

JNOrge : De nouvelles résistances/tolérances contre la jaunisse nanisante chez l'orge : caractérisation et impacts épidémiologiques

Emmanuel JACQUOT¹, Isabelle ABT¹, Vincent PLAT¹, Adeline PINAULT¹, Marlène SOUQUET¹,
Isabelle CHAILLET², Nathalie ROBIN², Romain VALADE², Cindy VITRY², Thomas BALDWIN³,
Louis-Marin BOSSUET³, Valérie CADOT³, Valérie LAURENT⁴, Lieven DEVLIES⁵, Amélie GENTY^{6*}

1 - PHIM, INRAE, CIRAD, Institut Agro, Univ Montpellier, Cirad TA A-54/K, Campus international de Baillarguet, 34398, Montpellier, PARIS

2 - ARVALIS Institut du végétal, 3 rue Joseph et Marie Hackin, 75016 Paris

3 - GEVES, 25 rue Georges Morel, CS 90024, 49071 Beaucauze Cedex

4 - Florimond Desprez Veuve et Fils, BP 41, 59242 Cappelle en Pévèle

5 - Limagrain Europe, CS 50005 St Beuzire, 63360 Gerzat

6 - SECOBRA Recherches, Centre de Bois-Henry, 78580 Maule

*Coordinateur : Amélie GENTY, amelie.genty@secobra.com

1 Introduction

La jaunisse nanisante de l'orge (JNO) est une maladie virale majeure pour la culture des céréales et principalement des orges d'hiver.

Décrite pour la première fois en 1951 en Californie (D'Arcy and Burnett, 1995), cette maladie peut être causée par différentes espèces virales qui sont elles-mêmes transmises par différentes espèces de pucerons, la plus fréquente étant *Rhopalosiphum Padi*.

Les pertes de rendement liées à la JNO peuvent être conséquentes en allant jusqu'à 80 % de la récolte.

Jusqu'en 2018, la très grande majorité des semences d'orges d'hiver semées en France étaient traitées avec un insecticide de la famille des néonicotinoïdes, ce qui permettait de protéger la plante pendant plusieurs semaines après les semis.

Les conditions hivernales n'étant ensuite plus propices au développement des pucerons, la maladie était très peu présente sur nos 1.3 millions d'ha d'orges d'hiver.

L'arrêt de l'utilisation des néonicotinoïdes en 2018 en traitement de semences a remis cette maladie sur le devant de la scène.

Les agriculteurs, pour limiter les risques de contaminations, ont pu adapter leurs itinéraires techniques, par exemple en retardant la date de semis. Néanmoins, cela n'étant pas suffisant dans la quasi-totalité des cas, ils doivent intervenir par des traitements insecticides en cours de végétation. En effet, les automnes doux permettent aux pucerons de se développer pendant une période beaucoup plus longue, voire même jusqu'au début de l'hiver.

Les enjeux écologiques actuels étant de réduire au maximum l'utilisation des produits phytosanitaires, les chercheurs et les sélectionneurs se sont efforcés de rechercher des solutions génétiques pour lutter contre la JNO.

Une très grande diversité de matériel génétique, d'origines géographiques variées, a donc été testée par les sélectionneurs pour rechercher des résistances/tolérances à cette maladie.

La résistance se caractérise par la capacité de la plante à limiter l'infection alors que la tolérance se caractérise par la capacité de la plante à limiter les effets de l'infection. La résistance peut être totale si elle conduit à absence de charge virale dans la plante ou partielle si elle permet seulement de réduire cette charge virale.

Quatre gènes ont pu être identifiés : *Ryd1* (Suneson, 1955), *Ryd2* (Schaller, 1963, Schaller et Chim, 1969), *Ryd3* (Niks et al., 2004) et beaucoup plus récemment *Ryd4* (Scholz et al., 2009).

Ryd1 a rapidement été abandonné car son niveau de tolérance/résistance n'était pas suffisant. Les efforts des sélectionneurs se sont alors concentrés sur *Ryd2*. Ainsi, la quasi-totalité des variétés actuelles tolérantes à la JNO sont porteuses de *Ryd2*.

Dans un souci de durabilité de cette tolérance / résistance, des travaux ont été menés pour introgresser le gène *Ryd3*, mais aussi pour pyramider *Ryd2* et *Ryd3*. La découverte de *Ryd4* étant plus récente, les travaux d'introgression sont toujours en cours et aucune lignée d'intérêt n'est encore disponible.

Très peu d'études ayant été réalisées pour caractériser ces gènes, le projet JNOrge a été mis en place afin de mieux caractériser les efficacités et les spécificités des gènes *Ryd2*, *Ryd3* et du pyramidage de *Ryd2* et *Ryd3* face à la JNO.

La caractérisation des génotypes étudiés a été réalisée dans deux conditions : au champ face à des infestations naturelles, et en laboratoire sur plantules avec des inoculations contrôlées par application de pucerons porteurs de l'espèce virale BYDV-PAV de la JNO.

2 Matériel et méthode

Différents génotypes d'orge d'hiver, 6 rangs ou 2 rangs, contenant les gènes *Ryd2* et/ou *Ryd3*, caractérisés en marquage par les sélectionneurs qui les ont proposés, ont été évalués lors de cette étude, au champ et/ou en conditions contrôlées, en comparaison à 3 références (Tableau Ch1).



	Genotypes	nb tangs	Champ 2017	Champ 2018	Champ 2019	Laboratoire
Ref.	ETINCEL	6	x	x	x	x
Ref.	KWS Cassia	2	x	x	x	x
Ryd2 Ref.	AMISTAR	6	x	x	x	x
Ryd2	FD1601	6	x	x	x	x
Ryd2	FD1602	6	x	x	x	x
Ryd2	RAFAELA	6	x	x	x	x
Ryd2	SC1601	6	x	x	x	x
Ryd2	W983	6	x	x	x	x
Ryd2	SC1602	2	x	x	x	x
Ryd3	D14497-26	6	(x)		x	x
Ryd3	D14497-7	6	(x)			x
Ryd3	FD1603	2			x	
Ryd3	FD1604	2	(x)	(x)	x	
Ryd3	SC1603	2	(x)	(x)	x	x
Ryd3	SC1604	2			x	x
Ryd2+Ryd3	W115019	6		(x)	(x)	x
Ryd2+Ryd3	D14498	6		(x)	(x)	x
Ryd2+Ryd3	SC1605	2			(x)	
Ryd2+Ryd3	VAR 6					x

x : génotype étudié, volet champ : sur les différents sites
(x) : génotype étudié, volet champ : absent sur un des sites.

Tableau Ch1 : Caractéristiques des génotypes étudiés et répartition dans les différentes actions.

► Volet CHAMP

Des essais ont été mis en place au champ (Fig. Ch1) pour évaluer les génotypes lors de 3 années. Les essais ont été semés volontairement à une date précoce, 2 à 3 semaines avant la date recommandée en parcelles agricoles, afin de favoriser les infestations naturelles par des pucerons vecteurs de la JNO. Tous les génotypes d'un même essai ont été semés à la même densité.

En année 1, du fait d'une faible quantité de semences disponibles, 5 essais ont été implantés avec des microparcelles de type pépinière sur 1 seule répétition dans 4 essais, et 3 répétitions dans le cinquième essai. Ces essais ont été conduits sans protection insecticide vis-à-vis des pucerons vecteurs de la JNO pour des observations et analyses de l'état sanitaire des plantes.

En années 2 et 3, six essais par an ont été semés en microparcelles permettant une mesure du rendement, avec ou sans protection contre la JNO. Le dispositif retenu est un dispositif factoriel en bloc, avec 2 à 3 répétitions selon les sites, qui croise le facteur protection insecticide (2 modalités : avec ou sans) au facteur génotype (les génotypes étudiés et 3 variétés de référence). La protection insecticide a été appliquée sur semences (imidaclopride) en année 2, et en végétation (pyréthrinoides) en année 3 pour s'adapter à l'évolution de la réglementation qui venait d'interdire l'utilisation des néonicotinoïdes en traitement de semences.

Les contrôles ont porté sur l'état sanitaire des plantes (observations et analyses), le rendement et des caractéristiques des grains récoltés : taux de protéines (en % MS), PMG (Poids de 1000 grains), PS (Poids Spécifique) et calibrage (% > 2.5 mm).

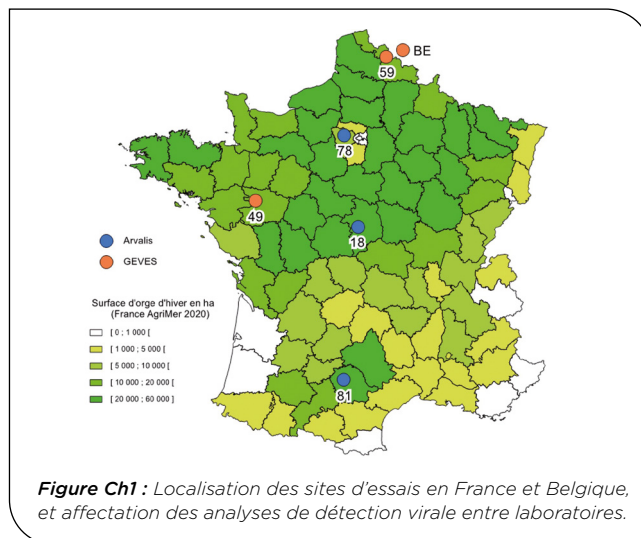


Figure Ch1 : Localisation des sites d'essais en France et Belgique, et affectation des analyses de détection virale entre laboratoires.

Analyses sanitaires

Pour chaque type génétique présent au champ, de 2017 à 2019 (Tableau Ch1), 175 feuilles ont été prélevées au moment de la reprise de la végétation. Cinq lots de 15 feuilles ont été analysés par site et par génotype et répartis entre deux laboratoires (GEVES et Arvalis) qui ont analysé chacun 3 sites (sites 81, 78 et 18 pour le laboratoire d'Arvalis, sites 49, 59 et site de Tiegem (Belgique) pour le laboratoire du GEVES).

Les lots de 15 feuilles ont été soumis à l'extraction d'ARN et ensuite les amorces de Deb *et al.* (2008) ont été utilisées pour rechercher la présence de différentes espèces virales de la JNO (PAV, MAV, SGV, RPV et - pour certains échantillons - RMV) dans les extraits d'ARN par RT-PCR point final et gel électrophorèse.

Des échantillons, hors essais variétaux, ont également été prélevés dans différentes localisations sur la variété d'orge d'hiver sensible Etincel à la fin de l'automne et à la reprise de végétation, suite à un appel à prélèvement lancés auprès des interlocuteurs des différents acteurs du projet. Cette action avait vocation à compléter les informations sur la prévalence des espèces virales de la JNO en France et leur répartition.

► Volet LABORATOIRE

Plantes, insectes et virus

Treize génotypes d'orge, fournis par les 3 obtenteurs membres du projet, porteurs du gène *Ryd2* (SC1601, SC1602, Rafaela, W983, FD1601 et FD1602), du gène *Ryd3* (SC1603, SC1604, D14497-7 et D14497-26) ou des gènes *Ryd2* et *Ryd3* (D14498, VAR6 et W115019) ont été utilisés pour évaluer le niveau de sensibilité/résistance de ce matériel à la jaunisse nanisante de l'orge. Trois variétés de référence (Amistar (*Ryd2*), KWS Cassia et Etincel) ont été ajoutées à cette gamme de génotypes.

Le clone *Rhopalosiphum padi* RplA (collecté dans le département de l'Yonne en 2012) a été utilisé pour réaliser les transmissions virales. Un élevage de RplA est maintenu en chambre de culture (jour/nuit : 16h/8h, 25°C/20°C, RH : 40 %) dans une mini-cage en plexiglass en présence de plantes saines d'orge cv. Etincel.

L'isolat PAV4 du virus de la jaunisse nanisante de l'orge (BYDV-PAV4 ; Chain *et al.*, 2007), utilisé dans les

expériences, a été maintenu sur orge (cv. Etincel) en présence de pucerons (RpIA).

Production du matériel végétal pour les expérimentations

L'orge a été semé sur substrat neutre (vermiculite) dans des tubes en plastique (2 cm de diamètre et 8 cm de long). Après semis, les plantes ont été maintenues en chambre de culture (24°C/20°C, jour/nuit : 16h/8h) pendant au moins 8 jours avant d'être utilisées dans les expérimentations.

Evaluation du taux d'infection

Des plantes âgées de 8 jours (stade 2 feuilles) ont été utilisées pour évaluer la sensibilité des différents génotypes d'orge à la JNO. A l'aide d'un pinceau, 2 pucerons virulifères de stade L2/L4 ont été déposés sur l'extrémité d'une feuille de chacune des plantes du dispositif. L'extrémité de la feuille et le puceron ont été insérés dans un système de confinement (micro-tube en plastique) fermé par la pose d'un morceau de coton à l'extrémité du tube. A la fin de la période d'inoculation (IAP= 2h), les pucerons virulifères ont été retirés manuellement, les plantes ont été traitées à l'aide d'un insecticide (Pirimor® 0.1 % v/v, Syngenta®, Bâle, Suisse) et transférées en chambre de culture pour une période de 3 semaines. A la fin de cette période, les plantes ont été échantillonnées et leur statut sanitaire évalué par diagnostic sérologique (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA)). L'ensemble du dispositif expérimental a été répliqué au moins 4 fois en utilisant des lots de 9 à 20 plantes par génotype et par répétition (Table 1).

Dynamique d'accumulation virale

Après avoir inoculé (5 pucerons/plante, IAP=24h) 40 plantes des génotypes SC1601, D14497-26, W115019, Rafaela, SC1604, FD1601, D14498 et W983, et 160 plantes du génotype de référence cv. Etincel, les plantes inoculées sont placées en serre sous confinement insect-proof. Dix plantes de chaque génotype à tester et 10 plantes du génotype de référence ont été aléatoirement prélevées au 7^{ème}, 10^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jour après inoculation. Les parties aériennes (feuilles) de ces plantes ont été prélevées et broyées. Le jus brut produit par chaque plante a été analysé individuellement par test ELISA de manière à définir le statut sanitaire de chaque plante du dispositif expérimental. Trois répétitions indépendantes du dispositif ont été réalisées.

Impact de l'âge de la plante

Pour les génotypes Etincel, SC1601, D14497-26, W115019, Rafaela, SC1604, FD1601, D14498 et W983, des lots de 15 plantes âgées de 10, 24 et 38 jours ont été inoculées (2 pucerons/plante, IAP=4h40) Après retrait des vecteurs en fin de période IAP, les plantes ont été maintenues en serre pendant 21 jours. Les parties aériennes des plantes ont été prélevées et broyées. Le jus brut produit par chaque plante a été analysé par test ELISA. Quatre répétitions indépendantes du dispositif ont été réalisées.

Estimation de la durée de latence

Des plantes (n = 40 par génotype) d'orge (Etincel, SC1601, D14497-26, W115019, Rafaela, SC1604, FD1601, D14498 et W983) âgées de 8 jours ont été inoculées (5 pucerons/plante, IAP = 72h). A la fin de cette période d'inoculation, les pucerons ont été retirés manuellement. A 4 dates après inoculation (7, 14, 21 et 28 jours), des pucerons RpIA sains de stade L₁/L₄

ont été confinés pendant 48h (période d'acquisition = AAP) sous des sachets en plastique sur 5 plantes précédemment inoculées. Ces plantes ont été qualifiées de plantes 'sources' pour le dispositif expérimental. A la fin de l'AAP, les pucerons issus de chacune de ces plantes 'sources' ont été transférés sur 10 plantes d'orge cv. Etincel saines âgées de 8 jours (2 pucerons/plante). Ces plantes ont été qualifiées de plantes 'tests' pour le dispositif expérimental. Les plantes 'tests' ont été confinées en présence des pucerons vecteurs sous des sachets en plastique pour une IAP de 96h avant d'être traitées au Pirimor® (0,1 % v/v). L'ensemble des plantes 'tests' et les plantes 'sources' a été maintenu en chambre de culture pendant 3 semaines après inoculation. Puis leur statut sanitaire a été testé par ELISA.

Caractérisation du statut sanitaire des échantillons

Les plantes (ensemble des feuilles d'une plantule d'orge) échantillonnées pour la réalisation de diagnostics ELISA (Clark et Adams, 1977) ont été broyées individuellement à l'aide d'une presse Pöhlhane (MEKU®, Wennigsen, Allemagne). Ce broyage a été réalisé en présence de 400 µL de tampon de broyage (PBST (137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 12H₂O, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,05 % (v/v) Tween 20), 2 % (w/v) polyvinylpyrrolidone 40T). Pour le test ELISA, les puits d'une plaque de microtitration (NUNC, Maxisorp) ont été incubés à 37°C pendant 3h présence d'anticorps polyclonaux anti-BYDV (PAV52, H. Lapiere, INRAE) préalablement dilués (1/1000 (v/v)) dans du tampon carbonate (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH = 9,6). Entre chaque étape, les plaques ont été lavées 3 fois avec du tampon PBST. Cent µl de jus brut ont été déposés dans les puits et incubés une nuit à 4°C. Un anticorps couplé à la phosphatase alcaline dilué (1/1000 (v/v)) dans du tampon conjugué (tampon PBST, 2 % (w/v) d'ovalbumine) a été déposé et incubé 3h à 37°C. Après un dernier lavage, 100 µL de diéthanolamine (1N, pH = 9,8) contenant du p-nitrophenylphosphate (1 mg/mL) ont été déposés dans les puits de la plaque. Après incubation à température ambiante et à l'obscurité pendant 2h, les densités optiques ont été mesurées à 405 nm (DO₄₀₅) à l'aide d'un spectrophotomètre (Multiskan™ FC ; Thermo Scientific™). Le seuil de positivité du test a été fixé à deux fois la valeur de DO₄₀₅ des témoins sains avec une valeur minimale de DO₄₀₅ = 0,1. Des gammes de dilution en série ont été réalisées à partir d'une fraction enrichie en BYDV-PAV4. Les fractions diluées obtenues ont été utilisées lors des analyses sérologiques, conjointement aux échantillons à tester, de manière à pouvoir comparer les charges virales des échantillons. A partir des valeurs de densité optique (DO_{405nm}) obtenues, le taux de plantes infectées et la charge virale des plantes infectées peuvent être calculés pour chaque génotype et à chacune des modalités appliquées (e.g. cinétique d'accumulation et âge de la plante à l'inoculation). Les données ainsi générées peuvent être utilisées pour calculer les AUPPC (aires sous la courbe de progression de l'agent pathogène) pour les cinétiques d'infection.

Analyses statistiques

Les données brutes ont été analysées à l'aide du logiciel R (R Core Team, 2020) via des tests de Kruskal-Wallis (charge virale) et des modèles linéaires généralisés (taux d'infection et fitness des pucerons).

3 Résultats de caractérisation des géotypes au champ

Analyses sanitaires des plantes au champ

Les analyses réalisées sur les échantillons prélevés dans les essais au champ ont permis d'établir la prévalence des différentes espèces virales en fonction des sites et des années (tableau Ch2). Les résultats RT-PCR sur les lots de feuilles, qui sont qualitatifs (présence/absence), n'ont pas permis d'identifier des différences significatives entre les géotypes. On peut constater la présence majoritaire des espèces virales BYDV-PAV et BYDV-MAV dans les échantillons de tous les sites, et de façon répétée pendant les 3 années du projet. Ces données ont montré également la présence de BYDV-SGV - ainsi que celle de RMV dans les prélèvements où il a été recherché - et celle de BYDV-RPV. Le projet a également permis de démontrer, par des analyses bioinformatiques et des expérimentations, que les amorces « MAV » utilisées (Deb *et al*, 2008) n'étaient pas complètement spécifiques. Ainsi, la fréquence de BYDV-MAV est probablement surestimée, en lien avec un manque de spécificité des amorces MAV vis-à-vis du PAV.

		78	18	81	49	59	BE
2017	PAV	96%	33%	85%	ND	53%	90%
	MAV	98%	100%	100%	ND	81%	98%
	RPV	0%	4%	6%	ND	0%	2%
	RMV	15%	28%	28%	ND	ND	ND
	SGV	20%	27%	75%	ND	ND	ND
2018	PAV	85%	83%	62%	55%	96%	72%
	MAV	98%	100%	98%	83%	100%	86%
	RPV	2%	3%	5%	55%	96%	3%
	SGV	69%	66%	74%	57%	56%	38%
2019	PAV	78%	ND	41%	ND	47%	59%
	MAV	100%	ND	92%	ND	77%	88%
	RPV	4%	ND	0%	ND	9%	33%
	SGV	33%	ND	86%	ND	30%	68%

Tableau Ch2 : Fréquence de détection d'espèces virales, par année et site (moyenne des géotypes présents)
 ND : non déterminé par absence de prélèvements et/ou d'analyses.

Expression des symptômes au champ

Les différents géotypes ont fait l'objet de notations de symptômes en s'appuyant sur la grille élaborée dans le cadre de ce projet. L'échelle de notation est sur 9 points, avec un gradient de décoloration et de nanisme (figure Ch2), allant de l'absence de tout symptôme (note 1) jusqu'à la disparition des plantes (note 9).

Les premiers symptômes, et les premières différences entre les géotypes, ont pu apparaître dès février (cf. photographie ci-après) mais les comparaisons entre ceux-ci ont porté sur la dernière notation effectuée sur chaque lieu.

Les moyennes ajustées, obtenues pour chaque lignée après compilation des notes finales obtenues sur les différents essais (Tableau Ch3), témoignent d'un écart important entre d'une part les variétés sensibles (2 références) et d'autre part, les différents géotypes

contenant *Ryd2* et/ou *Ryd3*. L'intensité des symptômes varie selon les parcelles d'essai (année, site), mais les géotypes *Ryd* étudiés ont toujours exprimé de faibles symptômes, avec essentiellement des décolorations de bout de feuille. Les écarts (faibles) entre les géotypes étudiés sont sans doute davantage à relier aux différences entre les fonds génétiques qu'au type de gène *Ryd2* et/ou *Ryd3*. Ainsi, si les lignées *Ryd2 +Ryd3* de l'étude se comportent bien, certaines lignées *Ryd2* affichent des symptômes tout aussi faibles.

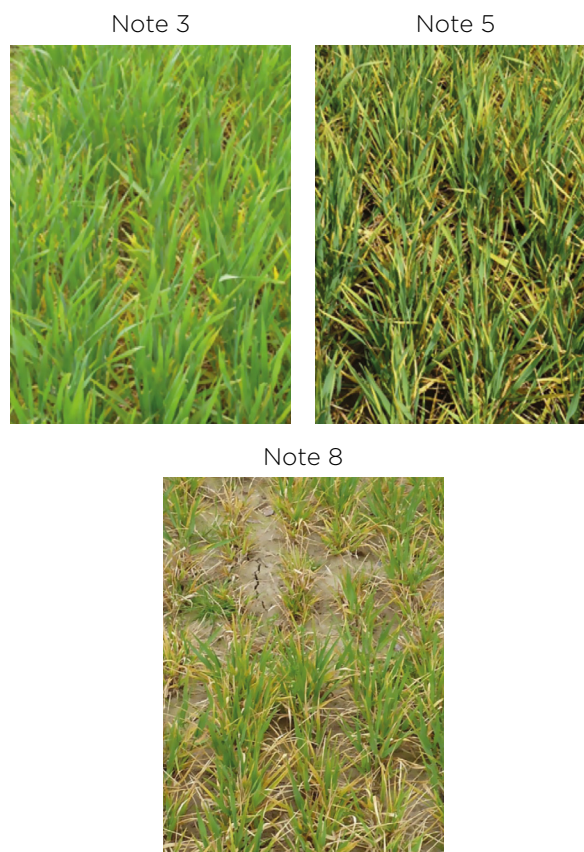


Figure Ch2 : Illustration de trois notes de la grille



Perte de rendement liée à la JNO

Les essais implantés au champ en microparcelles (années 2 et 3), pour une mesure de l'impact de la JNO sur le rendement, n'ont pas tous subi d'infestation significative par des pucerons et/ou n'ont pas tous permis une présence significative de la seule infection

virale recherchée. De ce fait, certains essais ont été retirés des analyses et ne sont donc pas présentés.

		Moyenne ajustée	Ecart-type	Nbre essais
Sensible	Etincel	6.4	1,5	14
Sensible	KWS Cassia	4.9	1,4	14
	Amistar	1.6	0,6	14
	Rafaela	1.4	0,4	14
	W 983	1.5	0,5	14
Ryd2	SC1601	1.8	0,6	14
	SC1602	1.7	0,4	14
	FD1601	1.8	0,6	14
	FD1602	1.9	0,4	14
	D14497-26	1.7	0,6	8
	SC1603	2.4	0,5	12
Ryd3	SC1604	2.4	0,7	12
	FD1603	2.4	0,7	5
	FD1604	2.5	0,7	5
	D14497-7	3.2	0,7	3
Ryd2	SC1605	1.4	0,4	4
+	D14498	1.4	0,5	8
Ryd3	W115019	1.5	0,6	8

Tableau Ch3 : Synthèse des notations sur 3 ans (2017, 2018, 2019) : note globale (1-9)

Les résultats, sur les 5 essais de 2018 et les 3 essais de 2019 validés, témoignent de la forte nuisibilité de l'infection virale sur les variétés sensibles, et de son importante hétérogénéité selon les sites et années. Les pertes de rendement varient de 25 à 75 % pour la référence Etincel (6 rangs) et de 26 à 60 % pour KWS Cassia (2 rangs). La variété tolérante de référence Amistar (6 rangs) présente des pertes très faibles mais pouvant aller jusqu'à 18 % (tableau Ch4).

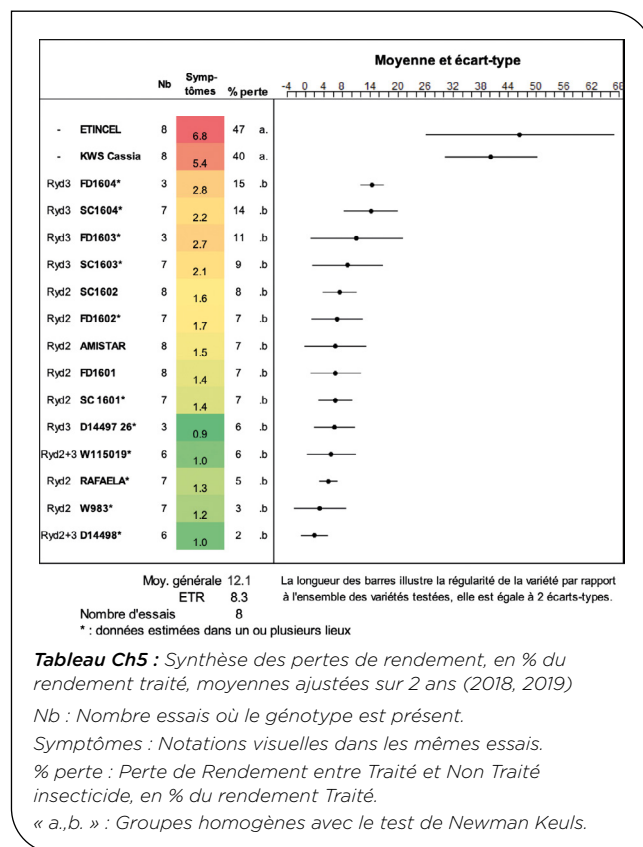
2018	ETINCEL			KWS Cassia			AMISTAR		
	Traité	Non-traité	% perte	Traité	Non-traité	% perte	Traité	Non-traité	% perte
GAILLAC (81)	80	54	32	76	57	26	87	83	5
LA POUZE (49)	68	48	29	58	34	42	71	59	17
CAPPELLE (59)	71	17	76	42	28	34	82	80	2
MAULE (78)	85	37	56	74	41	44	87	84	4
TIEGEM (BE)	89	67	25	78	48	38	96	97	0

2019	ETINCEL			KWS Cassia			AMISTAR		
	Traité	Non-traité	% perte	Traité	Non-traité	% perte	Traité	Non-traité	% perte
CAPPELLE (59)	103	31	70	88	35	60	101	100	0
MONTANS (81)	104	77	27	89	62	31	103	84	18
TIEGEM (BE)	124	53	58	80	42	48	104	94	9

Tableau Ch4 : Rendement (q/ha) par essai des 3 variétés de référence, avec ou sans protection insecticide, et perte de rendement en % du rendement traité.
 Traité = Rendement avec protection insecticide
 Non Traité = Rendement en l'absence de protection insecticide

Les moyennes ajustées du taux de perte de rendement des différents génotypes sont présentées dans le tableau Ch5, avec en regard les notations de symptômes obtenues sur ces mêmes essais. Les génotypes disponibles entre les années du projet ayant pu varier (en lien avec la disponibilité des semences) et les essais n'ayant pas toujours pu être validés pour l'objectif fixé, les résultats s'appuient sur un effectif différent d'un génotype à l'autre.

Les résultats témoignent d'une bonne relation entre les notations visuelles des symptômes selon la grille établie et le taux de perte de rendement (exprimé en % du rendement traité). Les pertes sont élevées et significativement supérieures pour les deux variétés sensibles de référence (test de Newman-Keuls). Concernant les génotypes avec Ryd2 et/ou Ryd3, ils présentent tous des pertes significativement inférieures aux variétés sensibles avec un taux moyen allant de 2 à 15 %. Ces résultats moyens sont à prendre avec précaution. D'une part, les différents génotypes de précocité variable sont semés à la même date, en semis précoce, afin d'accroître l'exposition aux pucerons. D'autre part certains génotypes, testés uniquement en année 3, sont plus faiblement représentés (3 essais). De la même façon que pour les observations visuelles, on peut observer un bon comportement des génotypes Ryd2+Ryd3, mais à nouveau des lignées Ryd2 uniquement peuvent amener à des pertes de rendement tout aussi faibles.



Impacts sur la qualité de la récolte

Teneur en protéines (% MS) : La JNO est à l'origine d'une augmentation de la teneur en protéines pour les témoins sensibles Etincel et KWS Cassia, en raison de la concentration des protéines liée à un rendement nettement plus faible. Concernant les génotypes avec Ryd2 et/ou Ryd3, la teneur protéines est relativement

stable entre les conduites, ce qui est logique car les pertes de rendement sont faibles entre le traité et non traité insecticide.

Poids spécifique (PS) : La JNO entraîne une diminution du PS sur les variétés sensibles respectivement de 4 et 7 points. La perte est plus faible pour les génotypes avec *Ryd2* et/ou *Ryd3*, allant de 1 à 3 points.

Calibrage (% du poids > 2.5 mm) : Ce paramètre est en moyenne davantage affecté par la JNO. Ainsi les témoins sensibles perdent respectivement 5 et 24 points de calibrage. Les génotypes avec *Ryd2* ou *Ryd3* sont également pénalisés (majoritairement de 5 à 8 points). Seuls les génotypes cumulant les 2 gènes semblent présenter une faible perte de calibrage. Il convient néanmoins de rester prudent dans l'interprétation de ces informations car les écart-types sont élevés.

Réf.	Génotype	Rangs	Nb	Protéines (% MS)		PS		Calibrage (% > 2.5 mm)	
				Moy. ajust	Ecart-type	Moy. ajust	Ecart-type	Moy. ajust	Ecart-type
Réf.	ETINCEL	6	10	-1.5	1.0	4	1.5	5	6.5
Réf.	KWS Cassia	2	9	-1.0	0.5	7	2.6	24	12.8
Ryd2	AMISTAR	6	10	-0.2	0.5	2	1.5	7	2.8
Ryd2	FD1601	6	10	-0.2	0.3	3	1.5	7	4.7
Ryd2	FD1602	6	10	0	0.5	2	0.6	3	3.4
Ryd2	RAFAELA	6	10	0	0.5	1	1.1	7	5.0
Ryd2	SC1601	6	10	0.2	0.6	1	1.4	4	3.1
Ryd2	W983	6	10	-0.2	0.5	2	1.1	6	5.2
Ryd2	SC1602	2	10	-0.3	0.5	3	1.6	9	3.1
Ryd3	D14497-26	6	4	-0.5	0.2	1	2.0	6	2.1
Ryd3	FD1603	2	4	-0.8	0.4	3	2.9	9	3.8
Ryd3	FD1604	2	4	-0.6	0.6	1	1.9	8	4.7
Ryd3	SC1603	2	9	0	0.3	2	0.8	5	5.0
Ryd3	SC1604	2	9	-0.2	0.6	2	1.1	8	5.5
Ryd2+3	W115019	6	8	0	0.3	0	2.6	3	4.9
Ryd2+3	D14498	6	8	0	0.4	1	1.7	1	2.6
Ryd2+3	SC1605	2	3	-0.2	0.3	2	0.5	1	3.2

Tableau Ch6 : Protéines, PS et calibrage : écart BRUT entre les valeurs mesurées avec protection insecticide et celles sans protection insecticide Ecart (T-NT)
Nb : Nombre essais où le génotype est présent.

4 Résultats de caractérisation des génotypes en laboratoire

Analyse de la sensibilité de génotypes d'orges porteurs de gènes Ryd

Le principal enjeu associé à l'étude du niveau de sensibilité/résistance d'un génotype est de trouver les conditions expérimentales permettant d'infecter du matériel de référence sensible avec un taux d'infection proche de 50 %. En effet, ce taux d'infection est compatible avec la mise en évidence, pour les génotypes à tester, d'une plus forte ou d'une plus faible sensibilité à l'inoculation virale. Cette étape de calibration a été réalisée en utilisant le génotype d'orge EtinCEL. Sur la base des données disponibles dans la littérature (Brault *et al.*, 2010), plusieurs modalités d'inoculation (durée de la période d'inoculation et nombre de pucerons vecteurs par plante) ont été testées de manière à identifier les conditions optimales. Ainsi, l'utilisation de deux pucerons virulifères (BYDV-PAV4) de stades L₂-L₄ pendant une période d'inoculation (IAP) de 2 heures permet d'obtenir un taux d'infection moyen de 71,8 % +/- 8 % (données non présentées). Ce protocole d'inoculation a été utilisé comme standard dans les expériences conduites dans

le cadre de l'étude. Ainsi, des lots de 9 à 20 plantes de 16 génotypes porteurs du gène *Ryd2* et/ou *Ryd3* et du génotype référent cv. EtinCEL ont été inoculés selon ce protocole décrit ci-dessous (Table 1).

Groupe	Génotype	Gène Ryd	Expérience ^a					
			1	2	3	4	5	6
A	EtinCEL	/	15/20	16/20	14/20	13/20	12/20	14/20
	SC1601	2	14/20	14/20	10/20	2/20	13/20	12/20
	SC1602	2	15/20	19/20	3/20	1/20	7/20	11/20
	Rafaëla	2	15/20	11/20	2/20	1/20	5/20	10/20
	W983	2	6/10	NA	1/20	3/20	0/9	3/12
	FD1601	2	11/20	12/20	9/20	3/20	3/20	14/20
	FD1602	2	8/16	13/20	5/20	2/20	4/20	11/20
B	EtinCEL	/	14/20	12/20	17/20	14/20	NA	NA
	KWS Cassia	/	16/20	18/20	16/20	16/20	NA	NA
	Amistar	2	15/20	10/20	15/20	9/20	NA	NA
	SC1603	3	15/20	10/20	17/20	5/20	NA	NA
	SC1604	3	12/20	14/20	10/20	NA	NA	NA
	D14497-7	3	15/20	15/20	14/20	11/20	NA	NA
	D14497-26	3	8/20	14/20	13/19	8/20	NA	NA
C	EtinCEL	/	6/10	12/20	11/20	11/20	NA	NA
	Amistar	2	2/10	8/20	3/20	8/20	NA	NA
	D14498	2 et 3	0/20	1/20	0/20	1/20	NA	NA
	W115019	2 et 3	NA	0/10	1/6	4/20	NA	NA
	VAR6	2 et 3	0/10	2/10	1/10	2/20	NA	NA

Table 1 : Taux d'infection des génotypes tests
^a : Nombre de plantes infectées/nombre de plantes inoculées
NA : données non disponibles

L'analyse statistique, réalisée à l'aide d'un modèle linéaire généralisé, des taux d'infection obtenus pour chaque génotype *Ryd2*, *Ryd3* et *Ryd2/Ryd3* a été conduite pour chaque groupe d'expérimentation de manière à comparer ces taux à ceux obtenus pour une variété de référence (i.e. EtinCEL pour les groupes A, B et C, ou Amistar pour les groupes B et C). Les génotypes *Ryd2* (Fig. 1A) présentent des taux moyens d'infection allant de 20,0 % (W983) à 53,0 % (SC1601). Les taux d'infection obtenus pour ces 6 génotypes sont significativement plus faibles que celui obtenu pour EtinCEL ($p < 0.001$ pour SC1601 et $p < 0.0001$ pour SC1602, Rafaëla, W983, FD1601 et FD1602). Les données associées aux génotypes *Ryd3* (Fig. 1B) montrent que ces génotypes sont infectés avec des taux moyens allant de 54,6 % (D14497-26) à 68,8 % (D14497-7). Bien que ces taux se révèlent être assez proches du taux d'infection moyen obtenu pour la variété EtinCEL (i.e. 71,3 %), l'analyse statistique révèle que, à l'exception du génotype D14497-7, les taux d'infection associés aux génotypes *Ryd3* sont significativement plus faibles ($p = 0,097$, $p = 0,046$ et $p = 0,026$ pour SC1603, SC1604 et D14497-26, respectivement) que ceux obtenus pour EtinCEL. L'analyse conduite sur ces données mais en utilisant la variété Amistar (*Ryd2*) comme génotype de référence montre que les taux d'infection obtenus pour les 4 génotypes *Ryd3* ne sont pas significativement différents de ceux obtenus pour Amistar. Enfin, les données produites lors de l'étude des génotypes *Ryd2/Ryd3* (Fig. 1C) montrent que les génotypes D14498, VAR6 et W115019 sont associés, dans les conditions expérimentales définies par l'inoculation standardisée, à des taux moyens d'infection particulièrement faibles allant de 2,5 % pour D14498 à 12,2 % pour W115019.

Ces taux d'infection sont significativement plus faibles que ceux obtenus pour EtinCEL ($p < 0.0001$ pour les trois génotypes) et que ceux obtenus pour Amistar ($p < 0.001$ pour D14498 et $p < 0.05$ pour VAR6 et W115019). Il est important de noter que dans les groupes d'expériences B et C, le génotype Amistar (*Ryd2*) se comporte différemment avec un taux d'infection significativement ($p = 0,002$ groupe C) et non significativement ($p = 0,166$, groupe B) différent de la référence EtinCEL.

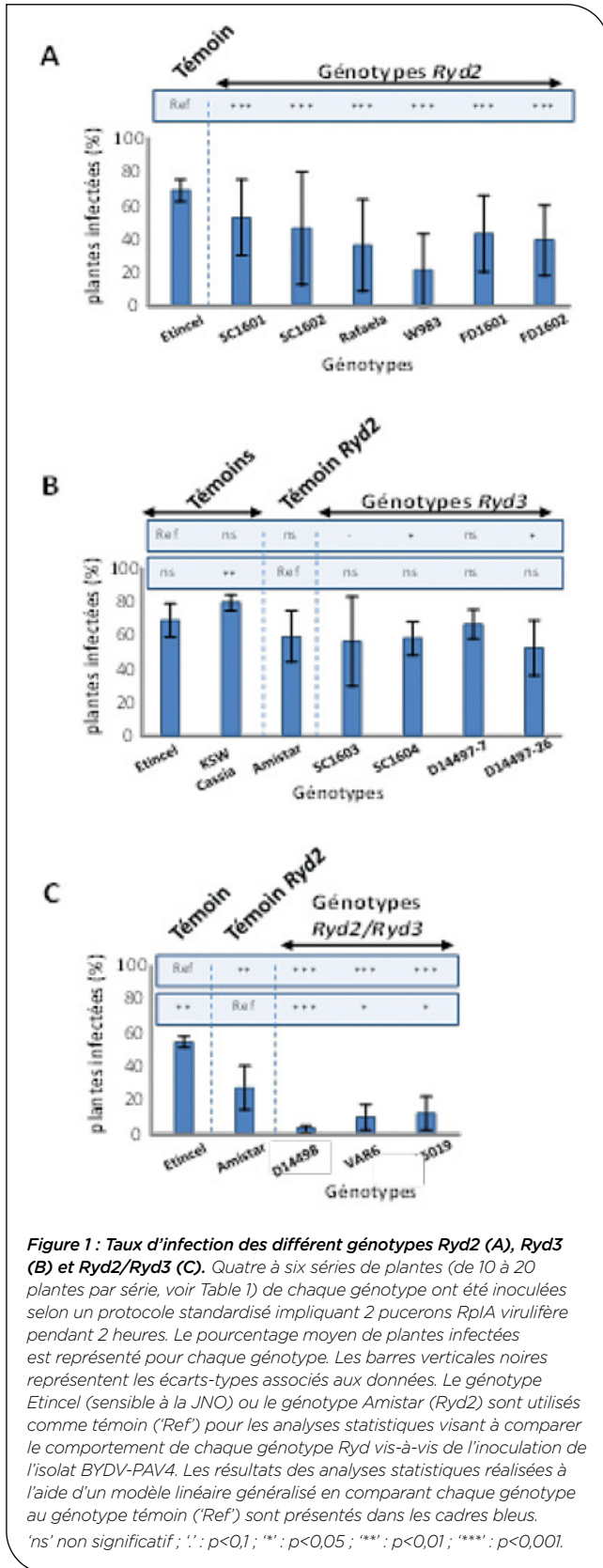


Figure 1 : Taux d'infection des différents génotypes Ryd2 (A), Ryd3 (B) et Ryd2/Ryd3 (C). Quatre à six séries de plantes (de 10 à 20 plantes par série, voir Table 1) de chaque génotype ont été inoculées selon un protocole standardisé impliquant 2 pucerons *Rp1A* virulifère pendant 2 heures. Le pourcentage moyen de plantes infectées est représenté pour chaque génotype. Les barres verticales noires représentent les écarts-types associés aux données. Le génotype Etincel (sensible à la JNO) ou le génotype Amistar (Ryd2) sont utilisés comme témoin ('Ref') pour les analyses statistiques visant à comparer le comportement de chaque génotype Ryd vis-à-vis de l'inoculation de l'isolat BYDV-PAV4. Les résultats des analyses statistiques réalisées à l'aide d'un modèle linéaire généralisé en comparant chaque génotype au génotype témoin ('Ref') sont présentés dans les cadres bleus. 'ns' non significatif ; '*' : $p < 0,01$; '**' : $p < 0,05$; '***' : $p < 0,01$; '****' : $p < 0,001$.

Dynamique d'accumulation virale dans les génotypes Ryd

Les génotypes Etincel, SC1601, Rafaela, W983, FD1601, SC1604, D14497-26, D14498 et W115019 ont été sélectionnés pour caractériser la dynamique d'accumulation virale dans les plantes infectées durant les trois premières semaines de l'infection.

A partir des taux d'infection obtenus pour chaque date d'échantillonnage (i.e. 7, 14, 21 et 28 jours après inoculation), il est possible de reconstruire la cinétique moyenne d'infection des 9 génotypes de l'étude (Fig. 2A et 2B). Les taux d'infection obtenus pour les génotypes Ryd2, Ryd3 et Ryd2/Ryd3 sont significativement plus faibles que ceux obtenus pour le génotype de référence cv. Etincel, à l'exception du génotype FD1601 (Ryd2) au 7^{ème} jour après inoculation (Fig. 2B).

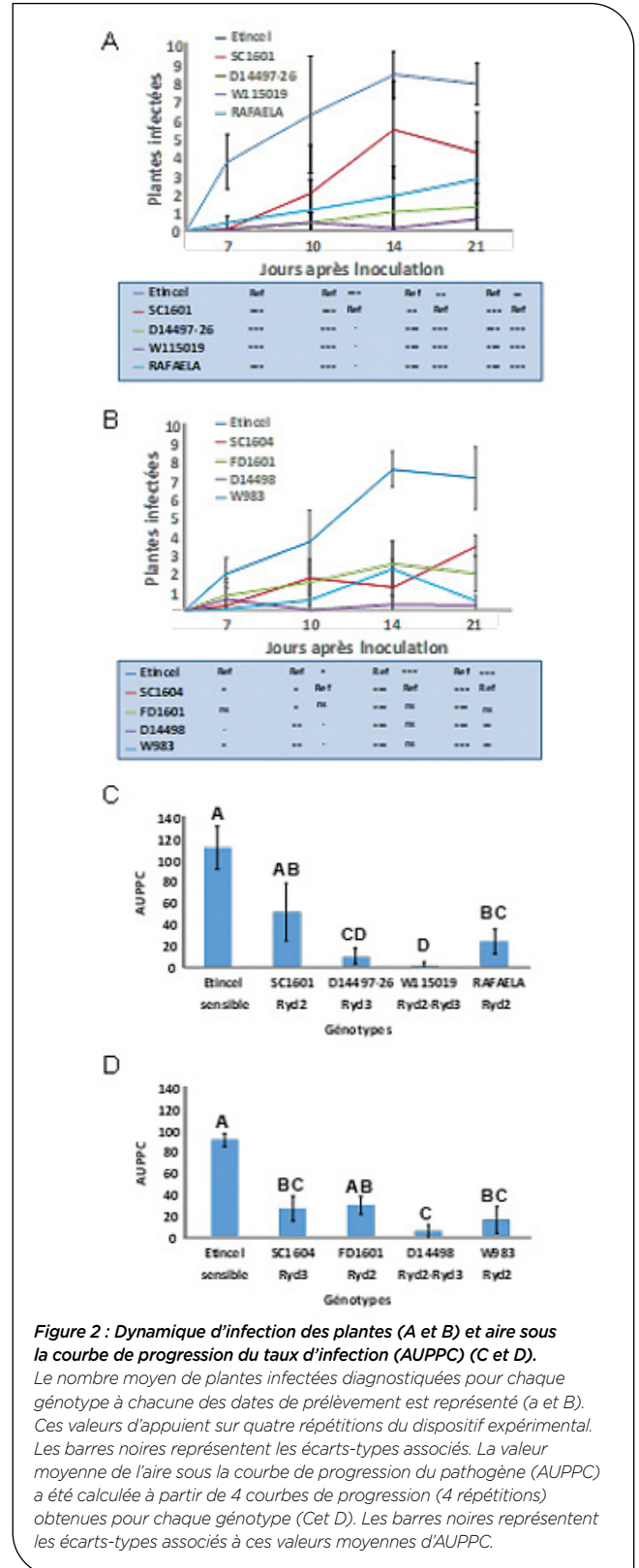


Figure 2 : Dynamique d'infection des plantes (A et B) et aire sous la courbe de progression du taux d'infection (AUPPC) (C et D).

Le nombre moyen de plantes infectées diagnostiquées pour chaque génotype à chacune des dates de prélèvement est représenté (a et B). Ces valeurs d'appuient sur quatre répétitions du dispositif expérimental. Les barres noires représentent les écarts-types associés. La valeur moyenne de l'aire sous la courbe de progression du pathogène (AUPPC) a été calculée à partir de 4 courbes de progression (4 répétitions) obtenues pour chaque génotype (C et D). Les barres noires représentent les écarts-types associés à ces valeurs moyennes d'AUPPC.

La transformation des données de cinétique en données correspondant aux surfaces sous la courbe de progression du pathogène (AUPPC, Fig. 2C et 2D) permet de constater que les AUPPC des génotypes D14997-26 (*Ryd3*), W115019 (*Ryd2/Ryd3*), Rafaela (*Ryd2*), SC1604 (*Ryd3*), D14498 (*Ryd2/Ryd3*) et W983 (*Ryd2*) sont significativement plus faibles que celle du génotype Etincel alors que les génotypes SC1601 (*Ryd2*) et FD1601 (*Ryd2*) présentent une AUPPC semblable à celle d'Etincel. Ainsi, la présence du gène de résistance *Ryd2* dans un génotype d'orge ne semble donc pas garantir le phénotype de résistance partielle observé lors du suivi de la cinétique d'infection. Ce résultat suggère un effet associé au fond génétique du génotype sur l'expression du caractère porté par le gène *Ryd2*. Les génotypes porteurs des deux gènes de résistance (i.e. W115019 et D14498) présentent des AUPPC significativement plus faibles que les autres, suggérant un gain de résistance à l'infection virale associé au pyramidage des deux gènes *Ryd*. Les données semi-quantitatives générées par l'approche sérologique peuvent être utilisées pour suivre l'évolution de la charge virale dans les plantes infectées pendant la période d'observation (Fig. 3A et 3B). Ces données ont été utilisées pour calculer l'AUPPC associée à la dynamique d'accumulation virale observée pour chaque génotype (Fig. 3C et 3D).

L'AUPPC de chaque génotype a été comparé à celle obtenue pour le génotype de référence cv. Etincel. Seul le génotype W115019 (*Ryd2/Ryd3*) présente une AUPPC plus faible que le génotype de référence sensible. Cependant, en observant les données de charges virales à chacune des dates de la cinétique, les deux génotypes *Ryd2/Ryd3* accumulent significativement moins le virus à J7, J14 et J21 pour W115019 et à J10 pour D14498 (Fig. 3A et 3B).

Impact du stade de développement de la plante sur la sensibilité à l'inoculation virale

Des semis à dates décalées ont été réalisés de manière à produire des plantes d'âges différents pour procéder à l'inoculation virale. Le taux d'infection moyen obtenu pour Etincel varie, pour les différents âges de la plante à l'inoculation, entre 30 % et 50 % avec un taux moyen global d'infection de 40 % (Figure 4).

L'analyse statistique des données sanitaires montre l'absence d'effet significatif de l'âge de la plante à l'inoculation sur le taux d'infection à la fois pour le génotype sensible et pour les différents génotypes porteurs du(es) gène(s) *Ryd2/Ryd3*. Toutefois, les taux d'infection obtenus pour les différents génotypes *Ryd* aux différents âges d'inoculation sont significativement plus faibles que ceux obtenus pour le génotype sensible de référence ($p < 0,001$). Ces résultats confirment la capacité des différents génotypes testés à lutter, dans les conditions expérimentales utilisées dans cette procédure, contre l'infection virale au cours des 38 premiers jours de développement de la plante dans les conditions de culture favorables à l'infection de l'hôte que représentent i) des températures de 24°C/20°C (J/N : 16h/8h) et ii) un cycle jour/nuit de 16/8 heures. Par ailleurs, des taux d'infections inférieurs à 10 % ont été obtenus pour les génotypes W983 (*Ryd2*), D14498 (*Ryd2/Ryd3*), D14497-26 (*Ryd3*), W115019 (*Ryd2/Ryd3*) et Rafaela (*Ryd2*).

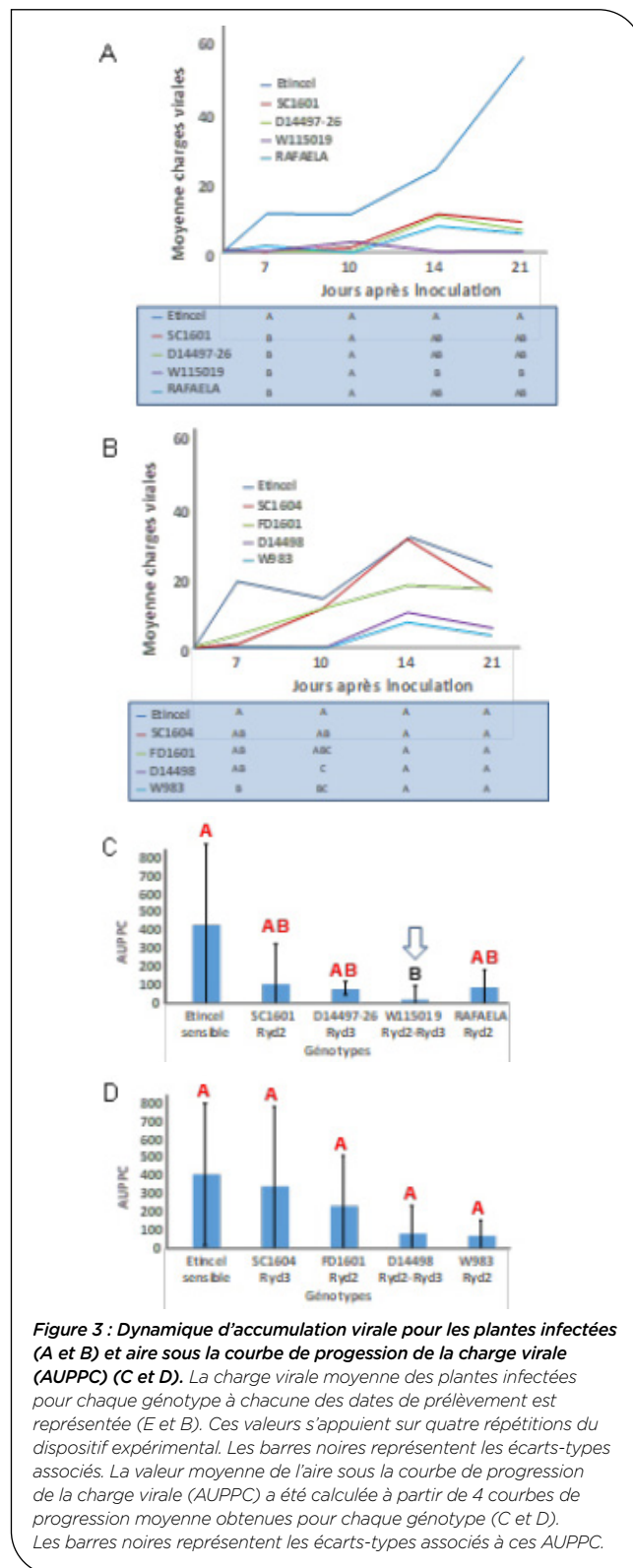


Figure 3 : Dynamique d'accumulation virale pour les plantes infectées (A et B) et aire sous la courbe de progression de la charge virale (AUPPC) (C et D). La charge virale moyenne des plantes infectées pour chaque génotype à chacune des dates de prélèvement est représentée (E et B). Ces valeurs s'appuient sur quatre répétitions du dispositif expérimental. Les barres noires représentent les écarts-types associés. La valeur moyenne de l'aire sous la courbe de progression de la charge virale (AUPPC) a été calculée à partir de 4 courbes de progression moyenne obtenues pour chaque génotype (C et D). Les barres noires représentent les écarts-types associés à ces AUPPC.

Estimation de la durée de latence

La latence est la période requise pour qu'une plante infectée acquière un statut « infectieux » et puisse ainsi servir de source pour la dispersion de virus. L'étude de la durée de latence repose initialement sur la capacité à produire des plantes sources infectées pour chacun des génotypes candidats. Le niveau de résistance élevé des deux génotypes *Ryd2/Ryd3* (i.e. W115019 et D14498) a limité le nombre de plantes sources utiles (i.e. infectées) ne permettant pas le suivi de la sortie de latence pour ces génotypes.

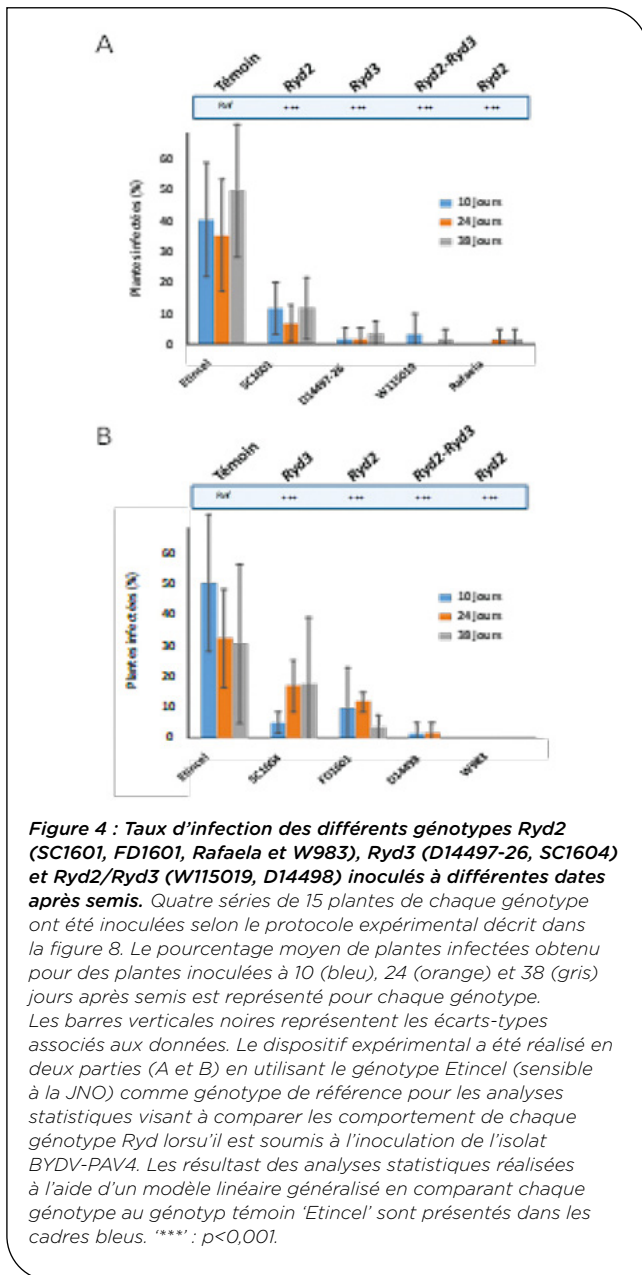


Figure 4 : Taux d'infection des différents génotypes *Ryd2* (SC1601, FD1601, Rafaela et W983), *Ryd3* (D14497-26, SC1604) et *Ryd2/Ryd3* (W115019, D14498) inoculés à différentes dates après semis. Quatre séries de 15 plantes de chaque génotype ont été inoculées selon le protocole expérimental décrit dans la figure 8. Le pourcentage moyen de plantes infectées obtenu pour des plantes inoculées à 10 (bleu), 24 (orange) et 38 (gris) jours après semis est représenté pour chaque génotype. Les barres verticales noires représentent les écarts-types associés aux données. Le dispositif expérimental a été réalisé en deux parties (A et B) en utilisant le génotype Etincel (sensible à la JNO) comme génotype de référence pour les analyses statistiques visant à comparer le comportement de chaque génotype *Ryd* lorsqu'il est soumis à l'inoculation de l'isolat BYDV-PAV4. Les résultats des analyses statistiques réalisées à l'aide d'un modèle linéaire généralisé en comparant chaque génotype au génotype témoin 'Etincel' sont présentés dans les cadres bleus. **** : $p < 0,001$.

Pour les autres génotypes *Ryd2* et/ou *Ryd3*, les taux d'infection associés aux plantes sources ont permis de disposer de 17 (cv. SC1604) à 34 (cv. Etincel) plantes infectées (Fig. 5), ce qui correspond à 3 à 10 plantes sources infectées disponibles pour réaliser des transmissions virales pour chaque combinaison génotype/jour après inoculation. Les plantes sources du génotype Etincel permettent d'obtenir des taux de transmission proches de 80 % dès 14 jours après inoculation suggérant que, pour ce génotype de référence, le statut infectieux est atteint au cours des deux premières semaines de l'infection. Au 7^{ème} jour après inoculation, SC1604 et FD1601 représentent d'aussi bonnes sources de virus qu'Etincel alors que les autres génotypes sont associés à des taux de transmission plus faibles suggérant une sortie de latence moins dynamique. Au 14^{ème} jour après inoculation, les génotypes porteurs de *Ryd2* ou de *Ryd3* sont de moins bonnes sources de virus que le génotype sensible Etincel. Enfin, l'analyse des données obtenues au 28^{ème} jour après inoculation indiquent que Rafaela et SC1604

représentent, à ce stade tardif de l'infection, des sources de virus de qualité équivalente au génotype Etincel (Fig. 5).

5 Discussion

Les données générées par les essais au champ permettent de mettre en évidence un certain nombre de points. Bien que les analyses virales n'aient pas mis en évidence une diminution du taux de détection d'espèces virales, l'expression phénotypique des symptômes de la JNO s'est avérée nettement et significativement réduite pour tous les génotypes porteurs d'un ou plusieurs gènes *Ryd*. Les observations n'ont pas permis d'identifier de différence entre les gènes *Ryd* ou leur association. La méthode PCR utilisée dans le cadre de ce projet, étant qualitative, ne permet pas de quantifier des différences dans la charge virale des plantes. Pourtant dans une situation de résistance partielle et/ou tolérance, la quantification de la charge virale pourra être pertinente dans l'évaluation variétale. Ce constat, ainsi que le constat d'un manque de spécificité des amorces MAV vis-à-vis du PAV, révèlent un besoin de développer de nouveaux outils moléculaires. Par exemple la PCR en temps réel ou le séquençage permettront d'identifier spécifiquement l'ensemble des espèces virales (séquençage), et de quantifier la charge virale dans les plantes (PCR en temps réel). De la même manière, les pertes de rendement liées à l'infection sont significativement réduites pour les génotypes porteurs d'un ou plusieurs gènes *Ryd*, sans mettre en évidence, dans le cadre de cette expérimentation, de différence significative entre les différents gènes ou leur combinaison. Concernant la qualité de récolte, on peut constater un effet sur la concentration en protéines des génotypes sensibles vraisemblablement liée à la diminution du rendement, aucun effet n'est observé sur les génotypes avec *Ryd*. Le poids spécifique est pénalisé de façon plus importante pour les génotypes sensibles que pour les génotypes avec *Ryd*, sans différence entre ces derniers. L'infection virale pénalise le calibrage, de façon marquée pour le génotype sensible à 2 rangs. Les autres génotypes sensibles ou avec *Ryd* présentent une réponse similaire, à l'exception notable des génotypes porteurs des gènes *Ryd2* et *Ryd3*.

L'ensemble de ces résultats, bien que prometteur et instructif, est à prendre avec précaution du fait du faible effectif de génotypes présents, fournis par un groupe restreint de sélectionneurs, et du fait du faible nombre de données disponibles en lien avec les difficultés rencontrées à réussir ce type d'essai en contamination naturelle. Néanmoins, les résultats s'avèrent cohérents et en accord avec les mécanismes dévoilés par les travaux en conditions contrôlées.

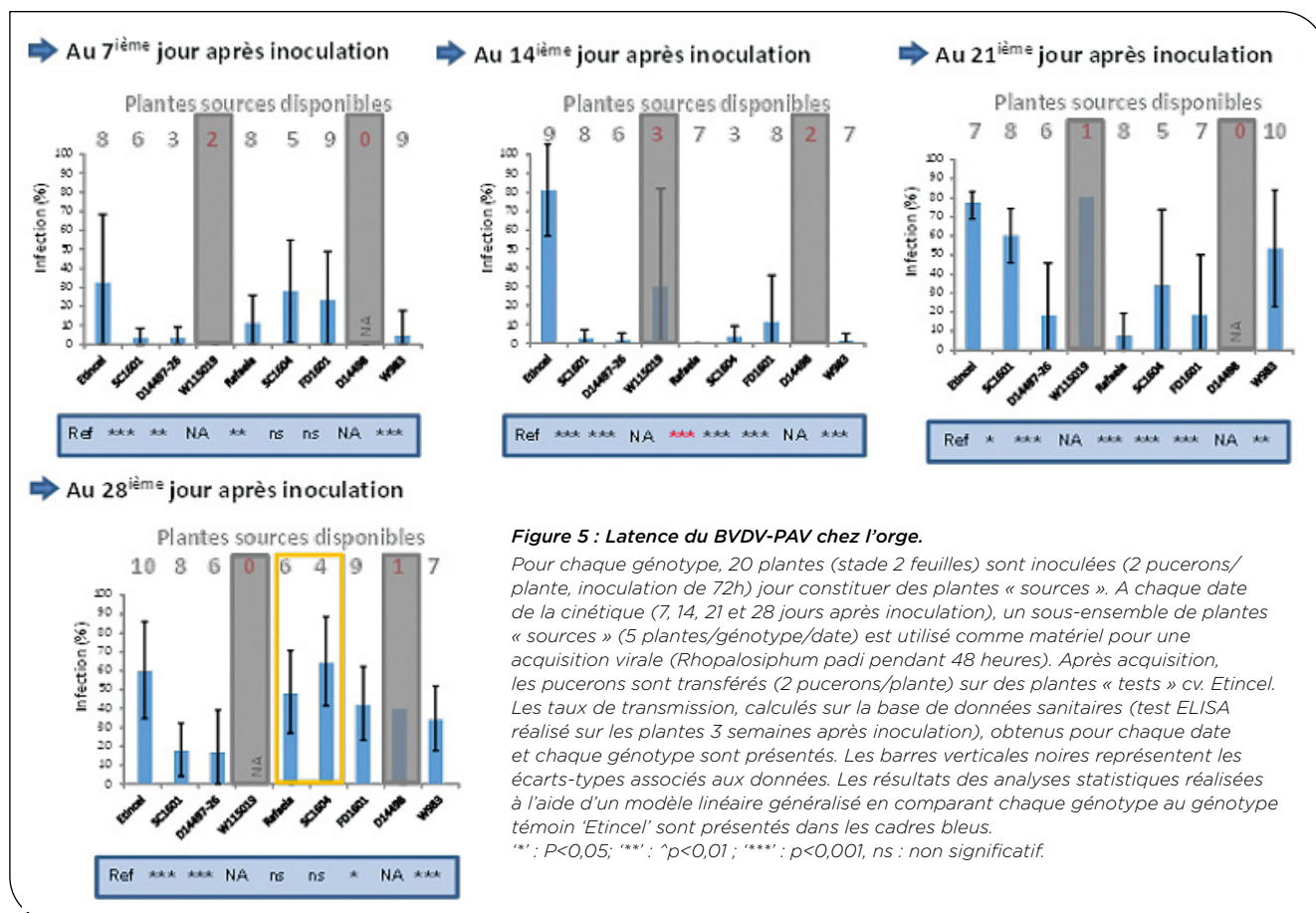
Les données générées lors du volet de l'étude au laboratoire montrent que les génotypes *Ryd2* et *Ryd3* sont moins sensibles à l'inoculation par le BYDV-PAV que la variété sensible Etincel. De plus, les trois génotypes cumulant ces deux ressources génétiques, ont présenté un phénotype particulièrement intéressant avec des taux d'infection de 5 à 20 fois plus faibles que ceux obtenus sur la variété sensible Etincel (sans gène *Ryd*) et de 3 à 10 fois plus faibles que ceux obtenus avec la variété Amistar (*Ryd2* uniquement).

Ainsi, les différents axes de recherche développés au laboratoire dans le cadre du projet JNOrge ont permis de montrer que les gènes *Ryd* étudiés confèrent une résistance partielle à l'infection virale illustrée par i) une réduction du taux d'infection, ii) un ralentissement de la dynamique d'infection virale et iii) une augmentation de la durée de latence des plantes infectées.

Sur la base de ces résultats, des variétés portant ces gènes devraient, dans un futur proche, pouvoir être utilisées en remplacement des variétés actuelles sensibles à la JNO. Nous n'avons pas pu mettre en

évidence de manière claire un effet "fond génétique" en plus des gènes cités pour la tolérance/résistance mais ce sujet mériterait d'être approfondi.

Cependant, avant de s'engager dans une stratégie d'utilisation et de déploiement de ces ressources génétiques, il conviendra d'en évaluer la durabilité face au potentiel évolutif des virus de la JNO de manière à argumenter au mieux les choix stratégiques associés à l'utilisation des gènes *Ryd* dans les programmes de sélection de l'orge et ainsi d'en augmenter l'efficacité et la longévité.



Références bibliographiques

Badr, K. M, Sch, R., El Rabey, H., Effgen, S., Ibrahim, H.H., Pozzi, C., Rohde, W., Salamini, F. (2000). On the Origin

Balaji B, Bucholtz DB and Anderson JM (2003) Barley yellow dwarf virus and Cereal yellow dwarf virus quantification by real-time polymerase chain reaction in resistant and susceptible plants. *Phytopathology* 93: 1386-1392.

Bayon F, Ayrault J-P and Pichon P (1982) La jaunisse nanisante de l'orge. *Phytoma* 342: 17-21.

Brault V, Uzest M., Monsion B., Jacquot E., Blanc S. Aphids as transport devices for plant viruses, *C. R. Biologies* (2010), doi:10.1016/j.crvi.2010.04.001

Bruehl GW (1961) Barley Yellow Dwarf: Monograph n_1, The American Phytopathological Society, 52.

Burnett PA, Comeau A, Qualset CO. (1995): Tolerance or resistance for control of barley yellow dwarf. In: D'Arcy CJ, Burnett PA (eds) *Barley Yellow Dwarf 40 Years of Progress*, APS Press, Minnesota (1995). pp. 321-343.

Carrington JC, Kasschau KD, Mahajan SK and Schaad MC (1996) Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* 8: 1669-1681.

Chain F., Riault G., Trottet M., Jacquot E. (2007b). Valuation of the durability of the Barley yellow dwarf virus-resistant Zhong ZH and TC14 wheat lines. *European Journal of Plant Pathology* 117(1): 35-43.

Chain, F., Riault G, Trottet M, Jacquot E. (2007a). Characterization of two sources of tolerance/resistance to Barley yellow dwarf virus-PAV (BYDV-PAV) in wheat and estimation of their durability using serial passage experiment procedures. *Parasitica* 61, 41-46

- Clark M.F. and Adams A.N.** (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, n. 34 475-483.
- Cooper JI and Jones AT** (1983) Responses of plants to viruses: proposals for use of terms. *Phytopathology* 73: 127-128.
- D'Arcy, C. J., and P. A. Burnett.** (1995). Barley yellow dwarf, 40 years of progress. APS Press, St Paul, USA, 374 pp.
- Delaunay A., Lacroix C., Morlière S., Riault G., Chain F., Trottet M., Jacquot E.** A SSCP-derived quantitative variable to monitor the virulence of a Barley yellow dwarf virus-PAV (BYDV-PAV) isolate during adaptation to the TC14 wheat resistant line. *Molecular Plant Pathology* (2010), 11(5), 651-661.
- Domier,L.L.** (2012). "Family-Luteoviridae" in "Virus Taxonomy", 9th Edn., eds M.Q.K. Andrew, L. Elliot, J.A. Michaeland E.B. Carstens (SanDiego,CA:Elsevier), 1045-1053.
- Fabre, F., Bruchou, C., Palloix, A., & Moury, B.** (2009). Key determinants of resistance durability to plant viruses: Insights from a model linking within- and between-host dynamics. *Virus Research*, 141, 140-149.
- Garcia-Arenal, F., and McDonald, B. A.** (2003). An analysis of the durability of resistance to plant viruses. *Phytopathology*, 93, 941-952.
- Gildow FE and Rochow WF** (1980) Role of accessory salivary glands in aphid transmission of barley yellow dwarf virus. *Virology* 104: 97-108.
- Grafton KF, Poehlman JM, Sechler DT and Sehgal OP** (1982) Effect of barley yellow dwarf virus infection on winter survival and other agronomic traits in barley. *Crop science* 22: 596-600.
- Harrison, B. D.** (2002). Virus variation in relation to resistance breaking in plants. *Euphytica*, 124, 181-192.
- Henry M, George S, Arnold GM, Dedryver CA, Kendall DA, Robert Y and Smith BD** (1993) Occurrence of barley yellow dwarf virus (BYDV) isolates in different farmland habitats in western France and south-west England. *Annals of Applied Biology* 123: 315-329.
- Larkin PJ, Bretell RIS, Banks PM, Appels R, Waterhouse PM, Cheng ZM, Zhou GH, Xin ZY and Chen X** (1990) Identification, characterization and utilisation of sources of resistance to barley yellow dwarf virus. In: Burnett PA (ed.) *World Perspectives on Barley Yellow Dwarf*. (pp. 415-420). International Maize and Wheat Improvement (CIMMYT), Mexico.
- Li LH, Zheng DS, Yang XM, Li XQ, Liu SC and Song CH** (1998) Diversity evaluation of wheat germplasm resources in China. *Genetic Resources & Crop Evolution* 45: 167-172.
- Lister RM and Ranieri RR** (1995) Distribution and economic importance of Barley Yellow Dwarf. In: D'Arcy CJ and Burnett PA (eds) *Barley Yellow Dwarf, 40 years of Progress*. (pp. 29-53). St Paul.
- Miller, W.A., Krueger, E.N., and Gray, S.M.** (2013). ICTV taxonomic proposal 2013.016a,bP: In the family Luteoviridae, create species Maize yellow dwarf virus-RMV in the genus Polerovirus and remove the unassigned species Barley yellow dwarf virus-RMV. Available online at: <http://talk.ictvonline.org/files/proposals/taxonomyproposalsplant1/m/plant01/4600.aspx>
- Miller, W.A., Waterhouse P.M., and Gerlach W.L.** (1998). Sequence and organization of barley yellow dwarf virus genomic RNA. *Nucleic Acids Research*, 16 :6097-6111.
- Monneveux P, St-Pierre CA and Comeau A** (1991) Barley yellow dwarf virus tolerance in drought situations. In: Comeau A and Makkouk KM (eds) *Barley Yellow Dwarf in West Asia and North Africa*. (pp. 209-220). Aleppo.
- Moury B., Fabre F. and Senoussi R.** (2007). Estimation of the number of virus particles transmitted by an insect vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 17891-17896.
- Niks, R.E., Habekuß, A., Bekele, B., Ordon, F.** (2004). A novel major gene on chromosome 6H for resistance of barley against the barley yellow dwarf virus. *Theor Appl Genet*, 109: 1536-1543
- Gian YT, Zhou GH and Zhou XM** (1993) Screening for the sources of resistance to BYDV. [in Chinese]. *Acta Phytophylacica Sinica* 20: 71-75.
- Rimbaud L., Dallot S., Delaunay A., Borron S., Soubeyrand S., Thébaud G. and Jacquot E.** (2015). Assessing the mismatch between incubation and latent periods for vector-borne diseases: the case of sharka. *Phytopathology*. 105:1408-1416
- Sadeghi E, Dedryver CA and Gauthier JP** (1997) Role of acquisition and inoculation time in the expression of clonal variation for BYDV-PAV transmission in the aphid species *Rhopalosiphum padi*. *Plant Pathology* 46: 502-508.
- Schaller CW, Rasmussen DC, Qualset CO** (1963). Sources of resistance to the yellow dwarf virus in barley. *Crop Sci* 4: 544-548.
- Schaller CW, and Chim. Cl.** (1969). Registration of Atlas 68 barley. *Crop Sci.* (Madison) 9(4):521 Comment: CV-111
- Scholz, M., Ruge-Wehling, B., Habekuß, A., Schrader, O., Pendinen, G., Fischer K., Wehling P.** (2009). Ryd4 Hb : a novel resistance gene introgressed from *Hordeumbulbosum* into barley and conferring complete and dominant resistance to the barley yellow dwarf virus. *Theoretical and Applied Genetics*, 119 : 837-849.
- Signoret PA and Maroquin C** (1990) The barley yellow dwarf virus situation in western Europe. In: Burnett PA (ed.)
- Suneson CA.** (1955) Breeding for resistance to yellow dwarf virus in barley. *Agron J* 47:283.
- Zhang, W., Cheng, Z., Xu, L., Wu, M., Waterhouse, P., Zhou, G.** (2009). The complete nucleotide sequence of the barley yellow dwarf GPV isolate from China shows that it is a new member of the genus polerovirus. *Arch.Virol.* 154,1125-1128.

JNOrge : De nouvelles résistances/tolérances contre la jaunisse nanisante chez l'orge : caractérisation et impacts épidémiologiques

Isabelle Abt¹, Adeline Pinault¹, Vincent Plat¹, Marlène Souquet¹, Amélie Genty² et Emmanuel Jacquot¹

1 - PHIM, INRAE, CIRAD, Institut Agro, Univ Montpellier, Cirad TA A-54/K, Campus international de Baillarguet, 34398, Montpellier, France
2 - Secobra Recherches, Le Bois Henry, 78580 Maule, France

La jaunisse nanisante de l'orge (JNO) est l'une des maladies virales les plus graves sur céréales. En France, la JNO est principalement causée par l'espèce PAV du Barley yellow dwarf virus (BYDV-PAV, famille *Tombusviridae*, genre *Luteovirus*). Ce virus, transmis de manière persistante par pucerons (e.g. *Rhopalosiphum padi* et *Sitobion avenae*), induit des symptômes de jaunissement et de nanisme et entraîne des pertes de rendement pouvant atteindre 80 %. Depuis deux décennies, la principale méthode de lutte contre la JNO est basée sur l'utilisation d'insecticides (traitements de semences et pulvérisations foliaires). Ainsi, près de 30% des surfaces céréalières françaises ont été traitées avec des néonicotinoïdes sur la période 2014-2018. Cependant, avec la récente interdiction par l'Union européenne des néonicotinoïdes, les parcelles de céréales non traitées ne seront pas protégées contre la colonisation des pucerons et l'inoculation virale lors des stades précoces du développement de la plante jusqu'à l'application d'un éventuel traitement foliaire à base de pyréthrinolide. Il est donc important d'identifier des alternatives aux produits chimiques pour tenter de maintenir une faible prévalence de JNO en parcelles de céréales et ainsi maintenir des rendements élevés dans une agriculture progressivement dépourvue de solutions chimiques.

Seize lignées d'orge portant les gènes *Ryd2* et/ou *Ryd3* ont été testées pour leur phénotype de résistance/tolérance au BYDV-PAV. Plusieurs paramètres des interactions virus-hôte, notamment le taux d'infection, la dynamique d'accumulation virale, l'âge de l'hôte à l'inoculation et la durée de la période de latence, ont été étudiés à l'aide de procédures basées sur des inoculations calibrées et la détection sérologique du virus dans les plantes inocuées. Cette étude de l'impact des gènes *Ryd2* et/ou *Ryd3* sur des paramètres clés du processus infectieux permet d'apporter des informations cruciales aux sélectionneurs pour le développement de matériels innovants dans la lutte contre la jaunisse nanisante de l'orge.

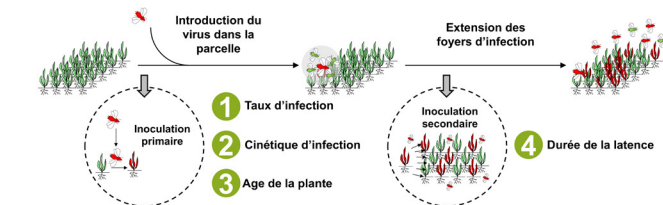


Figure 1. Représentation schématique des quatre principales actions conduites dans le cadre du projet.

→ 16 génotypes d'orge

Témoin	<i>Ryd2</i>	<i>Ryd3</i>	<i>Ryd2/Ryd3</i>
Etincel	SC1601 W983	SC1603 D14497-7	D14498 Var 6
KWS Cassia	SC1602 FD1601 Rafaela FD1602 Amistar	SC1604 D14497-26	W115019

→ BYDV-PAV4 (Chain *et al.*, 2007)

Collecté en 1989 sur avoine en Ile-et-Vilaine (35), France

→ *Rhopalosiphum padi*, clone RplA

Collecté en 2012 dans l'Yonne (89), France

1 Taux d'infection : sensibilité / résistance à l'inoculation

- A l'exception du génotype D14497-7 (*Ryd3*), les génotypes *Ryd2* et *Ryd3* testés sont significativement moins sensibles à l'inoculation par le BYDV-PAV4 que la variété sensible Etincel.
- L'analyse comparative des taux de transmission montre que les gènes *Ryd2* et *Ryd3* confèrent un niveau de résistance comparable.
- Les génotypes *Ryd2/Ryd3* présentent des taux d'infection de 5 à 20 fois plus faibles que la variété sensible Etincel et de 3 à 10 fois plus faibles que la variété Amistar (*Ryd2*).

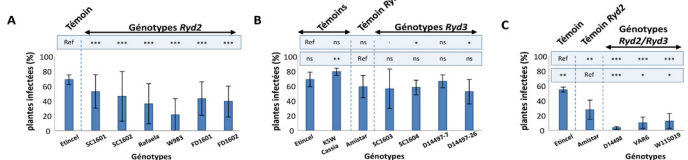


Figure 2. Taux d'infection des différents génotypes *Ryd2* (A), *Ryd3* (B) et *Ryd2/Ryd3* (C). Quatre à six séries de plantes (de 10 à 20 plantes par série) de chaque génotype ont été inocuées (2 pucerons viraux/plante, inoculation pendant 2h). Le pourcentage moyen de plantes infectées, calculé sur la base de données sanitaires (test ELISA réalisé sur les plantes 3 semaines après inoculation), est représenté pour chaque génotype. Les barres verticales noires représentent les écarts-types associés aux données. Le génotype Etincel (sensible à la JNO) ou le génotype Amistar (*Ryd2*) sont utilisés comme témoins (Ref.) pour les analyses statistiques visant à comparer le comportement de chaque génotype *Ryd* vis-à-vis de l'inoculation de l'hôte BYDV-PAV4. Les résultats des analyses statistiques réalisées à l'aide d'un modèle linéaire généralisé en comparant chaque génotype au génotype témoin (Ref.) sont présentés dans les cadres bleus. ** : p<0.01, *** : p<0.005, **** : p<0.001, ***** : p<0.0001.

2 Cinétique d'infection et accumulation virale

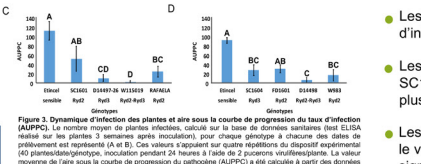
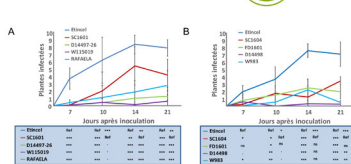


Figure 3. Dynamique d'infection des plantes et titre sous la courbe de progression du taux d'infection (AUPPC). Le nombre moyen de plantes infectées, calculé sur la base de données sanitaires (test ELISA réalisé sur les plantes 3 semaines après inoculation), pour chaque génotype à chacune des dates de prélèvement est représenté (A et B). Ces valeurs s'appuient sur quatre répétitions du dispositif expérimental (40 plantes/dates/génotype, inoculation pendant 2h, test à l'aide de 2 pucerons viraux/plante). La valeur moyenne de l'aire sous la courbe de progression du pathogène (AUPPC) a été calculée à partir des données de chaque répétition (C et D). Les barres noires représentent les écarts-types associés à ces valeurs moyennes d'AUPPC. Le génotype Etincel est utilisé comme Ref. pour les analyses statistiques (cadre bleu). ** : p<0.01, *** : p<0.005, **** : p<0.001, ***** : p<0.0001.

- Les génotypes *Ryd* (sauf FD1601 à J₇) présentent un taux d'infection significativement plus faible qu'Etincel.
- Les AUPPC (taux d'infection) des génotypes *Ryd* (sauf SC1601 (*Ryd2*) et FD1601 (*Ryd2*)) sont significativement plus faibles que celle d'Etincel.
- Les génotypes *Ryd2/Ryd3* accumulent moins efficacement le virus qu'Etincel. De plus, W115019 présente une AUPCC significativement plus faible qu'Etincel (non illustré).

3 Impact de l'âge de la plante à l'inoculation

- Les génotypes *Ryd* se comportent de manière équivalente face à l'inoculation virale quel que soit leur âge à l'inoculation

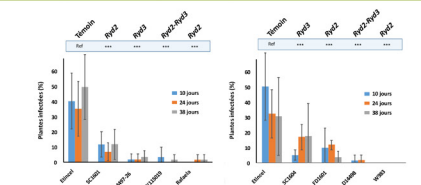


Figure 4. Taux d'infection des différents génotypes *Ryd2* (SC1601, FD1601, Rafaela et W983), *Ryd3* (D14497-26, SC1604) et *Ryd2/Ryd3* (W115019, D14498) inocués à différentes dates après semis. Quatre séries de 15 plantes de chaque génotype ont été inocuées (2 pucerons par plante, inoculation pendant 2h). Le pourcentage moyen de plantes infectées, calculé sur la base de données sanitaires (test ELISA réalisé sur les plantes 3 semaines après inoculation), obtenu pour des plantes inocuées à 10 (bleu), 24 (orange) et 38 (vert) jours après semis est représenté pour chaque génotype. Les barres verticales noires représentent les écarts-types associés aux données. Les résultats des analyses statistiques réalisées à l'aide d'un modèle linéaire généralisé en comparant chaque génotype au génotype témoin 'Etincel' sont présentés dans les cadres bleus. **** : p<0.001.

4 Durée de la période de latence : statut infectieux

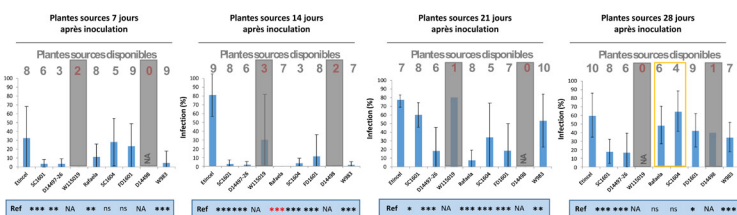


Figure 5. Latence du BYDV-PAV chez l'orge. Pour chaque génotype, 20 plantes (stade 2 feuilles) sont inocuées (2 pucerons/plante, inoculation de 2h) pour constituer des plantes « sources ». A chaque date de la cinétique (7, 14, 21 et 28 jours après inoculation), un sous-ensemble de plantes « sources » (3 plantes/génotype) est utilisé comme matériel pour une inoculation virale (Rhopalosiphum padi pendant 48 heures). Après acquisition, les pucerons sont transférés (2 pucerons/plante) sur des plantes « tests » ou Etincel. Les taux de transmission, calculés sur la base de données sanitaires (test ELISA réalisé sur les plantes 3 semaines après inoculation), obtenus pour chaque date et chaque génotype sont présentés. Les barres verticales noires représentent les écarts-types associés aux données. Les résultats des analyses statistiques réalisées à l'aide d'un modèle linéaire généralisé en comparant chaque génotype au génotype témoin 'Etincel' sont présentés dans les cadres bleus. ** : p<0.01, *** : p<0.005, **** : p<0.001, ***** : p<0.0001, ns, non significatif.

- Le niveau de résistance élevé des génotypes *Ryd2/Ryd3* (W115019 et D14498) empêche le suivi de la sortie de latence pour ces génotypes.
- Etincel acquiert le statut infectieux avant le 14^{ème} jour de l'infection virale.
- Du 7^{ème} au 21^{ème} jour de l'infection, les génotypes *Ryd2* et *Ryd3* sont de moins bonnes sources virales qu'Etincel (sauf SC1604 et FD1601 à J₇).
- Au 28^{ème} jour après inoculation, Rafaela et SC1604 sont des sources de virus de qualité équivalente à Etincel.

Conclusions et perspectives

- Les génotypes *Ryd* présentent une résistance partielle à la JNO illustrée par :
 - Une réduction du taux d'infection,
 - Un ralentissement de la dynamique d'infection virale,
 - Une augmentation la durée de latence des plantes infectées.
- Le pyramidage de *Ryd2* et *Ryd3* augmente le niveau de résistance à la JNO.
- Ces nouvelles connaissances des interactions virus-vecteur-orge (*Ryd*) vont permettre d'orienter au mieux les prochaines étapes de sélection visant à produire des orges résistantes à la JNO.
- L'étude de la durabilité des gènes *Ryd* et de leur spectre d'action vis-à-vis d'autres espèces de BYDV doit à présent être envisagée.

