

Étude des variations génétiques chez quelques variétés de fétuques élevées par les marqueurs AFLP

Mohammed Mefti¹
Hamena Bouzerzour²

¹ Université Saad Dahlab
Faculté des sciences agrovétérinaires
et biologiques
Département d'agronomie
Route de Soumaa
BP 270
09000 Soumaa
Blida
Algérie
<mmeftidz@yahoo.fr>

² Université Farhat Abbas
Faculté des sciences de la nature
et de la vie
Département de biologie végétale
et d'écologie
Setif
Algérie
<hbouzerzour50@gmail.com>

Résumé

Peu d'informations sont disponibles sur la variabilité génétique chez les fétuques élevées (*Festuca arundinacea* Schreb). Ces renseignements sont importants pour la cartographie génétique des populations pour cibler la collecte de germoplasme et son utilisation en croisement. L'objectif de cette étude était d'évaluer la diversité génétique de sept variétés de fétuque élevée de diverses origines. L'évaluation était basée sur l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP), révélée par la méthode de marquage fluorescent et en utilisant des échantillons d'ADN en bulk. Sur la base des 105 marqueurs AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) obtenus par deux combinaisons d'amorces, les sept variétés testées ont été regroupées selon leurs origines géographiques. Fraydo et Lutine sont génétiquement les plus divergentes, Tanit et Sisa présentent une grande similitude génétique ; alors que Centurion est d'une structure génétique très proche des variétés Flecha et Flecha endophyte (E542) ; mais très éloignée génétiquement de la variété Lutine bien que Lutine et Centurion soient des obtentions du même institut (Institut national de la recherche agronomique [Inra]).

Mots clés : AFLP ; diversité génétique ; *Festuca arundinacea* ; germoplasme.

Thèmes : amélioration génétique ; méthodes et outils ; productions végétales.

Abstract

Study of the genetic variation of tall fescue varieties using AFLP markers

Little information is available regarding genetic variation in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb). Such information is important in constructing mapping populations and targeting germplasm collection and utilization. The objective of this study was to evaluate the genetic diversity among seven tall fescue accessions from diverse geographic origins. Tall fescue accessions were assayed by a fluorescence-labeled amplified fragment length polymorphism (AFLP) detection method using DNA samples bulked from each accession. On the basis of 105 AFLP markers from two primer combinations, the seven accessions were clustered in groups that largely supported the known origins of these plants. Fraydo and Lutine are genetically the most divergent, Tanit and Sisa are genetically very similar, whereas Centurion has a very similar structure to the genotypes Flecha and endophyte-infected Flecha (E542), and a large genetic distance from Lutine although both Centurion and Lutine were bred by the same institute (Institut national de la recherche agronomique [INRA]).

Key words: AFLP; *Festuca arundinacea*; genetic diversity; germplasm.

Subjects: genetic improvement; tools and methods; vegetal productions.

Pour citer cet article : Mefti M, Bouzerzour H, 2012. Étude des variations génétiques chez quelques variétés de fétuques élevées par les marqueurs AFLP. *Cah Agric* 21 : 4-10. doi : 10.1684/agr.2012.0540

Tirés à part : M. Mefti

Tableau 1. Description des variétés de fétuque étudiées.

Table 1. Description of the studied varieties of tall fescue.

Variétés	Sélection	Origine	Références
Lutine	Inra Lusignan, France	Types méditerranéens × types tempérés	Lelièvre <i>et al.</i> (2008)
Fraydo	Melik tallfescue, Australie	Israël	Reed <i>et al.</i> (2004)
Tanit	ISCF Lodi in Sardinia	Italie × Maroc	Pecetti <i>et al.</i> (2011)
Flecha	Gentos SA, Buenos Aires, Argentine	France × Tunisie	Malinowski (2005)
Flecha endophyté (E-542)	AgReaserch (AR) Grassland, Palmerston North, Nouvelle Zélande	France × Tunisie	Bouton <i>et al.</i> (2002).
Centurion	Inra Montpellier, France	Italie × Tunisie	www.agriobtentions.fr
Sisa	ISCF Lodi in Sardinia	Sicile (Italie)	Pecetti <i>et al.</i> (2011)

Les graminées fourragères pérennes jouent un important rôle en agriculture. Elles assurent de larges productions de viande et de lait, contribuent à la conservation des sols et à la protection de l'environnement (Wang *et al.*, 2001). Le genre *Festuca* compte une centaine d'espèces, dont certaines sont couramment utilisées comme graminées fourragères (Soreng et Davis, 1998). Sur la base de la texture de leurs feuilles, ce genre se subdivise en deux types subgénériques : les fétuques à grandes feuilles telles que *Festuca arundinacea* et *Festuca pratensis* et les fétuques à feuilles fines telles que *Festuca rubra* et *Festuca ovina* (Turgen, 1985). La fétuque élevée (*Festuca arundinacea*) est le fourrage le plus utilisé, largement cultivé dans les régions tempérées (Sleper, 1985 ; Saha *et al.*, 2005). La fétuque est une espèce allogame avec un haut degré d'auto-incompatibilité (Xu *et al.*, 1991). Pour les besoins de l'amélioration de la production et de la qualité fourragère, il est utile d'avoir des informations sur la diversité génétique disponible. Les marqueurs moléculaires s'avèrent très utiles et efficaces dans ce contexte. Ils aident à identifier des populations très divergentes, utilisables comme matériel de départ dans des croisements, pour générer plus de variabilité. L'étude de la diversité génétique chez la fétuque est compliquée par l'allogamie qui caractérise cette espèce et qui fait que des différences apparaissent aussi

bien à l'intérieur de la population qu'entre populations. C'est pour ces raisons que la diversité génétique chez de telles espèces est réalisée sur des mélanges (bulk) d'ADN provenant de plusieurs individus par population (Xu *et al.*, 1994).

Parmi les techniques d'évaluation de la variabilité génétique, l'AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) est une technique de marquage moléculaire permettant de révéler par PCR (*polymerase chain reaction*) des polymorphismes de restriction. Cette technique est très fiable et fournit beaucoup plus d'informations que la technique RAPD (*random amplification of polymorphic DNA*), puisqu'elle amplifie 10 fois plus de fragments. Le polymorphisme de longueur des fragments d'amplification est hautement reproductible, moins sensible aux conditions de la réaction et ne nécessite pas d'informations sur la séquence d'ADN (Krauss et Peakall, 1998 ; Vos *et al.*, 1995). Fjellheim et Rognli (2005) ont évalué 12 cultivars nordiques et une population islandaise naturelle de fétuque des prés (*Festuca pratensis* Huds.) par la technologie des marqueurs AFLP et ont trouvé des niveaux élevés de diversité génétique. Reeves *et al.* (1998) ont utilisé des profils d'ADN issus de la technique AFLP pour déterminer la relation entre la taille du génome et l'altitude du site d'origine des populations naturelles de dactyles. L'objectif de la présente étude est d'évaluer la diversité génétique et de caractériser sept variétés de

fétuque élevée, avec les marqueurs moléculaires AFLP.

Matériel et méthode

Matériel végétal

Les sept variétés de fétuque élevée (*Festuca arundinacea* Schreb.) qui ont fait l'objet d'analyse de la diversité génétique selon la technique AFLP sont indiquées au *tableau 1*. Ces variétés ont fait l'objet d'une étude agronomique approfondie au cours de la période 2005-2006 à 2008-2009, entrant dans le cadre du projet Permed¹ (Mefti *et al.*, 2008 ; Pecetti *et al.*, 2011). Les résultats montrent des différences significatives de comportement, de persistance et de production fourragère, suggérant des différences d'ordre génétique. Pour les besoins de l'analyse de la diversité génétique, des échantillons de la végétation des variétés mises en place sur le site expérimental de l'Institut technique des grandes cultures (ITCG) de Sétif ont été pris au cours de la campagne 2007-2008. Ces échantillons ont été analysés au laboratoire français de l'Institut national de la recherche agronomique (Inra) de

¹ Projet financé par l'Union européenne (UE), contrat N° INCO-CT-2004-509140 et intitulé : « *Improvement of native perennial forage plants for sustainability of Mediterranean farming systems* ».

Lusignan, au cours de la période allant du 1^{er} au 30 juin de l'année 2008.

Extraction et amplification de l'ADN

L'ADN génomique de 20 individus par génotype a été extrait et purifié à partir de 50 mg de matière fraîche foliaire, selon la méthode du Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) (Webb et Knapp, 1990). L'ADN extrait est testé (degré de contamination de l'ADN par les ARN et les protéines) par spectrophotométrie en contrôlant l'absorbance, respectivement à 260 nm et à 280 nm (Sambrook *et al.*, 1989). De même la quantité a été estimée visuellement sous rayons ultra-violet après migration sur gel d'agarose 0,8 % (w/v). Avant amplification, des bulks ont été constitués selon la méthode décrite par Mellish *et al.* (2002). Cinq bulks d'ADN de 4 individus ont été formés pour chaque variété, en utilisant 5 µL d'ADN par individu. L'ensemble a été dilué par 100 µL d'eau Gibco®. L'amplification est réalisée dans un volume réactionnel de 20 µL de milieu contenant 125 ng d'ADN, 0,2 mM de dNTP, 0,5 U de Taq polymérase. La réaction d'amplification est effectuée dans un thermocycleur de type MJ PTC-100, selon le protocole de Vos *et al.* (1995) comprenant les étapes suivantes. La réaction de digestion enzymatique a été réalisée dans un thermocycleur à 37 °C pendant 2 heures, où près de 125 ng d'ADN génomique ont été digérés par deux enzymes de restriction, *EcoRI* et *MseI* pendant deux heures à 37 °C. La ligation des adaptateurs a été effectuée dans un volume final de 24 µL, grâce à l'action du tampon T4 DNA ligase ligase (Invitrogen) à 20 °C pendant 2 heures, enfin le produit est dilué au dixième dans de l'eau Gibco.

La réaction de préamplification est effectuée dans un volume de 22 µL contenant les amorces de préamplification *EcoRI* + A et *MseI* + C, mM de dNTP, 5 U/µL de Taq polymérase (MP Biomedicals), ainsi que le tampon de PCR 10X (MP Biomedicals) contenant déjà du MgCl₂. L'opération s'est déroulée dans un thermocycleur (MJ PTC-100) selon le procédé suivant : dénaturation de l'ADN pendant 30 secondes à 94 °C, suivie d'une minute à

Tableau 2. Adaptateurs et amorces utilisés pour l'analyse AFLP.

Table 2. Adapters and primer combinations used for the AFLP analysis.

Adaptateurs/amorces	Séquences (5'-3')
Adaptateurs <i>EcoRI</i>	CTCGTAGACTGCGTACC AATTGGTACGCAGTCTAC
Adaptateurs <i>MseI</i>	GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT
Amorces sélectives E-AGG/M-CACG E-ACA/M-CTCG	GACTGCGTACCAATTCAGG/GATGAGTCCTGAGTAACACG GACTGCGTACCAATTCACA/GATGAGTCCTGAGTAACCTCG

AFLP : *amplified fragment length polymorphism*.

56 °C et d'une minute d'élongation à 72 °C. Une étape finale d'élongation est réalisée à 72 °C pendant 10 minutes. Ce cycle est répété 20 fois pour terminer avec une température finale de 10 °C. L'amplification sélective est précédée par le marquage de l'amorce *EcoRI* radioactivement par le pentaméthine carbocyanine (IRD 700) fluorescente à la longueur d'onde de 760 nm grâce

à l'action de la T4 Kinase. Il s'agit d'amplifier cette fois-ci 5 µL d'ADN digérés, ligaturés et préamplifiés qu'on a dilué 40 fois en utilisant deux couples d'amorces *EcoRI* + 3 et *MseI* + 4 (tableau 2). Les réactions de préamplification et d'amplification sélective s'effectuent grâce à l'action de la Taq DNA polymérase dans le thermocycleur. Pour cette amplification sélective

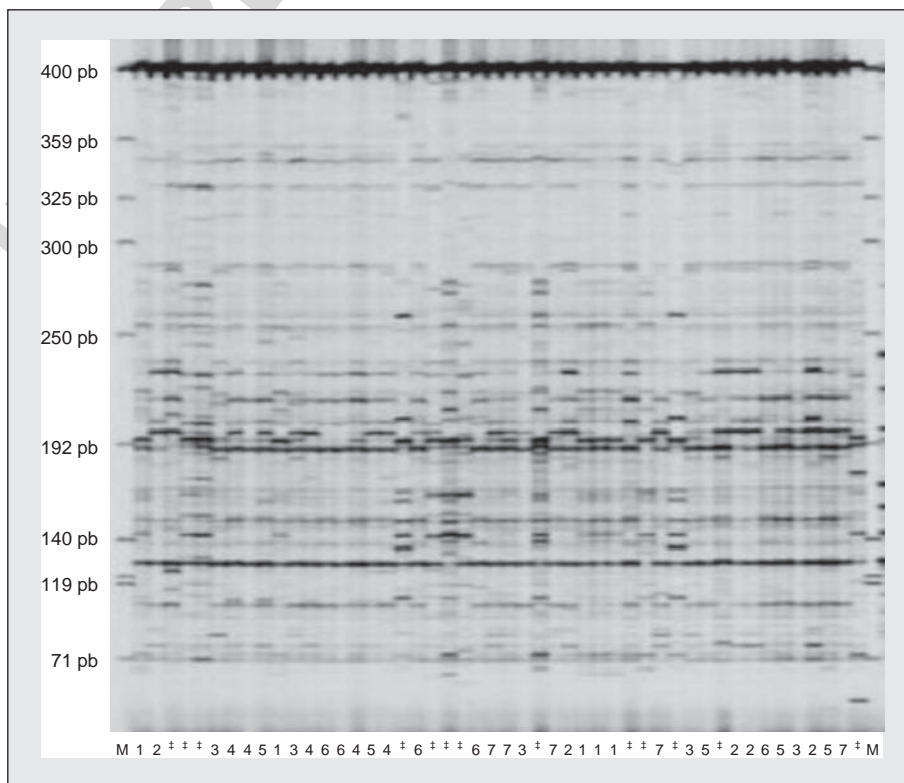


Figure 1. Profil AFLP des variétés de fétuque élevée obtenu par le couple d'amorces E-ACG/M-CACG.

Figure 1. AFLP profile of tall fescue varieties using the primer combination E-ACG/M-CACG. AFLP : *amplified fragment length polymorphism* ; pb : paire de base.

le programme comprend une première étape de 10 cycles divisée en une phase de dénaturation initiale de 4 minutes à 94 °C suivie d'un cycle d'une minute à 94 °C, puis une phase d'hybridation d'une minute à 65 et une phase d'élongation d'une minute et 30 secondes à 72 °C. La deuxième étape est en revanche composée de 23 cycles (une minute à 94 °C pour la dénaturation, 30 secondes à 56 °C pour l'hybridation des amorces, une minute à 72 °C pour l'élongation)

Le fractionnement des produits de l'amplification est réalisé par un séquenceur d'ADN LI-COR, 4 000 L. Trois microlitres d'ADN dilué à 100 % sont mélangés à volume égal avec le tampon de charge (98 % formamide, 10 mM EDTA, 0,25 % bleu de Bromophénol, 0,25 % xylène Cyanole) puis dénaturés pendant 5 minutes à 95 °C. Six microlitres de chaque échantillon sont déposés dans chaque puits du gel de polyacrylamide à 6,5 % (w/v) sous un courant de 40W pendant 4 heures et à une température de 47 °C. Les profils sont traités par le logiciel SAGA pour la visualisation des bandes AFLP.

Analyse des données

La diversité génétique est estimée à partir de la matrice de présence (1) absence (0) des bandes polymorphes. La similarité génétique entre génotypes a été calculée d'après le coefficient de Jaccard (GS_{ij}) :

$$GS_{ij} = N_{ij} / (N_i + N_j - N_{ij})$$

où N_i représente le nombre de bandes détectées sur le génotype i et pas sur le génotype j ; N_j représente le nombre de bandes détectées sur le génotype j et pas sur le génotype i , alors que N_{ij} est le nombre de bandes communes aux deux génotypes i et j .

Sur la base de la matrice de similitude un dendrogramme montrant les relations génétiques entre les variétés a été réalisé selon la méthode *Unweighted pair group method using arithmetic average* (UPGMA) attribuée à Sneath et Sokal (1973) en utilisant le logiciel PAST version 2.4 (Hammer *et al.*, 2001). L'analyse en coordonnées principales (ACoP) est réalisée avec le même logiciel Past dans le but de regrouper les variétés étudiées.

Résultats et discussion

Les deux couples d'amorces AFLP utilisées pour analyser la distance génétique entre les différentes variétés par la méthode du bulk ont permis d'obtenir des profils d'amplification avec une bonne résolution des bandes et un niveau de variabilité des produits d'amplification assez important. Un total de 105 fragments dont la taille varie de 71 à 388 paires de bases (pb) a été obtenu ; avec 55 bandes générées par le premier couple d'amorces E-ACG/M-CACG et 50 bandes par le deuxième couple d'amorces E-ACA/M-CTCG (*figures 1 et 2*). Soixante-six fragments sont polymorphes, soit 62,85 % du nombre total des bandes observées. À ce sujet, Roldan-Ruiz *et al.* (2000) rapportent avoir trouvé 83 % de fragments AFLP polymorphes, chez le ray-grass. Ces auteurs qualifient ce taux d'élevé. Bolaric *et al.* (2005) rappor-

tent, eux aussi, un degré de polymorphisme des marqueurs RAPD de 88 % chez le ray-grass anglais. Un taux de polymorphisme similaire, de 85,4 %, est rapporté par Majidi *et al.* (2006), chez la fétuque élevée, avec une moyenne de 10 à 75 bandes polymorphes engendrées par couple d'amorce. Dans ce contexte, Paglia et Morgante (1998) rapportent une moyenne de 12,6 fragments polymorphes par couple d'amorce. Selon Mian *et al.*, 2002, l'amplification sélective avec le couple d'amorce *EcoRI* + 3 et *MseI* + 3 produit un nombre élevé de fragments (plus de 200) à séparer sur gel de polyacrylamide ; en revanche, la combinaison d'amorce *EcoRI* + 3 et *MseI* + 4 produit un nombre de fragments plus pratique allant de 80 à 100.

L'analyse des coefficients des similarités génétiques (GS_{ij}) des marqueurs AFLP basées sur l'indice de Jaccard et du dendrogramme UPGMA montre des valeurs variant entre 0,35 et 0,8, avec une moyenne de 0,54 suggérant une assez grande variabilité

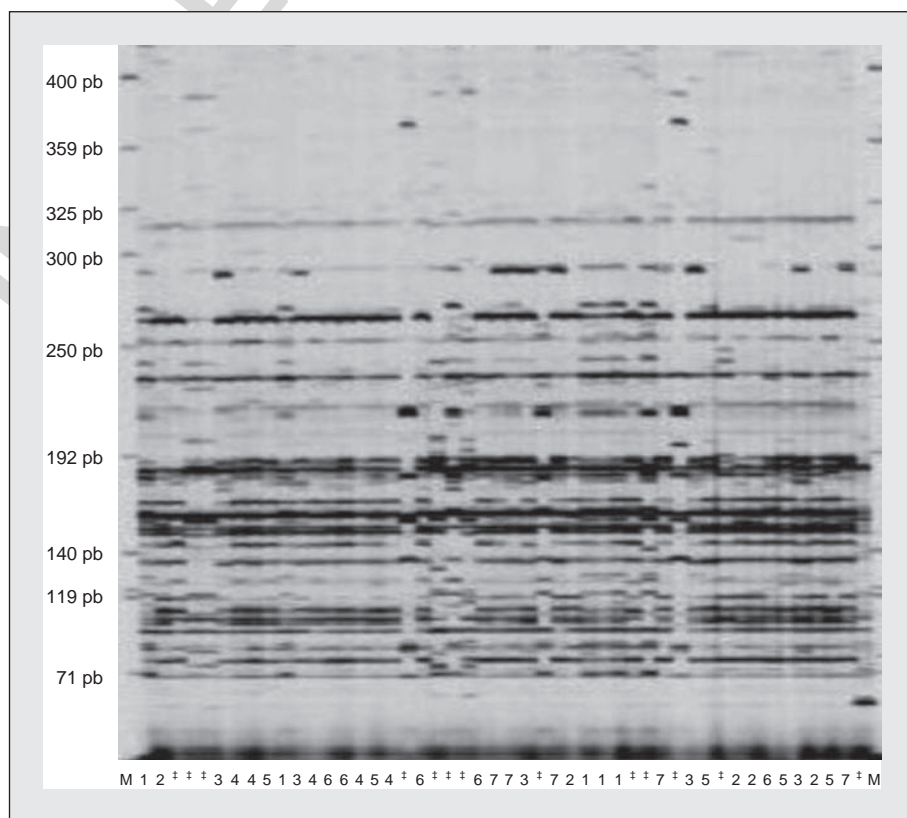


Figure 2. Profil AFLP des variétés de fétuque élevée obtenu par le couple d'amorces E-ACA/M-CTCG.

Figure 2. AFLP profile of tall fescue varieties using the primer combination E-ACA/M-CTCG. AFLP : amplified fragment length polymorphism ; pb : paire de base.

Tableau 3. Distances génétiques entre les différentes variétés de fétuque basées sur l'indice de Jaccard.

Table 3. Genetic distance between tall fescue varieties based on Jaccard's index.

Génotype	Lutine	Fraydo	Tanit	Flecha	E-542	Centurion	Sisa
Lutine	1						
Fraydo	0,351	1					
Tanit	0,454	0,547	1				
Flecha	0,451	0,648	0,609	1			
E-542	0,425	0,589	0,568	0,800	1		
Centurion	0,442	0,621	0,595	0,648	0,641	1	
Sisa	0,462	0,641	0,731	0,625	0,581	0,534	1

intervariétale, et un coefficient de corrélation cophénétique $r = 0,95$ (tableau 3, figure 3). À ce sujet, Powell *et al.* (1996) et Lübberstedt *et al.* (2000) ont également obtenu des coefficients de similarités élevés pour les AFLP par rapport à d'autres marqueurs. La variété australienne Fraydo et la variété française Lutine présentent la plus grande divergence génétique ($GSJ = 0,35$). Fraydo apparaît génétiquement proche des variétés française Centurion et sud-américaine Flecha. Quant aux variétés européennes Tanit et Sisa, elles présentent une grande similitude génétique ($GSJ = 0,73$) et forment un groupe, lui-même très distant génétiquement de la variété française Lutine, et assez éloigné de la variété Centurion bien que ces deux dernières variétés soient des obtentions du même institut (Institut national de la recherche agronomique [Inra], France) (figure 3).

Les deux premiers axes de l'analyse en coordonnées principales (ACoP) expliquent 65,0 % de la variation totale disponible dans la matrice soumise à l'analyse, avec respectivement 41,2 % pour le premier axe et 23,9 % pour le second (figure 4). Les résultats de l'ACoP confirment ceux du dendrogramme UPGMA. L'axe 1 discrimine nettement entre Fraydo et Lutine, alors que l'axe 2 oppose le groupe formé par Flecha, Flecha endophyté (E-542) et Centurion à celui formé par Tanit et Sisa (figure 4).

Ces divergences entre accessions semblent avoir pour cause les origines

géographiques. En effet, Sharma *et al.* (2000) pour le genre *Morus*, Vergara et Bughara (2003) pour le genre *Agrostis* rapportent des corrélations positives entre les distances des marqueurs moléculaires de type AFLP et les coordonnées de l'origine géographique. En revanche, Cresswell *et al.* (2001) ainsi que Bolaric *et al.* (2005) pour le genre *Lolium* n'ont pas observé de liaisons significatives entre la distance géographique et les marqueurs moléculaires AFLP étudiés.

La méthode d'ADN bulk a été déjà utilisée par Mian *et al.* (2002) pour faire la distinction entre 18 populations de fétuque élevée. Yu et Pauls (1993) Sweeny et Danneberger (1997) et Warburton *et al.* (2000) ont aussi évalué la diversité génétique fondée sur des marqueurs moléculaires entre des populations respectives de *Medicago sativa*, de ray-grass anglais et de maïs à travers des échantillons d'ADN en bulk. Cette stratégie est appliquée pour évaluer la diversité

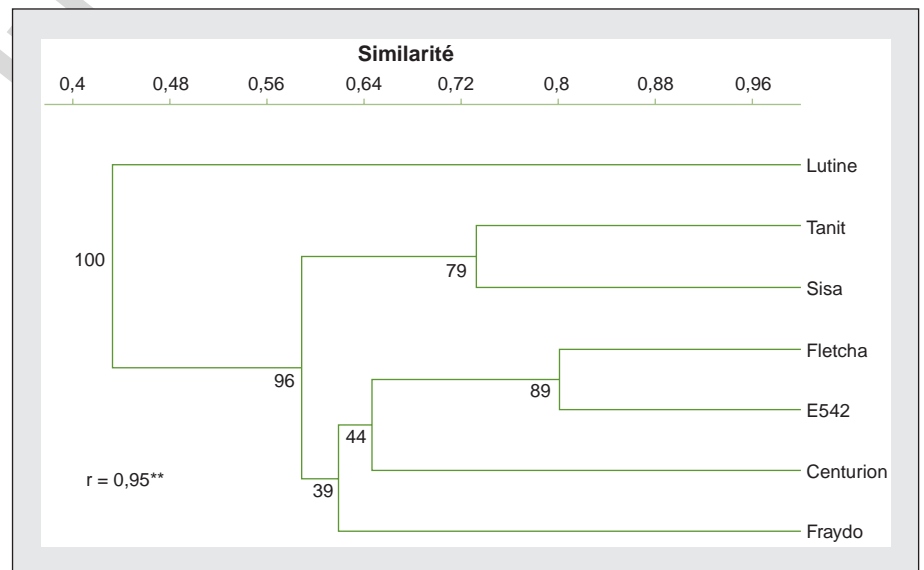


Figure 3. Dendrogramme des marqueurs AFLP fondé sur l'indice de similarité de Jaccard pour les variétés de fétuque élevée.

Figure 3. UPGMA dendrogram of tall fescue varieties based on AFLP markers, using Jaccard's genetic similarity index.

AFLP : amplified fragment length polymorphism.

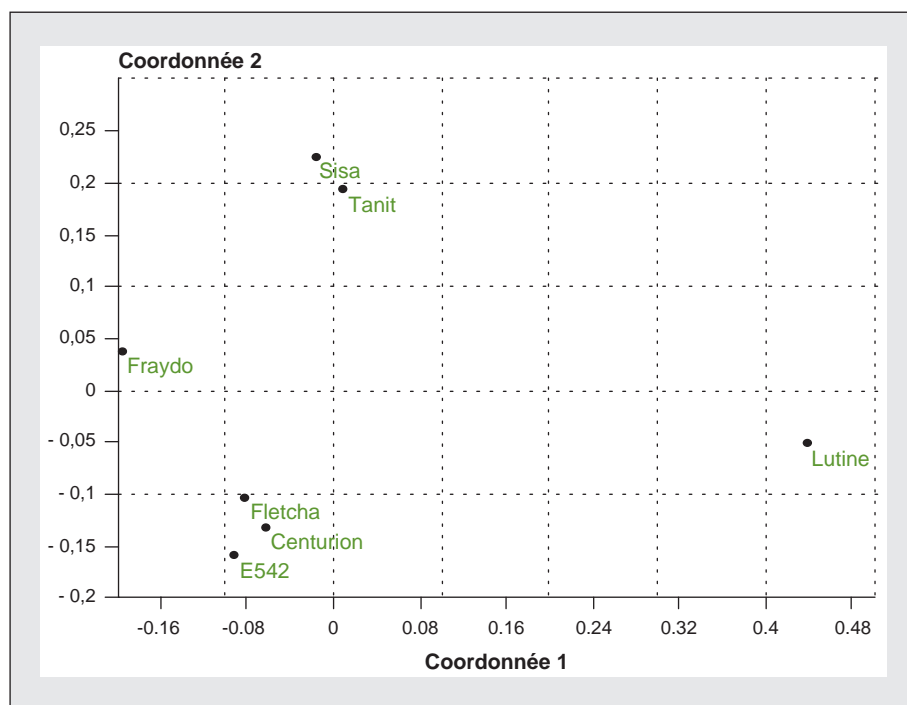


Figure 4. Analyse en coordonnées principales des données de l'AFLP des variétés de fétuque élevée fondée sur l'indice de similarité de Jaccard.

Figure 4. Biplot of principle component analysis based on AFLP markers of tall fescue varieties, using Jaccard's genetic similarity index.

AFLP : amplified fragment length polymorphism.

des populations d'espèces allogames (Mian *et al.*, 2002). L'utilisation des marqueurs AFLP constitue un outil précieux pour l'identification des variétés commercialisées comme le mentionnent Roldan-Ruiz *et al.* (2000).

Conclusion

Les résultats obtenus mettent en exergue la différenciation des différentes variétés étudiées, issues de diverses origines. Elles confirment aussi, dans ce cadre-là, le grand intérêt des marqueurs moléculaires, en particulier de type AFLP, dans l'analyse de la diversité génétique et de l'identification variétale. En effet, cette technique a permis une bonne discrimination et un regroupement des accessions étudiées. L'utilisation de ces accessions relativement diversifiées dans un programme d'amélioration permettra certainement d'accélérer le processus d'amélioration variétale. Enfin, l'utilisation de cette technologie sur un large éventail de populations de fétuques algériennes

présente un intérêt certain dans l'orientation ultérieure des prospections et collectes du matériel génétique local, également dans le but d'accélérer le processus de son amélioration génétique. ■

Remerciements

Nos remerciements s'adressent au ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche scientifique ainsi qu'aux responsables du Laboratoire de biologie moléculaire de l'Unité de recherche pluridisciplinaire « Prairies et plantes fourragères » de l'Inra de Lusignan. Nous tenons à remercier en particulier le Dr Philippe Barre pour son accueil et ses orientations, la Dr Sandrine Flojot pour ses orientations ainsi que M^{me} Françoise Durand pour son assistance technique.

Références

Bolaric S, Barth S, Melchinger AE, Posselt UK, 2005. Molecular genetic diversity within and among German ecotypes in comparison to European perennial ryegrass cultivars. *Plant Breeding* 24 : 257-62.

Bouton JH, Latch GCM, Hill NS, Hoveland CS, McCann MA, Watson RH, *et al.*, 2002. Reinfection of tall fescue cultivars with non-ergot alkaloid-producing endophytes. *Agronomy Journal* 94 : 567-74.

Cresswell A, Hamilton NRS, Roy AK, Viegas MF, 2001. Use of amplified fragment length polymorphism markers to assess genetic diversity of *Lolium* species from Portugal. *Molecular Ecology* 10 : 229-41.

Fjellheim S, Rognli OA. Genetic diversity within and among Nordic meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.), 2005. Cultivars Determined on the Basis of AFLP Markers. *Crop Science* 45 : 2081-6.

Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD, 2001. PAST. Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 9 p. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm

Krauss S, Peakall R, 1998. An evaluation of the AFLP fingerprinting technique for the analysis of paternity in natural population of *Persoonia mollis* (Proteaceae). *Australian Journal of Botany* 46 : 533-46.

Lelièvre F, Satger S, Volaire F, 2008. Water use efficiency in a mild season and water cost of summer survival of perennial forage grasses in Mediterranean areas. *Options Méditerranéennes, Ser A* (79) : 259-63.

Lübberstedt TH, Melchinger AE, Dussle D, Vuylsteke M, Kuiper M, 2000. Relationships among early European maize inbreds: IV. Genetic diversity revealed with AFLP markers and comparison with RFLP, RAPD and pedigree data. *Crop Science* 40 : 783-91.

Majidi MM, Mirlohi AF, Sayed-Tabatabaei BE, 2006. AFLP Analyses of genetic variation in Iranian fescue accessions. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9 : 1869-76.

Malinowski DP, Zuo H, Kramp BA, Muir JP, Pinchak WE, 2005. Obligatory Summer-Dormant Cool-Season Perennial Grasses for Semiarid Environments of the Southern Great Plains. *Agronomy Journal* 97 : 147-54.

Mellish A, Coulman B, Fernandez Y, 2002. Genetic Relationships among Selected Crested Wheatgrass Cultivars and Species determined on the Basis of AFLP Markers. *Crop Science* 42 : 1662-8.

Mefti M, Bouzerzour H, Abdelguerfi A, Nouar H, 2008. Morphological and Growth characteristics of Perennial Grass cultivars Grown under Semi-Arid conditions of the Algerian High Plateaus. *Journal of Agronomy* 7 : 38-47.

Mian AR, Hopkins AA, Zwonitzer JC, 2002. Determination of genetic diversity in tall fescue with AFLP markers. *Crop Science* 42 : 944-50.

Paglia G, Morgante M, 1998. PCR-based multiplex DNA fingerprinting techniques for the analysis of conifer genomes. *Molecular Breeding* 4 : 173-7.

Pecetti L, Annicchiarico P, Abdelguerfi A, Kallida R, Mefti M, Porqueddu C, *et al.*, 2011. Response of Mediterranean Tall Fescue Cultivars to Contrasting Agricultural Environments and Implications for Selection. *Journal of Agronomy and Crop Science* 197 : 12-20.

Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A, 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2 : 225-38.

- Reed KMM, Lee CK, Jahufer MZZ, Anderson MW, 2004. Fraydo tall fescue (*Festuca arundinacea* L.). *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44: 955-7.
- Reeves G, Francis D, Davis MS, RogersHJ, Hodgkinson TR, 1998. Genome size is negatively correlated with altitude in natural populations of *Dactylis glomerata*. *Annals of Botany* 82 : 99-105.
- Roldan-Ruiz I, Dendauw J, Van Bockstaele E, Depicker A, De Loose M, 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding* 6 : 125-34.
- Saha MC, Mian R, Zwonitzer JC, Chekhovskiy K, Hopkins AA, 2005. An SSR and AFLP based genetic linkage map of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Theoretical Applied Genetics* 110 : 323-36.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular cloning : A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY) : Harbor Laboratory.
- Sharma A, Sharma R, Machii H, 2000. Assesment of genetic diversity in a *Morus* germplasm collection using fluorescens-based AFLP markers. *Theoretical Applied Genetics* 101 : 1049-55.
- Sleper DA, 1985. Breeding tall fescue. *Plant Breeding Reviews* 3 : 313-42.
- Soreng RJ, Davis JI, 1998. Phylogenetics and character evolution in the grass family (Poaceae) : simultaneous analysis of morphological and chloroplast DNA restriction site character sets. *Botanical Review* 64 : 1-85.
- Sweeny PM, Danneberger TK, 1997. RAPD markers from perennial ryegrass DNA extracted from seeds. *Horticultural Science* 32 : 1212-5.
- Turgen AJ, 1985. *Turf grass managements*. Reston (Virginia) : Reston publishing company.
- Vergara GV, Bughara SS, 2003. AFLP analyses of genetic diversity in bentgrass. *Crop Science* 43 : 2162-71.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee T, Hornes M, *et al.*, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* 23 : 4407-14.
- Wang Z, Hopkins A, Main R, 2001. Forage and turfgrass biotechnology. *Critical Reviews in Plant Sciences* 20 : 573-619.
- Warburton ML, Hoisington DA, Xia XC, Charcosset A, 2000. Fingerprinting maize populations using a bulking strategy. In : *2000 Annual Meeting Abstracts*. Madison (Wisconsin) : ASA; CSSA; SSSA.
- Webb DM, Knapp SJ, 1990. DNA extraction from a previously recalcitrant plant genus. *Plant Molecular Biology Reporter* 8 : 180-5.
- Xu WW, Sleper DA, Hoisington DA, 1991. A survey of restriction fragment length polymorphisms in tall fescue and itsrelatives. *Genome* 34 : 686-92.
- Xu WW, Sleper DA, Krause GF, 1994. Genetic diversity of tall fescue germplasm based on RFLPs. *Crop Science* 34 : 246-52.
- Yu K, Pauls KP, 1993. Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous populations of alfalfa by random amplification of genomic DNA samples. *Theoretical Applied Genetics* 86 : 788-94.

IN PRESS