiques venant compléter les études de Distinction, Homogénéité, Stabilité (DHS) des variétés par des caractères morphologiques (LALLEMAND et al., 1991). L'utilisation des marqueurs enzymatiques a cependant ses propres limites. De plus, le nombre croissant de variétés candidates à l'inscription, souvent très difficiles à distinguer, va vraisemblablement stimuler l'application de marqueurs moléculaires simples d'utilisation (RAPD, marqueurs PCR-spécifiques) à la distinction de variétés de ray-grass, de luzerne de type flamand ou de fétuque élevée à gazon. Les variétés de luzerne peuvent ainsi être distinguées à l'aide de marqueurs RAPD (CROCHEMORE et al., 1996) ou RFLP (PUPILLI et al., 1996). Une perspective pourra être également le contrôle des mélanges variétaux de graminées, compte tenu des dispositions communautaires autorisant leur vente en France dans un proche avenir.

Les marqueurs moléculaires peuvent aussi servir à décrire et classer le matériel végétal. Des études phylogénétiques, taxonomiques, de biologie des populations ou de gestion des ressources génétiques sont possibles. Par exemple, YU et PAULS (1993a) et CROCHEMORE et al. (1996) proposent un classement de populations de luzerne pérenne basé sur des marqueurs RAPD, alors que BONNIN et al. (1996) analysent la structure de populations de luzerne diploïde.

## ■ Rechercher des marqueurs de caractères agronomiques

Une autre utilisation des marqueurs moléculaires touche à l'amélioration des plantes et à l'aide qu'ils sont susceptibles d'apporter pour rendre la sélection plus efficace. Un premier objectif peut être d'identifier un marqueur moléculaire ségrégeant avec un caractère

agronomique à hérédité simple. La sélection de génotypes d'après ce marqueur moléculaire s'avère plus aisée qu'à l'aide du caractère agronomique quand celui-ci est difficile à évaluer (cas de résistance à des maladies, LEFEBVRE et CHÈVRE, 1995). Sur la luzerne, YU et PAULS (1993b) ont identifié un marqueur RAPD associé à l'aptitude à l'embryogénèse somatique.

Pour les caractères quantitatifs qui sont sous la dépendance d'un grand nombre de gènes, l'idée est de **rechercher des QTL** (Quantitative Trait Loci) en évaluant si la présence d'allèles à certains loci marqueurs peut expliquer une part significative de la variation du caractère (DE VIENNE, 1996 ; CHARCOSSET, 1996). En ce sens, la démarche ne diffère pas de la sélection sur caractère associé où l'on exploite l'information apportée par des caractères hautement héréditaires et en étroite corrélation génétique avec le caractère que l'on veut améliorer. En partie à cause du manque de cartes génétiques, l'identification de QTL chez les espèces fourragères est encore limitée ; chez le ray-grass d'Italie, quelques loci RAPD dérivés d'une unique amorce sont apparus corrélés à la tolérance à la rouille couronnée (DE LOOSE *et al.*, 1994) ; HAYWARD *et al.* (1994) mettent aussi en évidence quelques QTL de composantes de la floraison chez le ray-grass anglais. Quelques relations, non exploitées jusqu'à présent, entre des loci enzymatiques et la production ou la précocité ont été mises en évidence chez le ray-grass anglais (HAYWARD et McADAM, 1988), la teneur en glucides solubles (HUMPHREYS, 1992) et les gènes d'autoincompatibilité (EICKMEYER et WRICKE, 1994). La détection de QTL pour des caractères héréditaires est la plus fréquente car plus aisée ; elle sera plus difficile pour des caractères quantitatifs peu héréditaires tels que la production.

**L'hybridation interspécifique**, en particulier fétuque x ray-grass, est une piste intéressante pour la recherche de QTL, en particulier pour les caractères quantitatifs spécifiques de l'une ou l'autre espèce comme l'appétence, la remontaison ou la pérennité. L'approche globale des QTL pourrait être fructueuse quand on sait combien la structure du génome des végétaux a pu être conservée au cours de leur évolution. MOORE *et al.* (1995) montrent ainsi que chez des espèces aussi différentes que le maïs, le sorgho, la canne à sucre, le millet, le blé et le riz, l'organisation du génome, quel que soit le nombre de chromosomes, ne fait que résulter du réarrangement de 19 blocs de gènes ancestraux communs à l'ensemble des six espèces. Ainsi, tout QTL identifié chez les céréales en serait potentiellement un chez les graminées fourragères. C'est **une amélioration raisonnée sur un plan multispécifique** que nous font entrevoir les acquis récents de la biologie moléculaire et, de ce point de vue, les espèces fourragères pourraient avoir beaucoup à y gagner compte tenu de leur retard dans le domaine des biotechnologies. A ce niveau de variation génétique, une autre technique pourrait être utilisée : **l'hybridation in situ d'ADN génomique** permet un véritable repérage physique des remaniements chromosomiques entre les deux parents chez un hybride fétuque des prés x ray-grass d'Italie (THOMAS *et al.*, 1994). Par microdissection de fragments chromosomiques porteurs de gènes d'intérêt et insertion dans des vecteurs adéquats, ce sont des méthodes de transformation des plantes parfaitement ciblées et puisant dans une diversité génétique quasi illimitée que l'on pourrait envisager.

## Transformer les espèces

La transformation génétique consiste à insérer dans le génome d'une plante hôte un gène étranger. Différentes techniques existent (figure 4) : indirectes (via *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*) ou directes (par électroporation, biolistique, par traitement au polyéthylène glycol ou sous vide). Les recherches sur les plantes fourragères sont plutôt en retard dans ce domaine, cependant, de nombreux travaux ont été rapportés sur les légumineuses fourragères.

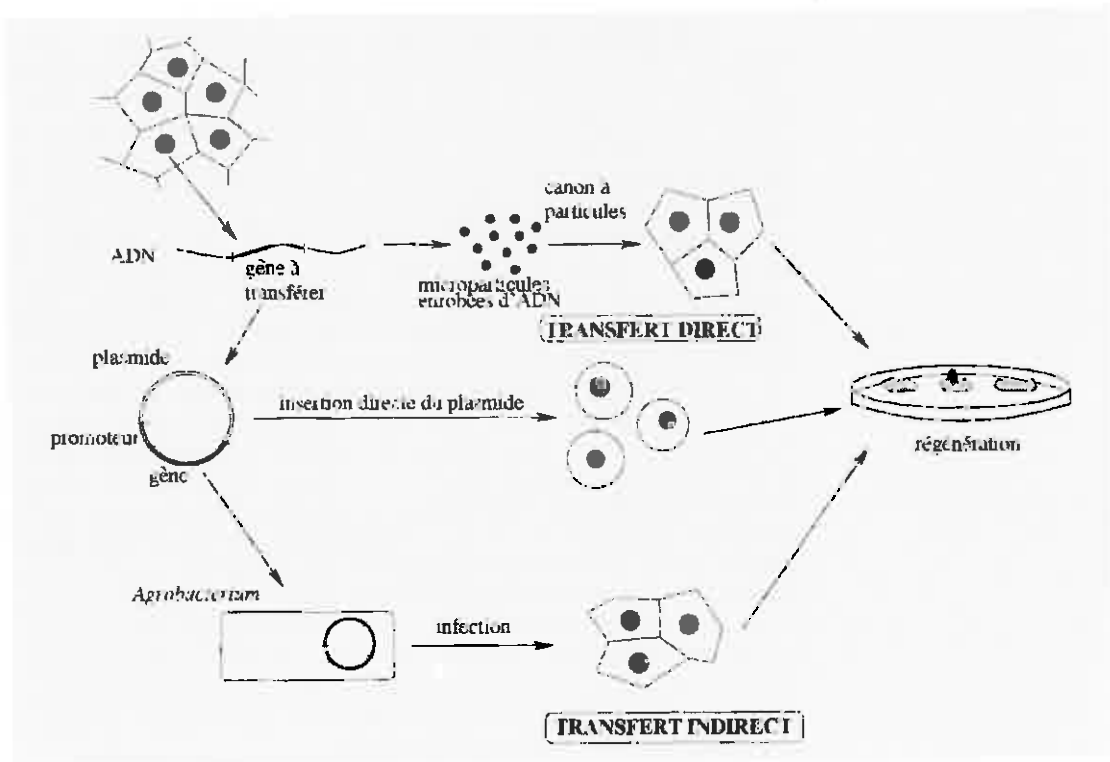
La transformation se conçoit par deux stratégies fondamentalement opposées. La **stratégie "sens"** consiste à introduire un gène dont on recherchera à favoriser au maximum l'expression, c'est-à-dire la production d'un composé, enzymatique le plus souvent, entièrement nouveau dans la plante ou existant déjà mais en faible quantité. A l'opposé, la **stratégie "anti-sens"** consiste à introduire un gène qui bloquera ou diminuera une fonction existant chez la plante. Cette stratégie anti-sens est basée sur l'introduction d'un gène dont la séquence est en sens inverse de celle du gène dont on veut bloquer la fonction. Ainsi, après transcription de l'ADN en ARNm, l'ARNm du gène introduit viendra s'hybrider avec l'ARNm du gène natif et empêcher sa traduction en protéine.

Les types de **gènes intéressants à insérer** sont les suivants :

- **Les gènes de résistance à des stress biotiques** : des gènes ont ainsi été introduits pour conférer des résistances à des insectes, virus

FIGURE 4 : Les différentes techniques de transformation génétique (d'après HABERT, 1994).

FIGURE 4 : The different techniques of genetic transformation (after HABERT, 1994).



ou maladies (HILL *et al.*, 1991). On peut rattacher à cette catégorie des gènes induisant des résistances à des antibiotiques ou des herbicides.

- **Les gènes de résistance à des stress abiotiques** : quelques auteurs ont rapporté l'existence de gènes induisant des résistances à la salinité, à la sécheresse, au froid et aux chocs thermiques. Ces gènes peuvent être transférés aux plantes fourragères (BARTELS et NELSON, 1994 ; LABERGE *et al.*, 1994).

- **Les gènes de protéines particulières** : dans l'objectif de modifier la composition en acides aminés des fourrages, et en particulier pour augmenter la proportion d'acides aminés soufrés, il est proposé d'introduire le gène d'une protéine riche en acides aminés soufrés. Ainsi, TABE *et al.* (1995) rapportent avoir transformé la luzerne par un tel gène. Cependant, l'expression du gène introduit n'a pas été suffisante pour modifier significativement la balance en acides aminés.

- **Les gènes de voies de biosynthèse** : différents composés, formés successivement dans une chaîne métabolique peuvent être favorables ou défavorables à la croissance ou à la qualité de la plante. Il peut alors être intéressant d'obtenir une sur-expression d'un gène favorable d'une voie métabolique pour augmenter la production d'un produit final. A l'opposé, on peut transférer un gène de façon à réduire la production d'un composé jugé défavorable (par stratégie anti-sens).

- **Les gènes intervenant dans la symbiose** entre *Rhizobium* et légumineuses : la transformation permet d'étudier de tels gènes. Les débouchés pourraient être une meilleure efficacité de la symbiose pour les légumineuses. A très long terme, ce type de gènes pourrait être intéressant pour introduire la symbiose chez les plantes non légumineuses.

**Chez la luzerne, des travaux de transformation sont en cours** à l'I.N.R.A. de Lusignan, en relation avec l'Université de Poitiers, pour introduire deux types de gènes liés à des voies métaboliques. Deux exemples seront présentés ici.

Le premier s'inspire de résultats obtenus sur tabac, et concerne un gène de la voie de biosynthèse des isoprénoïdes. Cette famille de composés comprend en particulier des hormones végétales (cytokinines, gibbérélines, acide abscissique), mais aussi des phytoalexines et des phytostéroïdes intervenant dans la membrane plasmique. Chez le tabac, l'introduction d'un gène codant pour une enzyme en amont de la voie de biosynthèse (la mévalonate kinase) a conduit à des plantes avec des feuilles plus grandes, et dont l'ensemble de la phénologie était accélérée (LEJEUNE, 1994). Ce type de caractère serait utile chez la luzerne pour accélérer la vitesse de repousse après la coupe pour que le couvert intercepte le plus rapidement possible le maximum du rayonnement solaire. Ce type de recherche s'inscrit dans le cadre d'une augmentation de la productivité, sans diminution de la pérennité ni de la valeur alimentaire.

Le second exemple concerne l'amélioration de la valeur alimentaire grâce à la stratégie anti-sens. Il a été montré que la digestibilité de la luzerne, et d'autres espèces telles que le maïs, est liée à la fois à la teneur en lignine et à sa composition (JUNG et DEETZ, 1993 ; VAN

SOEST, 1993 ; ARGILLIER *et al.*, 1996). La voie de biosynthèse de la lignine est complexe mais certaines enzymes semblent y jouer un rôle clé. Les gènes correspondants ont été clonés ou sont en cours de clonage. Un blocage ou une diminution de l'activité de ces enzymes devrait ainsi permettre de réduire la teneur en lignine, voire de modifier sa composition.

**Chez les graminées fourragères, la transformation génétique est moins avancée** que chez la luzerne, en partie parce que l'utilisation des vecteurs *Agrobacterium* ne paraît pas possible. Les techniques de transformation employées se réduisent ainsi au transfert direct d'ADN dans des protoplastes issus de cultures de cellules embryogènes en suspension et à l'utilisation de constructions géniques expérimentales (plasmide dans lequel est inséré un gène de tolérance à un antibiotique ou un herbicide et associé éventuellement à un gène "rapporteur"). Les travaux publiés en matière de transformation chez les graminées se limitent pour l'essentiel à la fétuque élevée (WANG *et al.*, 1992 ; HA *et al.*, 1992 ; SPANGENBERG *et al.*, 1995a et b), la fétuque des prés (SPANGENBERG *et al.*, 1995a), la fétuque rouge (SPANGENBERG *et al.*, 1994, 1995b), le dactyle (HORN *et al.*, 1988), le ray-grass d'Italie (POTRYKUS *et al.*, 1985 ; PÉREZ-VICENTE *et al.*, 1993) et le ray-grass anglais (HENSGENS *et al.*, 1993 ; PÉREZ-VICENTE *et al.*, 1993).

Si techniquement la transformation ne pose pas de problèmes insurmontables, **certains génotypes semblent réfractaires à la transformation**, au moins suivant certaines méthodes (DU *et al.*, 1994). **La place de la transformation dans les schémas de sélection doit être réfléchi**. D'une part, le bon fonctionnement d'un gène au sein du génome dans lequel il est inséré n'est pas immédiat (LYDIATE *et al.*, 1995). L'effet d'un gène majeur, qu'il soit naturel ou introduit par transformation, conduit souvent à réviser les connaissances génétiques ou physiologiques du caractère qu'il contrôle (BUIATTI et BOGNANI, 1995). De plus, la stabilité de l'expression du gène doit être vérifiée dans le temps et au cours des générations ultérieures (MEYER, 1995). D'autre part, les Autorisations de Mise sur le Marché accordées à des plantes allogames transformées (Organismes Génétiquement Modifiés) sont encore très rares pour éviter la dissémination incontrôlée de gènes à forte valeur sélective (gènes de résistance à des herbicides) chez les adventices apparentées. Cette voie de création variétale présente donc des aléas mais, dans de nombreux cas, fournit aussi une information précieuse sur l'effet des gènes et leur fonctionnement ou sur leur site d'expression dans la plante. Cette seule information est souvent susceptible d'applications en amélioration classique des variétés.

## Conclusion

Les biotechnologies ont connu d'importants développements au cours des dernières années. La biologie moléculaire, en particulier, est aujourd'hui en plein essor et offre de nouvelles possibilités, tant techniques que conceptuelles, pour être utilisée aussi bien en sélection qu'en recherche plus fondamentale. Cependant, les biotechnologies ne peuvent se substituer à elles seules aux méthodes classiques de créa-

tion variétale qui restent actuellement à la base du progrès génétique. De même, elles ne peuvent remplacer des évaluations précises du matériel végétal au champ ; il est clair par exemple que la mise en évidence de QTL passe par une connaissance encore approfondie du fonctionnement de la plante entière.

Les biotechnologies ont aussi un coût ; l'expérience en la matière chez d'autres espèces de grande culture montre que le retour sur investissements des recherches peut être long, temps pendant lequel les programmes de création variétale ne peuvent pas faire l'économie des méthodes de sélection classique. Dans un contexte où les budgets de recherche, publique ou privée, se tendent, on peut s'interroger sur le développement et l'avenir à long terme de programmes biotechnologiques propres aux espèces fourragères. Les méthodes développées devront pourtant s'adapter à des objectifs de sélection en évolution suite aux modifications de la Politique Agricole Commune ou aux préoccupations liées à l'environnement.

**Au sein de l'I.N.R.A.**, les équipes du Département de Génétique et d'Amélioration des Plantes en charge de programmes sur des espèces fourragères ont structuré leurs **recherches utilisant les biotechnologies** autour de quelques grands thèmes :

- **le marquage moléculaire** pour :
- **l'étude des ressources génétiques** du genre *Lolium*, incluant les aspects de sythénie avec les céréales à paille (INRA Clermont-Ferrand), du genre *Medicago* (INRA Montpellier) et de la luzerne cultivée (INRA Lusignan) ;
- **l'amélioration des hybrides fétuque x ray-grass** (INRA Lusignan) ;
- **la transformation génétique de la luzerne** (INRA Lusignan) **et du ray-grass anglais via des champignons endophytes** (INRA Clermont-Ferrand).

Ces programmes se développent en cohésion forte avec une expérimentation au champ, la recherche privée et une coopération internationale.

Travail présenté aux Journées d'information de l'A.F.P.F.  
"Les prairies semées destinées aux ruminants :  
quelle sélection végétale pour demain ?",  
les 28 et 29 mars 1996.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARCIONI S., PEZZOTTI M., DAMIANI F. (1987) : "In vitro selection of alfalfa plant resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*", *Theor. Appl. Genet.*, 74, 700-705.
- ARCIONI S., DAMIANI F., PICCIRILLI M., PUPILLI F. (1992) : "Overcoming sexual incompatibility in the genus *Medicago* through embryo rescue and somatic hybridization", *Proc. 13<sup>th</sup> Eucarpia Congress*, Angers 1992, 225-226.



- ARGILLIER O., BARRIÈRE Y., LILA M., JEANNETEAU F., GÉLINET K., MÉNANTEAU V. (1996) : "Genotypic variation in phenolic components of cell-walls in relation to the digestibility of maize stalks", *Agronomie*, 16, 123-130.
- BARTELS D., NELSON D. (1994) : "Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics", *Plant Cell Environ.*, 17, 659-667.
- BIANCHI S., FLAMENT P., DATTÉE Y. (1988) : "Embryogénèse somatique et organogénèse in vitro chez la luzerne : évaluation des potentialités de divers génotypes", *Agronomie*, 8, 121-126.
- BONNIN I., HUGUET T., GHERARDI M., PROSPERI J.M., OLIVIERI I. (1996) : "High level of polymorphism and spatial structure in a selfing plant species, *Medicago truncatula* (Leguminosae), using RAPD markers", *Amer. J. Bot.*, sous presse.
- BRUMMER E.C., BOUTON J.H., KOCHERT G. (1993) : "Development of a RFLP map in diploid alfalfa", *Theor. Appl. Genet.*, 86, 329-332.
- BUIATTI M., BOGNANI P. (1995) : "Physiological complexity and plant genetic manipulation", *Euphytica*, 85, 135-147.
- CASLER M.D., HUGESSEN P.M. (1988) : "Performance of tetraploid progeny derived from 2x-4x intersubspecific crosses in *Dactylis glomerata* L.", *Genome*, 30, 591-596.
- CHARCOSSET A. (1996) : "L'identification de locus affectant des caractères quantitatifs (QTL) à l'aide de marqueurs génétiques est-elle justifiée pour la sélection ?", *Le Sélectionneur Français*, 46, 35-45.
- CREEMERS-MOLENAAR, J., R.D. HALL, F.A. KRENS (1992) : "Asymmetric protoplast fusion aimed at intraspecific transfer of cytoplasmic male sterility (CMS) in *Lolium perenne* L.", *Theor. Appl. Genet.*, 84, 763-770.
- CROCHEMORE M.L., HUYGHE C., KERLAN M.C., DURAND F., JULIER B. (1996) : "Partitioning and distribution of RAPD variation in a set of populations of the *Medicago sativa* complex", *Agronomie*, sous presse.
- DE VIENNE D. (1996) : "Stratégies de caractérisation des locus à effets quantitatifs", *Le Sélectionneur Français*, 46, 19-25.
- DE LOOSE M., GHESQUIÈRE A., REHEUL D., VAN BOCKSTAELE E. (1994) : "Detection of RAPD markers linked to crown rust tolerance in *Lolium multiflorum* L.", *Proc. 18<sup>th</sup> Eucarpia Fodder Crops Section Meeting*, Loen 1993, 285-286.
- DEMARLY Y. (1992) : "Les biotechnologies applicables à la luzerne", *Proc. 10<sup>th</sup> Int. Conf. Eucarpia Medicago spp. Group*, Lodi 1992, 141-179.
- DU S., ERICKSON L., BOWLEY S. (1994) : "Effect of plant genotype on the transformation of cultivated alfalfa (*Medicago sativa*) by *Agrobacterium tumefaciens*", *Plant Cell Rep.*, 16, 330-334.
- ECHT C.S., KIDWELL K.K., KNAPP S.J., OSBORN T.C., MCCOY T.J. (1993) : "Linkage mapping in diploid alfalfa (*Medicago sativa*)", *Genome*, 37, 61-71.
- EICKMEYER F., WRICKE G. (1994) : "Linkage relationships of isozyme markers and incompatibility genes in *Lolium*", *Proc. 18<sup>th</sup> Eucarpia Fodder Crops Section Meeting*, Loen 1993, 289-290.
- EVANS G.M., HAYWARD M.D., FORSTER J.W., MCADAM N.J., SCANLON M.J., STAMMERS M., WILL J.A.K. (1991) : "Genome analysis and its manipulation in *Lolium*", *Proc. 16<sup>th</sup> Eucarpia Fodder Crops Section Meeting*, Wageningen 1990, 141-146.

- FEUERSTEIN U., PAUL C. (1991) : "On the designed development of tetraploid annual ryegrass varieties", *Ploidy and chromosome manipulation in forage breeding, Proc. 17<sup>th</sup> Meet. Fodder Crop Section Eucarpia*, 23-28.
- GHESEQUIÈRE M., EMILE J.C., JADAS-HÉCART J., MOUSSET C., TRAINÉAU 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, sous-presse.
- HA S.B., WU F.S., THORNE T.K. (1992) : "Transgenic turf-type tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) plants regenerated from protoplasts", *Plant Cell Rep.*, 11, 601-604.
- HABERT P. (1994) : "Le génie génétique testé dans les champs", *La Recherche*, 25, 1126-1132.
- HAYWARD M.D. (1988) : "Exploitation of the incompatibility mechanism for the production of F1 hybrid forage grasses", *Euphytica*, 39, 33-37.
- HAYWARD M.D., McADAM N.J. (1988) : "The effect of isozyme selection on yield and flowering time in *Lolium perenne*", *Plant Breed.*, 101, 24-29.
- HAYWARD M.D., McADAM N.J., JONES J.G., EVANS C., EVANS G.M., FORSTER J.W., USTIN A., HOSSAIN K.G., QUADER B., STAMMERS M., WILL J.K. (1994) : "Genetic markers and the selection of quantitative traits in forage grasses", *Euphytica*, 77, 269-275.
- HENSGENS L.A.M., DE BAKER E.P.H.M., VAN OS-RUYGROK E.P., RUEB S., VAN DER MARK F., VAN DER MAAS H.M., VAN DER VEEN M., KOOMAN-GERSMANN M., HART L., SCHILPEROORT R.A. (1993) : "Transient and stable expression of *gusA* fusions with rice genes in rice, barley and perennial ryegrass", *Plant Mol. Biol.*, 22, 1101-1127.
- HERNANDEZ-FERNANDEZ M.M., CHRISTIE B.R. (1989) : "Inheritance of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.)", *Genome*, 32, 318-321.
- HILL, K.R., JARVIS-EAGAN N., HALK, E.L., KRAHN K.J., LIAO L.W., MATHEWSON R.S., MERLO D.J., NELSON S.E., RASHKA K.E., LOESCH-FRIED L.S. (1991) : "The development of virus-resistant alfalfa *Medicago sativa* L.", *BioTechnology*, 9, 373-377.
- HORN M.E., SHILITO R.D., CONGER B.V., HARME C.T. (1988) : "Transgenic plants of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) from protoplast", *Plant Cell Rep.*, 7, 469-472.
- HUMPHREYS M.O. (1992) : "Association of agronomic traits with isozyme loci in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)", *Euphytica*, 59, 141-150.
- HUMPHREYS M.W., THOMAS H. (1993) : "Improved drought resistance in introgression lines derived from *Lolium multiflorum* x *Festuca arundinacea* hybrids", *Plant Breed.*, 111, 155-161.
- JUNG H.G., DEETZ D.A. (1993) : "Cell wall lignification and degradability", H.G. Jung *et al.* (Eds), *Forage cell wall structure and digestibility*, ASA-CSSA-SSSA, Madison, 315-346.
- KASPERBAUER M.J., BUCKNER M.C., SPRINGER W.D. (1980) : "Haploid plants by anther-panicle culture of tall fescue", *Crop Sci.*, 20, 103-107.
- KISS G.B., CSANADI G., KALMAN K., OKRESZ L. (1993) : "Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers", *Mol. Gen. Genet.*, 238, 129-137.

- LABERGE S., VÉZINA L.P., CASTONGUAY Y., NADEAU P. (1994) : "Screening and engineering for stress tolerance", *Report 34<sup>th</sup> North American Alfalfa Improvement Conference*, 46.
- LALLEMAND J., MICHAUD O., GRENÈCHE M. (1991) : "Electrophoretical description of ryegrass varieties: a catalogue", *Plant Varieties and Seeds*, 4, 11-16.
- LEFEBVRE V., CHEVRE A.M. (1995) : "Tools for marking plant disease and pest resistance genes: a review", *Agronomie*, 15, 3-19.
- LEJEUNE F. (1994) : *Vitrométhodes et techniques de génie génétique appliquées aux solanacées. Transfert d'un gène favorisant la régénération, la croissance et la précocité*, thèse de Doctorat de l'Université de Poitiers, 105 p.
- LUMARET R. (1991) : "The diplogamete method and ploidy manipulation in fodder crops breeding", *Proc. 16<sup>th</sup> Eucarpia Fodder Crops Section Meeting*, Wageningen 1990, 95-100.
- LYDIATE D., DALE P., LAGERCRANTZ U., PARKIN I., HOWELL P. (1995) : "Selecting the optimum genetic background for transgenic varieties, with examples from *Brassica*", *Euphytica*, 85, 351-358.
- McKERZIE B.D. (1994) : "Somatic embryogenesis and artificial seeds in alfalfa", *Report 34<sup>th</sup> North American Alfalfa Improvement Conference*, 44.
- MEYER P. (1995) : "Variation of transgene expression in plants", *Euphytica*, 85, 359-366.
- MOORE G., DEVOS K.M., WANG Z., GALE M.D. (1995) : "Grasses, line up and form a circle", *Curr. Biol.*, 5, 737-739.
- MOUSSET C. (1992) : "Attempt to use cocksfoot male-sterility for the creation of F1 hybrids improved for several components of agronomic value", *Proc. 13<sup>th</sup> Eucarpia Congress*, Angers 1992, 103-104.
- MOUSSET-DECLAS C., JAM A. (1990) : "Comparison between 2x and 4x isogenic clones of red clover", *Proc. 18<sup>th</sup> Eucarpia Fodder Crops Section Meeting*, Loen 1993, 193-194.
- OLESEN A., ANDERSEN S.B., DUE I.K. (1988) : "Anther culture response in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)", *Plant Breed.*, 101, 60-65.
- PARROTT W.A., SMITH R.R., SMITH M.M. (1985) : "Bilateral sexual tetraploidization in red clover", *Can. J. Genet. Cytol.*, 27, 64-68.
- PÉREZ-VICENTE R., WEN X.D., WANG X.Y., LEDUC N., SAUTTER C., WEHRLI E., POTRYKUS I., SPANGENBERG G. (1993) : "Culture of vegetative and floral meristems in ryegrass: potential targets for micro-ballistic transformation", *J. Plant. Physiol.*, 142, 610-617.
- POTRYKUS I., SAUL M.W., PETRUSKA J., PASZKOWSKI J., SHILLITO R. (1985) : "Direct gene transfer to cells of a graminaceous monocot", *Mol. Gen. Genet.*, 199, 183-188.
- PUPILLI F., BUSINELLI S., PAOLOCCI F., DAMIANI F., ARCIONI S. (1996) : "Extent of RFLP variability in tetraploid populations of alfalfa, *Medicago sativa*", *Plant Breed.*, 115, 106-112.
- SALA C.A., CAMADRO E.L., SALABURY M.T., MENDIBURU A.O. (1989) : "Cytological mechanisms of 2n pollen formation and unilateral sexual polyploidization in *Lolium*", *Euphytica*, 43, 1-6.
- SANTONI S. (1996) : "Les marqueurs moléculaires utilisables en amélioration des plantes", *Le Sélectionneur Français*, 46, 3-18.

- SPANGENBERG G., WANG Z.Y., NAGEL J., POTRYKUS I. (1994) : "Protoplast culture and regeneration of transgenic plants in red fescue (*Festuca rubra* L.)", *Plant Sci.*, 97, 83-94.
- SPANGENBERG G., WANG Z.Y., LEGRIS G., MONTAVON P., TAKAMIZO T., PÉREZ-VICENTE R., VALLÉS M.P., NAGEL J., POTRYKUS I. (1995a) : "Intergeneric symmetric and asymmetric somatic hybridization in *Festuca* and *Lolium*", *Euphytica*, 85, 235-245.
- SPANGENBERG G., WANG Z.Y., VALLÉS M.P., POTRYKUS I. (1995b) : "Genetic transformation in *Festuca arundinacea* Schreb. (tall fescue) and *Festuca pratensis* Huds. (meadow fescue)", Y.P.S. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in agriculture and forestry*, Springer-Verlag, Berlin, 34, 183-203.
- TABE L.M., WARDLEY-RICHARDSON T., CERIOTTI A., ARYAN A., McNABB W., MOORE A., HIGGINS T.J.V. (1995) : "A biotechnological approach to improving the nutritive value of alfalfa", *J. Anim. Sci.*, 73, 2752-2759.
- THOMAS H. (1994) : "Diversity between and within temperate forage grass species in drought resistance, water use and related physiological responses", *Asp. Appl. Biol.*, 38, 1-10.
- THOMAS H., HUMPHREYS M.O. (1991) : "Progress and potential of interspecific hybrids of *Lolium* and *Festuca*", *J. Agric. Sci. Camb.*, 117, 1-8.
- THOMAS H.M., MORGAN W.G., MEREDITH M.R., HUMPHREYS M.W., THOMAS M., LEGETT J.M. (1994) : "Identification of parental and recombined chromosomes in hybrid derivatives of *Lolium multiflorum* x *Festuca pratensis* by genomic in situ hybridization", *Theor. Appl. Genet.*, 88, 909-913.
- VAN SOEST P.J. (1993) : "Cell wall matrix interactions and degradation-Session synopsis", H.G. Jung *et al.* (Eds), *Forage cell wall structure and digestibility*, ASA-CSSA-SSSA, Madison, 377-395.
- VERONESI F.A., MARIANI A., BINGHAM E.T. (1986) : "Unreduced gametes in diploid *Medicago* and their importance in alfalfa breeding", *Theor. Appl. Genet.*, 72, 37-41.
- WANG Z.Y., TAKAMIZO T., IGLESIAS V.A., OSUSKY M., NAGEL J., POTRYKUS I., SPANGENBERG G. (1992) : "Transgenic plants of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) obtained by direct gene transfer to protoplasts", *BioTechnology*, 10, 691-696.
- XU W.W., SLEPER D.A., CHAO S. (1995) : "Genome mapping of polyploid tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) with RFLP markers", *Theor. Appl. Genet.*, 91, 947-955.
- YU K., PAULS K.P. (1993a) : "Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous populations of alfalfa by random amplification of bulked genomic DNA", *Theor. Appl. Genet.*, 86, 788-794.
- YU K., PAULS K.P. (1993b) : "Identification of a RAPD marker associated with somatic embryogenesis in alfalfa", *Plant Mol. Biol.*, 22, 269-277.

**SUMMARY**

***New prospects offered by biotechnologies to forage species***

Biotechnology nowadays offers new opportunities to overcome biological constraints in breeding forage species, which are mostly autopolyploid and outbreeding. For instance, in vitro culture, by-passing the original mating system of forage plants, makes it possible to clone elite genotypes or to intercross sexually incompatible species. The ploidy level of forage species can be altered, either by doubling the whole chromosome set, or by halving it. Tetraploidization brings about some agricultural advantages in spontaneous diploid plants such as ryegrass or red clover while doubling the chromosome set is also often used for recovering fertile interspecific hybrids and for stabilizing their progenies over generations.

Molecular biology supplies now new tools with which to characterize the plant genotype. The publication of genetic maps of forage species is in progress ; the distinctiveness given to forage cultivars by the use of molecular markers as passport data should be greatly increased in the future. Finally, the identification of molecular markers linked to quantitative traits of agricultural interest (QTLs) appears to be a new prospect in breeding for traits with a low heritability.

New skills in cellular and molecular biology have been applied to plant transformation. The introduction of alien genes into plant genomes is a promising tool for knowing how genes work and for considering new breeding strategies in forage plants as well.

Biotechnology is undoubtedly a powerful tool for investigating and for manipulating the plant genome. However it cannot by itself replace the usual procedures of selection and evaluation of forage varieties, and it preferably requires to be associated with them for more effective progress.