

RESISTAMICRO :

Comprendre et maîtriser les infections de *Microdochium* spp. pour améliorer la résistance du blé à la « Microdochiose »

Romain VALADE

et

les très nombreux partenaires et collaborateurs

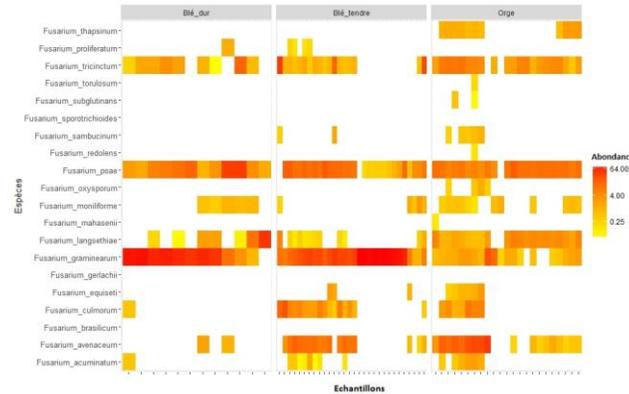
9^{ème} rencontre scientifique du FSOV

04 avril 2023



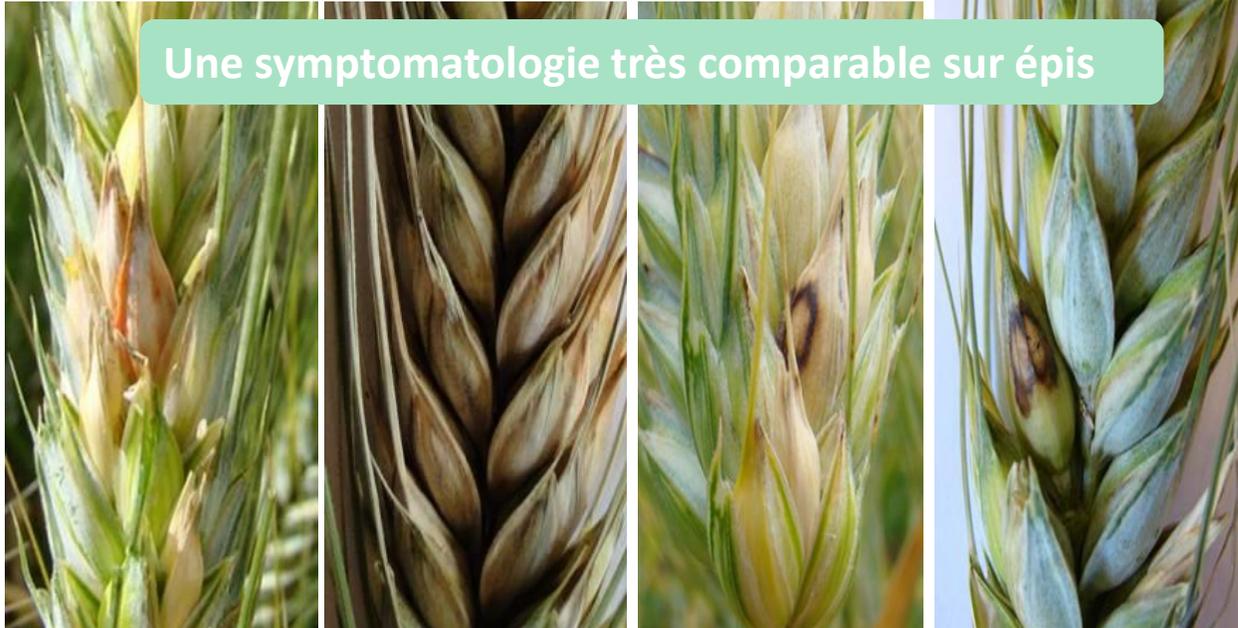
Fusariose de l'épi : une maladie, plusieurs agents pathogènes

- Plus de 19 espèces de *Fusarium*
- Pertes de rendements, de qualité technologique et sanitaire
- *Microdochium* spp.



Boutigny et al., 2019
loos et al., 2004
Valade et al., 2019

Une symptomatologie très comparable sur épis



Symptôme causé par *F. graminearum*

Symptôme causé par *M. majus*

Symptôme causé par *F. langsethiae*

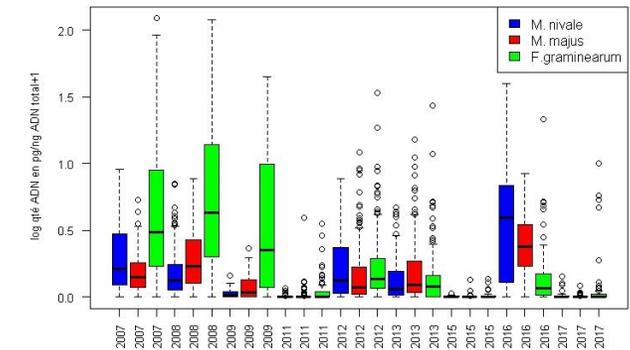
Symptôme causé par *F. tricinctum*

- Et des symptômes foliaires potentiellement très importants certaines années



Des connaissances assez « limitées »

- ✓ **2 espèces: *Microdochium majus* et *Microdochium nivale***
- ✓ **Organes attaqués:** toutes les parties aériennes (fonte des semis → épis)
- ✓ **Différenciation des 2 espèces seulement par des outils moléculaires (PCR, qPCR...)**
- ✓ **Sensibilités des hôtes (Poacées) potentiellement différentes** selon l'espèce et de légères différences de T° optimales → **structure génétique des populations?**
- ✓ **Organes végétatifs préférentiels :** *M. nivale* serait plus responsable de la fonte des semis alors que *M. majus* serait plus agressif sur feuilles et épis
- ✓ **Fréquence sur épis importante en France** → Projet FSOV *Microdochium* and co.
- ✓ **Des facteurs agro-climatiques assez peu connus** → Climat en rang 1?
- ✓ **Résistance variétale?**
 - ✓ Quelques QTL identifiés
 - ✓ Un phénotypage complexe mais de probables différences entre variétés (FSOV *Microdochium*)
- ✓ **Mécanismes d'interactions avec la plante hôte?**



Field Crops Research 191 (2016) 1–12

Contents lists available at ScienceDirect

Field Crops Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fcr

Identification of novel quantitative trait loci for resistance to Fusarium seedling blight caused by *Microdochium majus* and *M. nivale* in wheat

Runsheng Ren^{a,b}, John Foulkes^b, Sean Mayes^b, Xingping Yang^a, Rumiana V. Ray^{b,c,*}

^a Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, 50 Zhongxing Street, Nanjing 210014, PR China
^b Division of Plant and Crop Sciences, School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough, LE12 5RD, UK

ELSEVIER

CrossMark



Le projet RESISTAMICRO

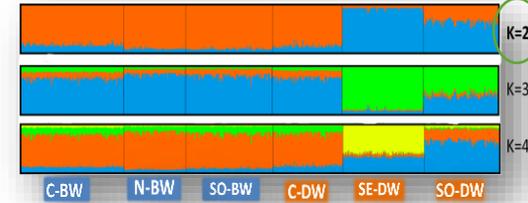
WP1. Caractérisation génétique des populations de *Microdochium* spp. et prédiction du risque

ACTIONS

- Identification des facteurs agro-climatiques à risque.
- Etude de la variabilité des populations de chaque espèce selon l'hôte, les organes, les régions.



Gestion des résidus*	Sensibilité variétale	Pluie à la floraison		
		<10	10-40	>40
Céréales à paille, colza, lin, pois, féverole, tournesol	Peu sensibles			
	Moyennement sensibles			
	Sensibles			
Techniques sans labour ou résidus en surface	Peu sensibles			
	Moyennement sensibles			
	Sensibles			
Betteraves, pomme de terre, soja, autres	Peu sensibles			
	Moyennement sensibles			
	Sensibles			
Techniques sans labour ou résidus en surface	Peu sensibles			
	Moyennement sensibles			
	Sensibles			
Labour ou résidus enfouis	Peu sensibles			
	Moyennement sensibles			
	Sensibles			
Mais et sorgho fourrages	Peu sensibles			
	Moyennement sensibles			
	Sensibles			
Techniques sans labour ou résidus en surface	Peu sensibles			
	Moyennement sensibles			
	Sensibles			
Labour ou résidus enfouis	Peu sensibles			
	Moyennement sensibles			
	Sensibles			
Mais et sorgho grains	Peu sensibles			
	Moyennement sensibles			
	Sensibles			
Techniques sans labour ou résidus en surface	Peu sensibles			
	Moyennement sensibles			
	Sensibles			



Comprendre et maîtriser les infections de *Microdochium* spp. pour améliorer la résistance du blé à la « Microdochiose ».

FSOV RESISTAMICRO

WP2. Mise au point de méthodes de phénotypage robustes

ACTIONS

- Mise au point d'un test en conditions contrôlées: feuilles et épis
- Réseau d'expérimentation de 13 essais par an au champ pour identifier les conditions favorables à l'infection par *Microdochium*



WP3. Interactions blé/*Microdochium* spp.

ACTIONS

- Agressivité et virulence sur feuilles/épis
- Caractérisation du mode d'infection et comparaison avec *F. graminearum* (épis)
- Déterminisme moléculaire de l'interaction



Caractérisation génétique de *Microdochium* spp.

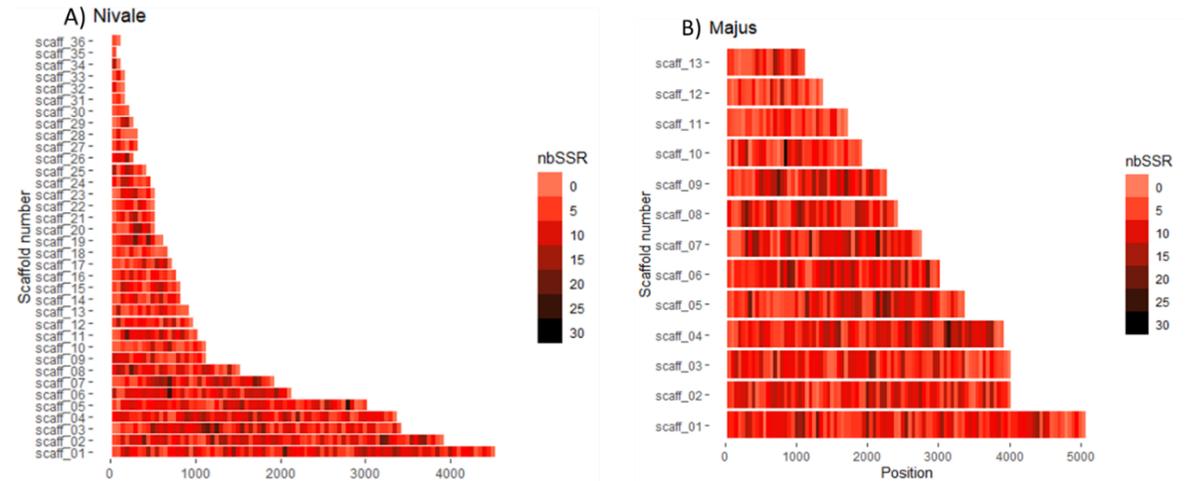
➤ Des nouvelles ressources avec deux génomes de références

	M. nivale [MI18055]	M. Majus [MI18056]
Taille génome (bp)	36 675 401	36 252 715
GC (%)	55	56
Nb scaffolds	36	13
Nb grands scaffolds (>1Mb)	10	13
Nb modèle de gènes avec séquences codantes	15 012	13 285
Nb SSR identifiés	5685	5877
Nb SSR/Mb	154.9	162.3

- ✓ Assemblage des génomes PacBio, consolidés avec les séquences Illumina (collab. J. Gouzy, LIPM Toulouse)
- ✓ Taille et nombre de gènes comparables à *F. graminearum*
- ✓ 12 autres génomes (Illumina) acquis

→ Foulongne-Oriol et al. (in prep)

➤ Des nouvelles ressources avec des marqueurs microsatellites (SSR) pour étudier la structure génétique des populations



	M. nivale (MI 18055)	M. majus (MI 18056)
Nb SSR	5 647	5 927
Densité (nb/Mb)	153	161
Espacement moyen (bb)	6,3	6,3

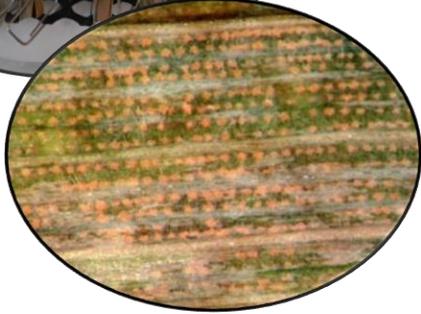
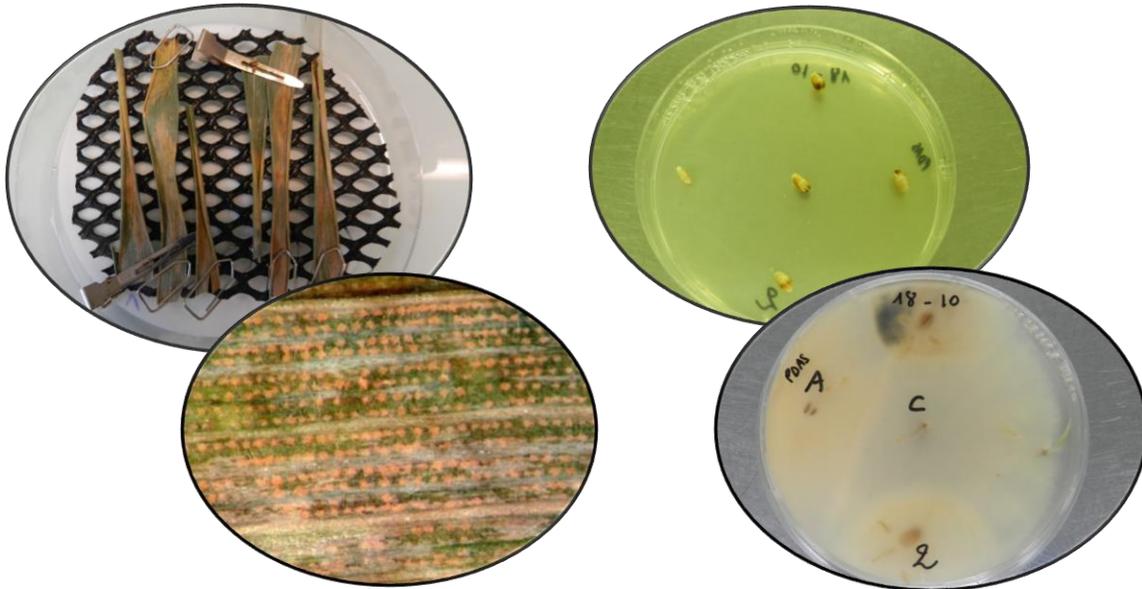
Garcia, 2021

- ✓ 48 SSR sélectionnés par espèce
- ✓ Validation de :
 - ✓ 22 SSR pour *M. majus*
 - ✓ 19 SSR pour *M. nivale*



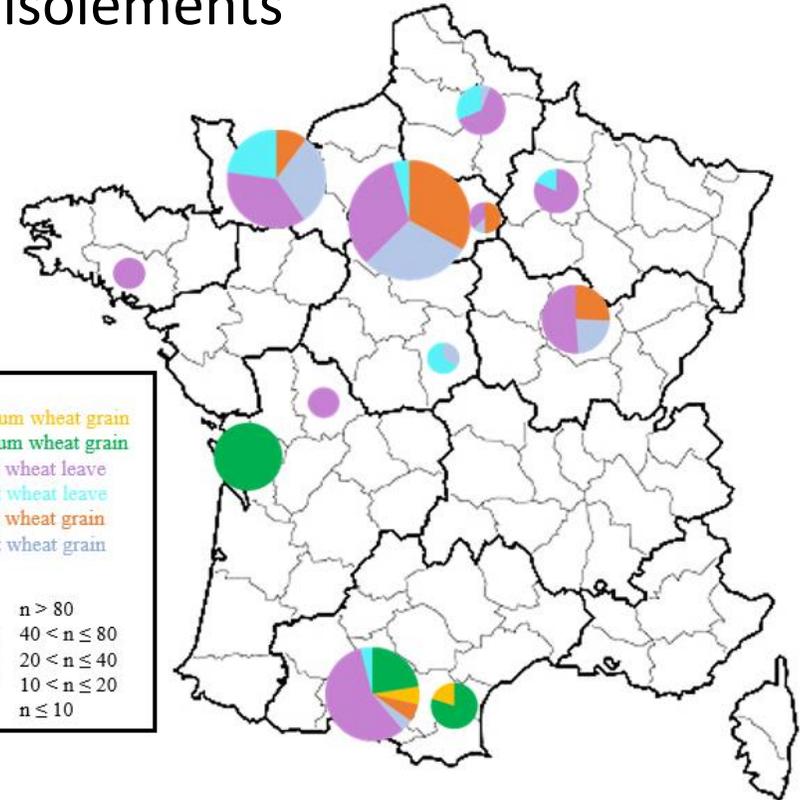
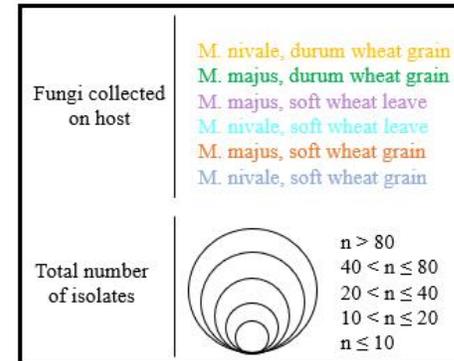
Structuration génétique de *Microdochium* spp.

➤ Un grand effort d'échantillonnage et d'isolements



Echantillons *Microdochium* spp.

	<i>M. majus</i>	<i>M. nivale</i>	Total
Blé dur grain	88	9	97
Blé tendre grain	175	141	316
Blé tendre feuille	209	51	260
Gazon (collab. ANSES)	0	20	20
Total	472	221	693



- Echantillons prélevés entre 2018 et 2020
- Conservation chez ARVALIS et INRAE Mycsa
- Souches génotypées avec les marqueurs SSR



Structuration génétique de *Microdochium* spp.

Caractéristiques des locus microsatellites développés

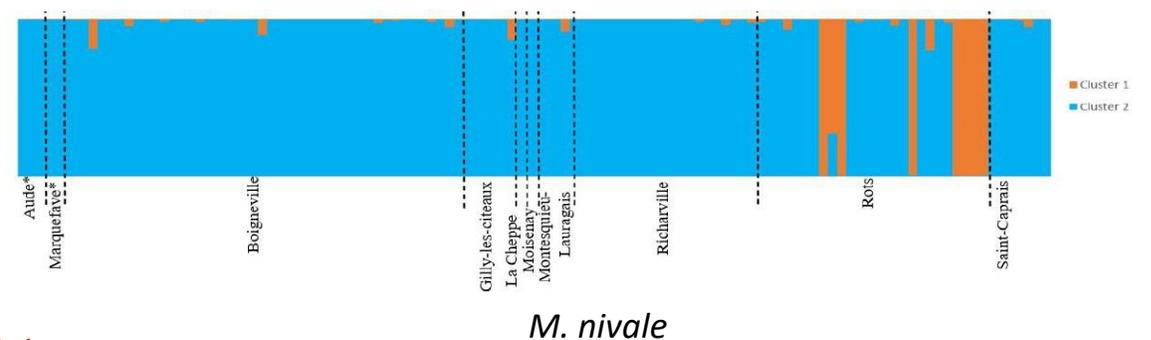
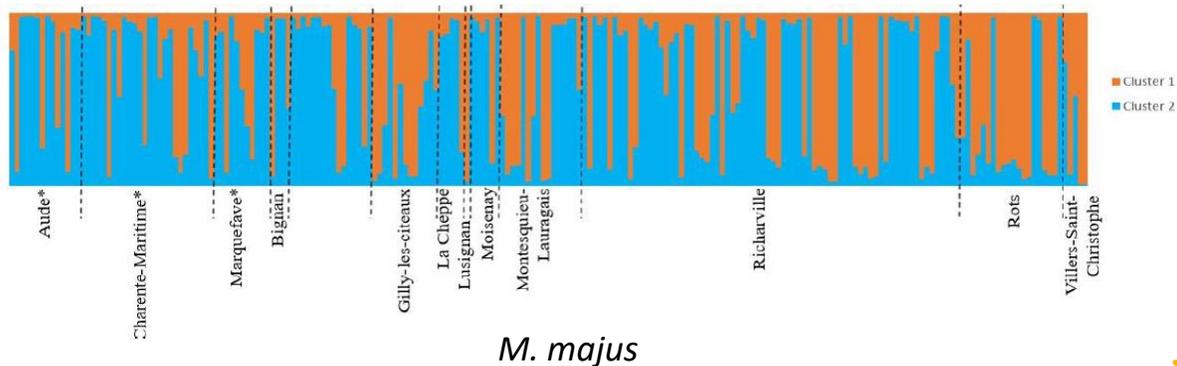
Species	NA	No. alleles	No. supp. alleles	No. allele per locus	Genetic diversity
<i>M. majus</i>	1.2%	122	16	5.7	0.396
<i>M. nivale</i>	0.77%	195	51	8.1	0.463

Une diversité génétique plus importante chez *M. nivale*

Analyse de la clonalité dans les populations

Species	No. individuals	No. unique genotypes	No. clonal genotypes	Clonality
<i>M. majus</i>	450	242	76	31%
<i>M. nivale</i>	198	155	24	15%

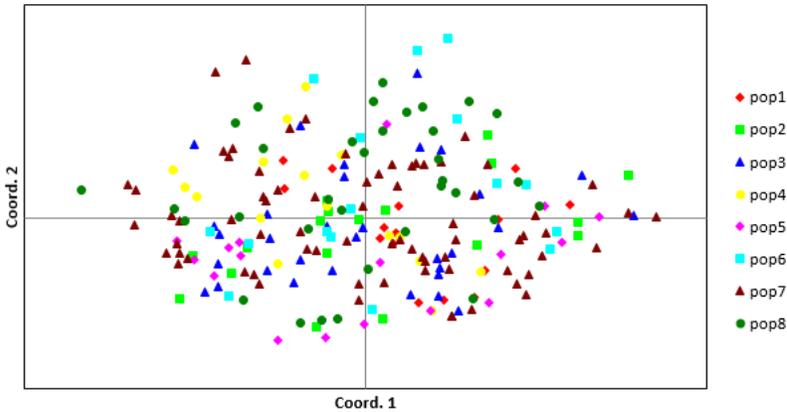
Pas de structuration évidente : vers une métapopulation pour chacune des espèces ?



Structuration génétique de *Microdochium* spp.

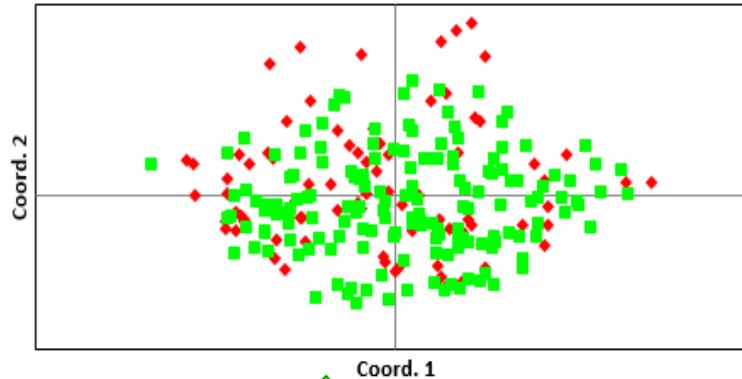
Est-ce qu'il existe une différenciation des populations liées à la région ?

M. majus ❌



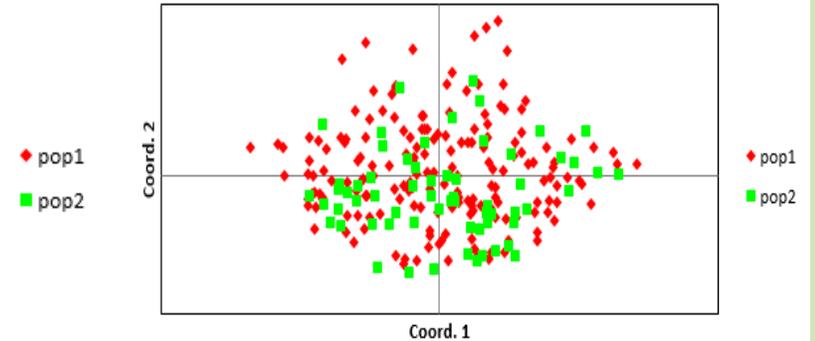
Est-ce qu'il existe une différenciation des populations liées à l'organe ?

M. majus ✅

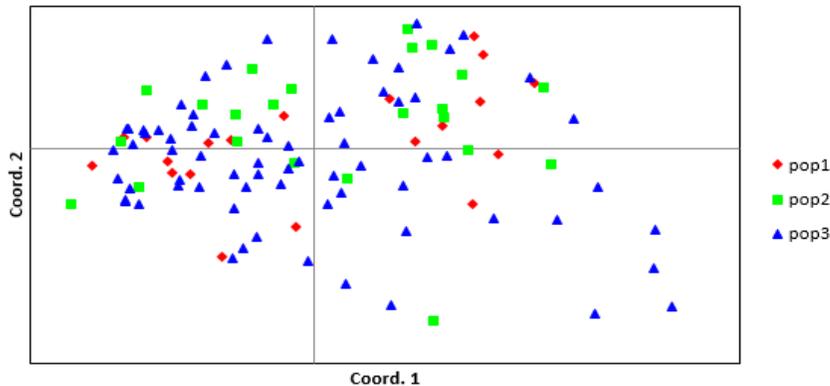


Est-ce qu'il existe une différenciation des populations liées à l'hôte ?

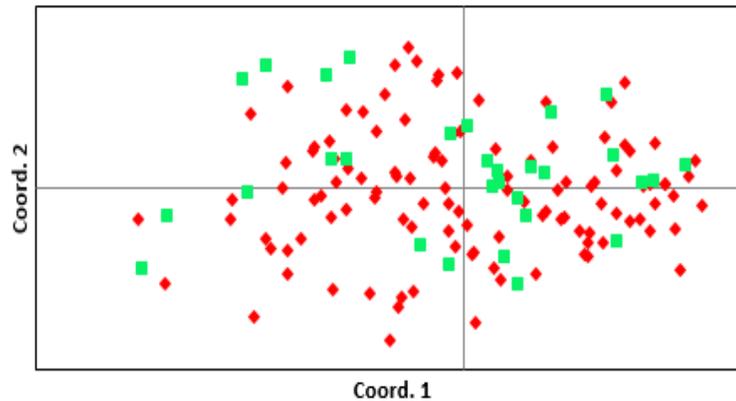
M. majus ❌



M. nivale ✅



M. nivale ✅



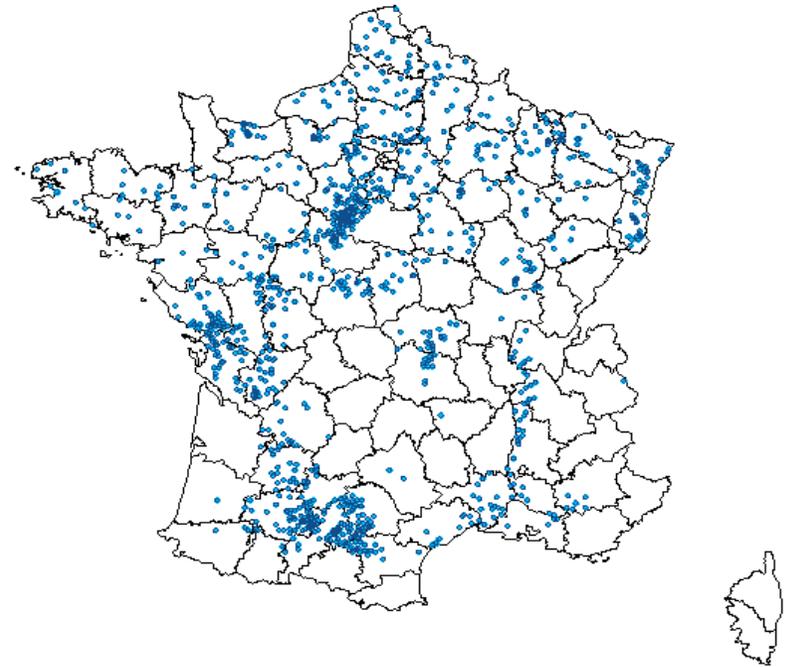
→ Une différenciation génétique faible mais une possible structuration génétique selon les facteurs étudiés?



Epidémiologie et prédiction du risque

- Etude à partir de données d'enquêtes + échantillons (*FAM/ARVALIS*)
 - 150-175 échantillons par an entre 2018 et 2021
 - Analyses moléculaires qPCR pour quantifier *M. majus*, *M. nivale*, *F. graminearum*
 - Reprise de données antérieures
 - Test de plusieurs variables climatiques et de pratiques (méthode *Random Forest*, suppression des variables très corrélées, travail avec le log).
-
- Quelles variables expliquent la quantité d'ADN de *Microdochium* spp ? (et *F. graminearum*)

Localisation des parcelles enquêtes agriculteurs 2007-2021



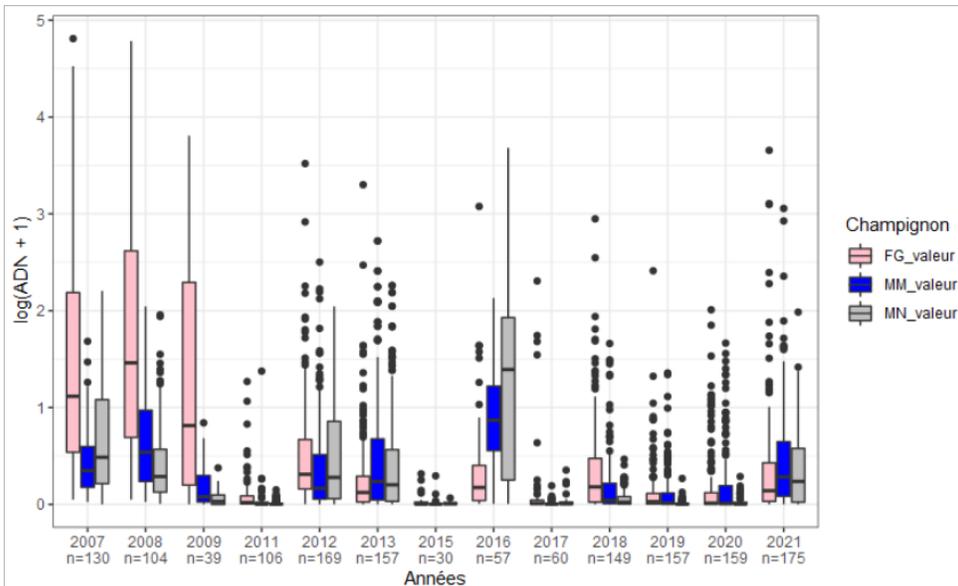
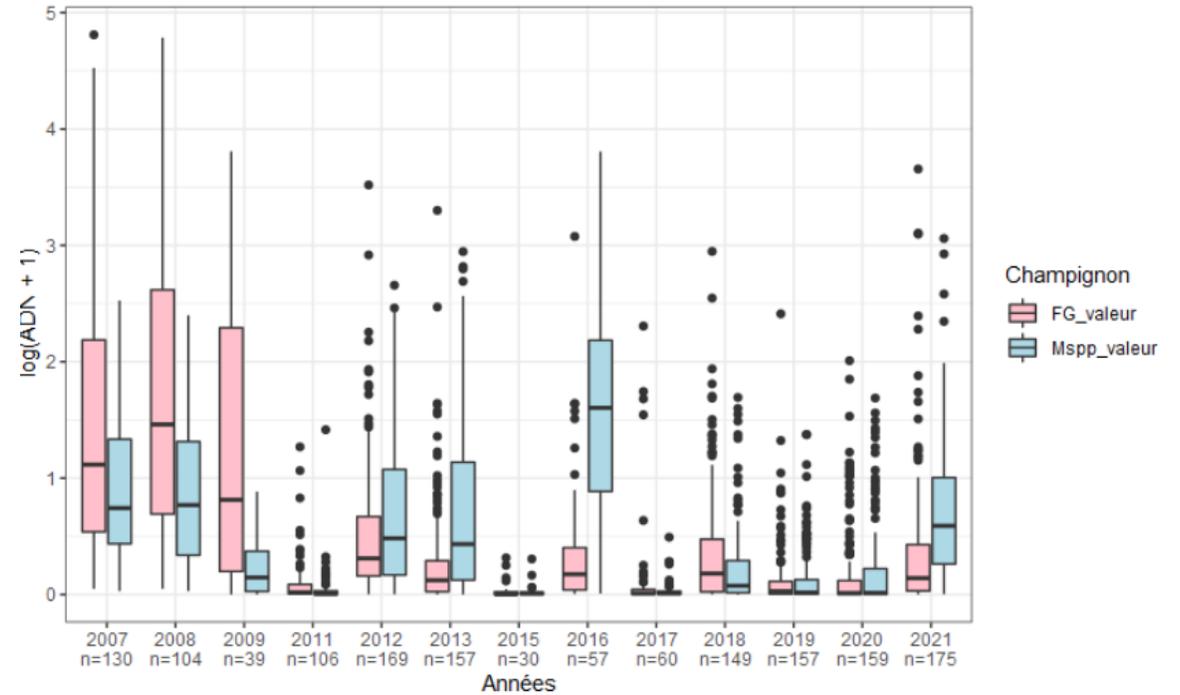
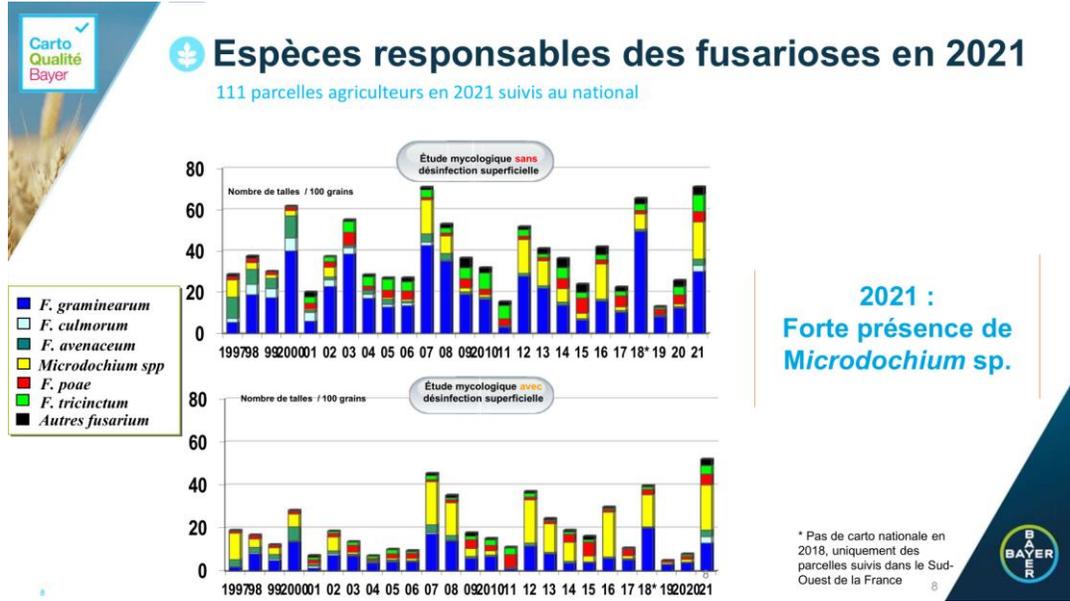
N = 1640 échantillons prélevés dans des parcelles blé tendre et blé dur

Source des données :

projets ANR DON&Co et CASDAR ECOFUSA, FSOV MICRODOCHIUM et RESISTAMICRO



Epidémiologie et prédiction du risque



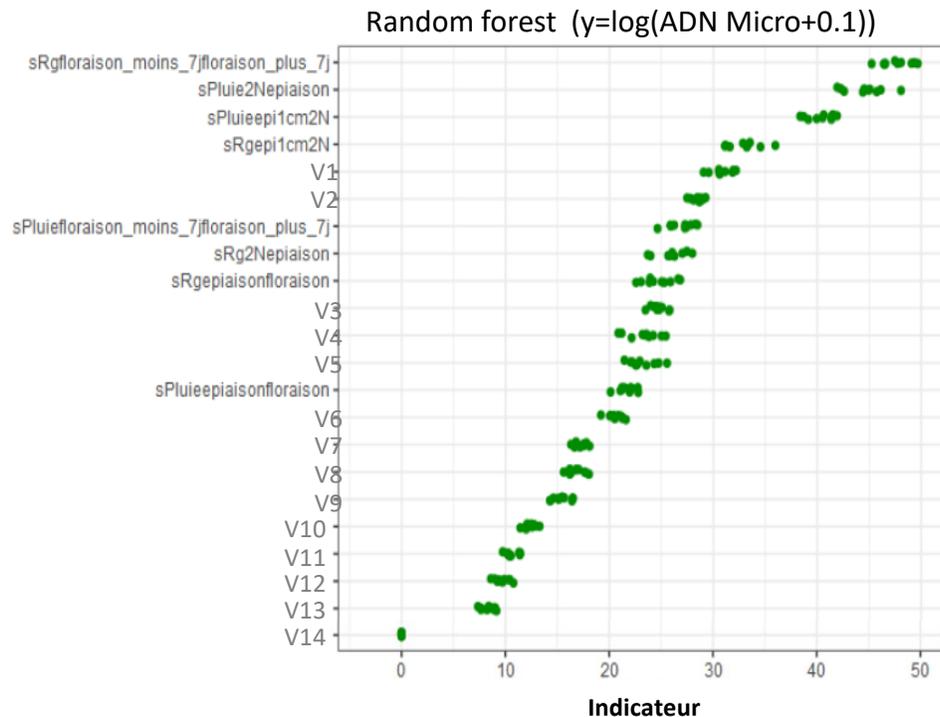
- *Microdochium spp.* est une composante majeure de la flore de l'épi
- Concomitance avec d'autres espèces dont *F. graminearum* → complexe d'espèces
- 1 année sur 2 avec une fréquence significative de *Microdochium spp.* dont 2021 (dernière année d'essai du projet)
- *M. majus* > *M. nivale* mais forte corrélation entre les deux espèces ($R^2 = 0.66$)



Epidémiologie et prédiction du risque

➤ Importance des variables testées pour *Microdochium* spp. ?

- Nombreuses variables agro-climatiques testées
- BDD et méthode d'analyse « validée » sur *F. graminearum*:
 - ✓ Note grille de risque en 1^{ère} variable explicative
 - ✓ Note DON
 - ✓ Pluie à floraison



Gestion des résidus*	Sensibilité variétale	Risque	Pluie (mm) autour de la floraison (+/- 7 jours)		
			<10	10-40	>40
Céréales à paille, colza, lin, pois, féverole, tournesol	Labour ou résidus enfouis	Peu sensible			
	Techniques sans labour ou résidus en surface	Moyennement sensible			
		Sensible			T
					T
Betteraves, pomme de terre, soja, autres	Labour ou résidus enfouis	Peu sensible			
	Techniques sans labour ou résidus en surface	Moyennement sensible			
		Sensible			T
					T
Maïs et sorgho fourrages	Labour ou résidus enfouis	Peu sensible			
	Techniques sans labour ou résidus en surface	Moyennement sensible			
		Sensible			T
					T
Maïs et sorgho grains	Labour ou résidus enfouis	Peu sensible			
	Techniques sans labour ou résidus en surface	Moyennement sensible			
		Sensible			T
					T

ARVALIS-Institut du végétal 2011

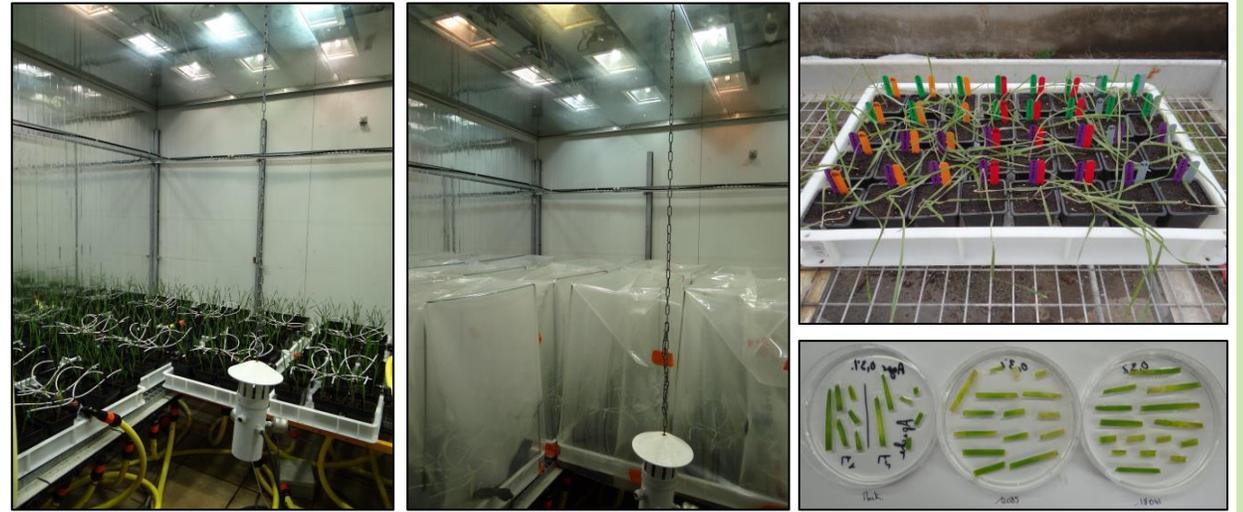
- ➔ Parmi les variables les plus explicatives, on retrouve : **la pluviométrie** et le **rayonnement global** (entre floraison et maturité).
- ➔ *Microdochium nivale* est sensible au rayonnement UV-A qui correspond à 95% du rayonnement UV *Newsham et al., 1997*.
- ➔ **Pas de variables agronomiques** explicatives de la présence de *Microdochium*
- ➔ Travaux engagés sur des modèles décisionnels, relation entre *F. graminearum* et *Microdochium* spp., ...



Des méthodes de phénotypage des cultivars?

En conditions contrôlées → Tests sur plantules

- **Nombreuses modalités d'infection testées**
 - ✓ Concentrations d'inoculum variables (spores, hyphes)
 - ✓ Conditions d'application variables (pinceaux, infiltrations, feuilles trempées, feuilles coupées, ...)
 - ✓ Conditions hygrométriques et de températures différentes
 - ✓ 2 espèces testées



- **Méthode la plus prometteuse:**
 - ✓ Feuilles attachées
 - ✓ Grosses gouttelettes
 - ✓ Coupées/trempées
 - ✓ Bâchage pendant 7 jours
 - ✓ Mesure de longueurs de symptômes → Différences observées entre variétés mais « test préliminaire »
 - ✓ Méthode « fastidieuse »



Accession	Longueur des symptômes (cm)
Obelisk	1,6
Nogal	0,5
Taischung	2,7
Cellule	0,6
Courtot	2
Lyrik	0,4
Charger	0,9
Rubisko	2,7
Chevignon	0,5
Pocho	5



Des méthodes de phénotypage des cultivars?

Aux champs

➤ **Objectif:** Trouver une méthode de phénotypage robuste et reproductible

➤ **M&M:**

- 13 essais en 2018/2019 et 2019/2020
 - 4 témoins: Apache, Caméléon, Premio, Sothys CS
 - 8 modalités par site dont 1 modalité non inoculée
 - 1 à 3 applications
 - Stades d'application : DFE, épiaison, floraison, ...
 - Bâchage ou non
 - Concentration inoculum
 - Brumisation/irrigation
 - Fongicide spécifique à *F. graminearum*
- ➔ *Plus de 30 modalités différentes testées!*



N° de modalités	Modalités 2018/2019	AO	CS	DSV	FD	GEVES	KWS	LD	LG	RAGTzn	ASUR	Secobra	Syngenta	Unisigma	Nombre de sites
1	1 témoin non inoculé dans tous les essais	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13
2	M. majus * 3 applications (DFE + mi-épiaison + mi-floraison) avec bâchage	1		1	1		1	1	1	1			1		8
3	M. nivale * 3 applications (DFE + mi-épiaison + mi-floraison) avec bâchage	1		1	1		1	1	1	1			1		8
4	M. majus * 3 applications (DFE + mi-épiaison + mi-floraison) sans bâchage		1			1			1	1	1	1		1	7
5	M. nivale * 3 applications (DFE + mi-épiaison + mi-floraison) sans bâchage		1			1			1	1	1	1		1	7
6	M. majus * 3 applications (DFE + mi-épiaison + mi-floraison) sans bâchage + fongicide (tebuconazole: ex Horizon EW)			1							1	1		1	4
7	M. nivale * 3 applications (DFE + mi-épiaison + mi-floraison) sans bâchage + fongicide (tebuconazole: ex Horizon EW)			1							1	1		1	4
8	M. majus * 3 applications (DFE + mi-épiaison + mi-floraison) avec bâchage + fongicide (tebuconazole: ex Horizon EW)	1			1		1						1		4
9	M. nivale * 3 applications (DFE + mi-épiaison + mi-floraison) avec bâchage + fongicide (tebuconazole: ex Horizon EW)	1			1		1						1		4
10	Cocktail de souches 1*M. majus + 1*M. nivale (2 applications à DFE + mi-floraison) avec bâchage	1			1		1	1	1	1					6
11	Cocktail de souches 1*M. majus + 1*M. nivale (2 applications à DFE + mi-floraison) avec bâchage + fongicide	1			1		1						1		4
12	Cocktail de souches 1*M. majus + 1*M. nivale (2 applications à DFE + mi-floraison) sans bâchage		1	1		1		1	1	1		1		1	8
13	Cocktail de souches 1*M. majus + 1*M. nivale (2 applications à DFE + mi-floraison) sans bâchage + fongicide		1	1							1	1		1	5
14	Cocktail de 2 souches avec 2 applications à début floraison et fin floraison sans bâchage		1			1					1		1		4
15	Cocktail de 2 souches avec 2 applications à début floraison et fin floraison avec bâchage	1			1		1	1	1	1					6
16	Cocktail de 2 souches avec 2 applications à début floraison et fin floraison sans bâchage + fongicide		1	1									1	1	5
17	Cocktail de 4 souches (2*2) à mi-floraison sans bâchage (1 application)		1			1		1			1				4
18	Cocktail de 4 souches (2*2) en 2 applications à DFE + mi-floraison sans bâchage					1									1
19	Cocktail de 4 souches (2*2) en 2 applications à DFE + mi-floraison avec bâchage							1							1
20	Cocktail de souches 1*M. majus + 1*M. nivale (2 applications à DFE + mi-floraison) sans bâchage. Inoculum + important						1								1
	total	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	104

➤ **Notations feuilles et épis**

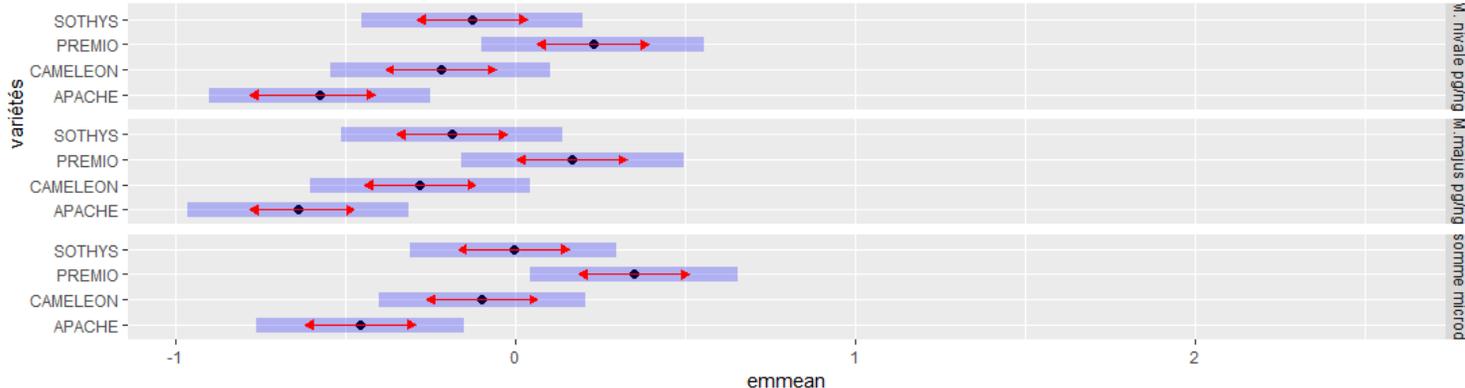
➤ **Prélèvements de grains pour analyses qPCR (*M. majus*, *M. nivale* et *F. graminearum*)**



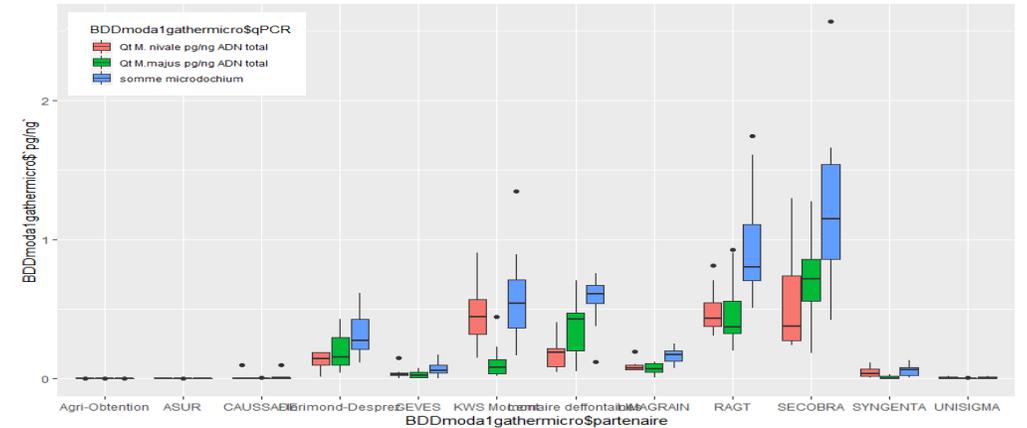
Des méthodes de phénotypage des cultivars?

Aux champs: principaux résultats

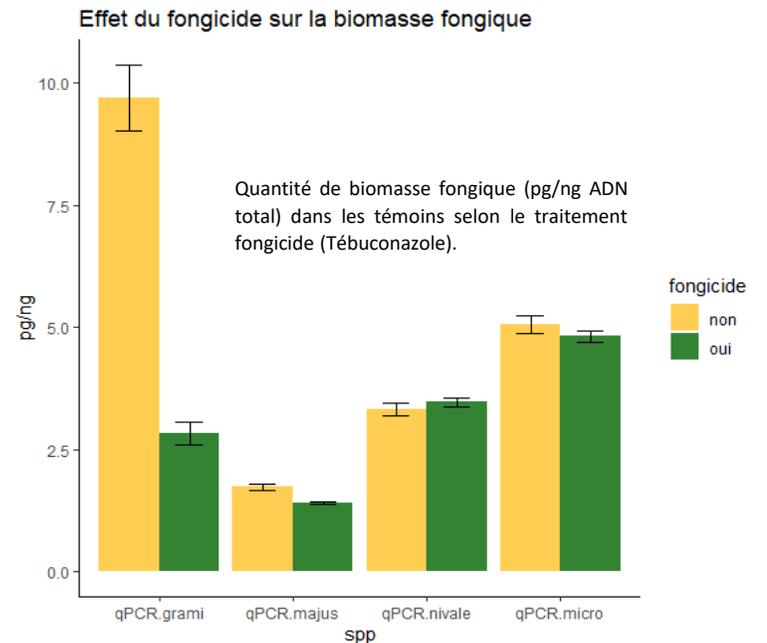
- Effet « brumisation » très important → grande quantité d'eau/multiplier les cycles (ex: 8 fois par jour pendant 14min)
- Eviter des précédents maïs → + de *F. graminearum*...
- Utiliser un fongicide spécifique de *F. graminearum* → Notations épis
- Inoculations encadrant la floraison les plus efficaces
- Effet du bâchage non significatif dans nos données mais option à conserver
- Essais 2018/2019 > Essais 2019/2020 → Fort impact du climat
- Classement « attendu » des témoins



Moyenne ajustée de la quantité d'ADN de *F. graminearum*, *M. majus*, *M. nivale*, *Microdochium* spp. dans les grains des 4 variétés témoins dans les 13 sites de 2018/2019. Pour chaque quantité, Apache est plus résistante que le groupe Sothys/Cameleon lui-même étant moins sensible que Premio.

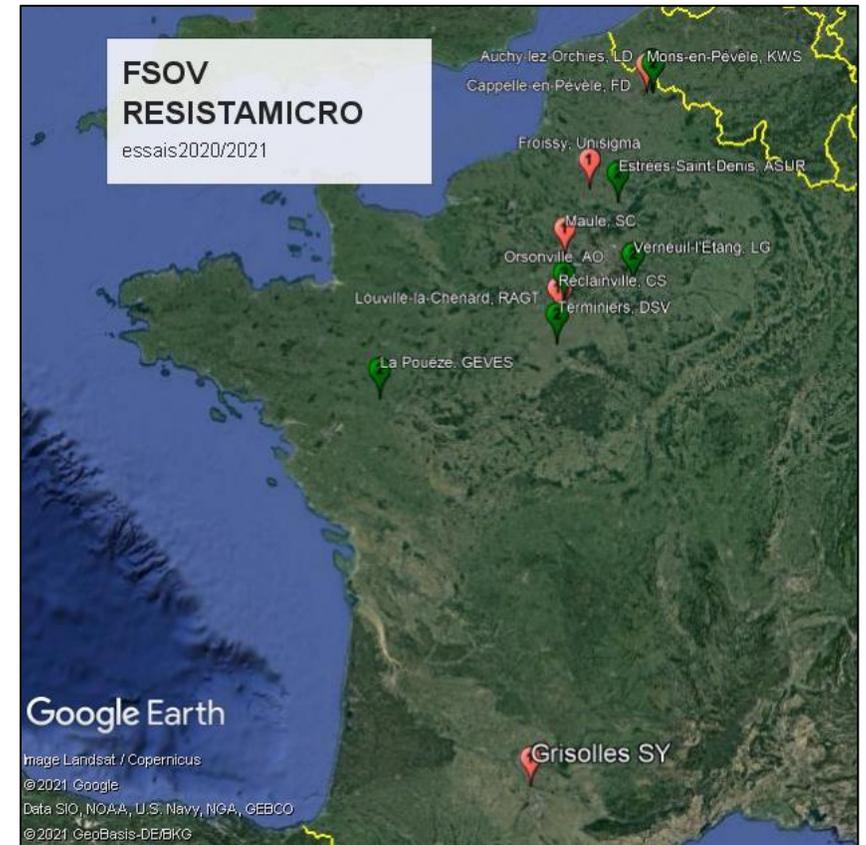


Quantité d'ADN de *Microdochium* dans les grains des 4 variétés témoins par site en 2018/2019.

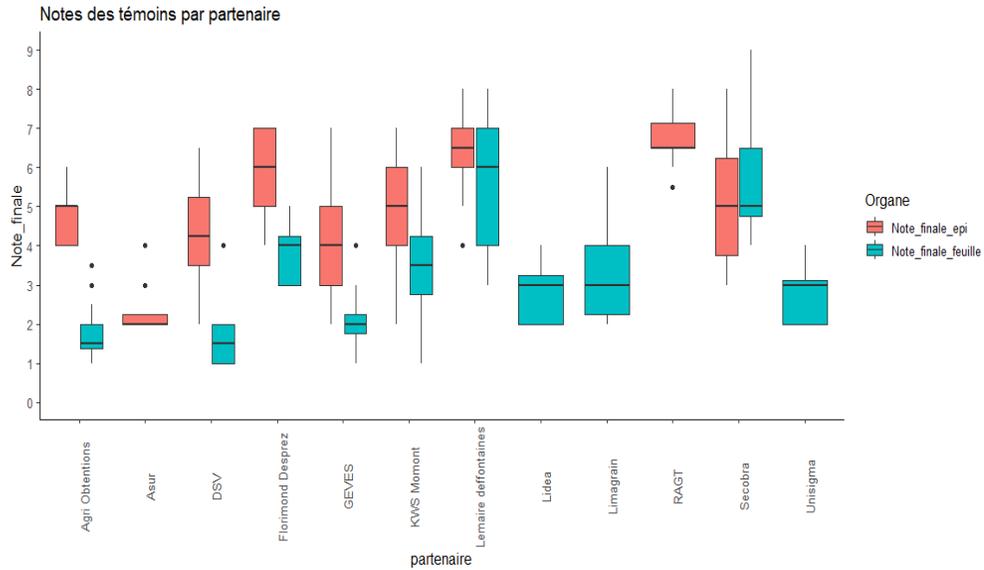


Des sensibilités variétales différentes?

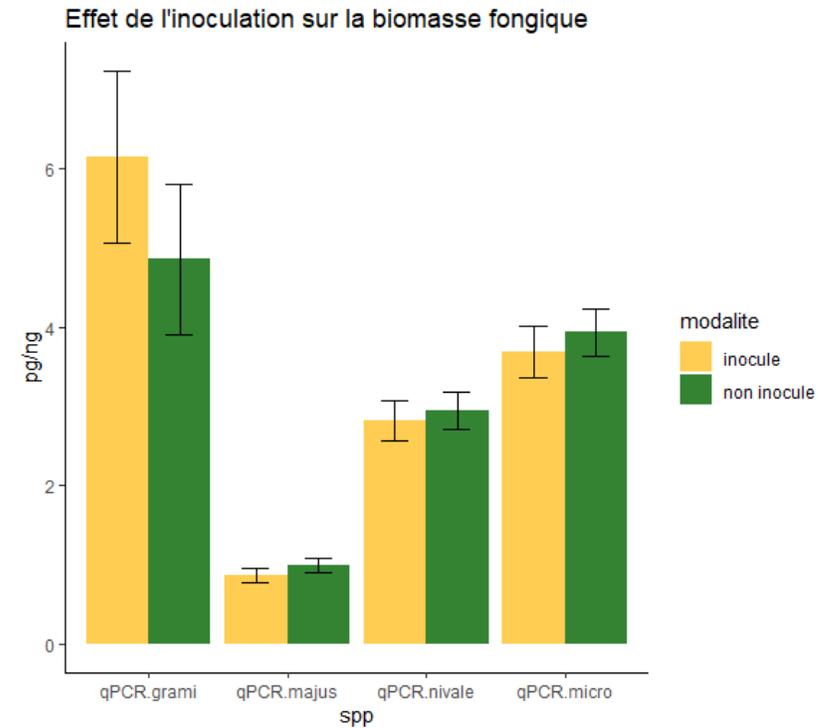
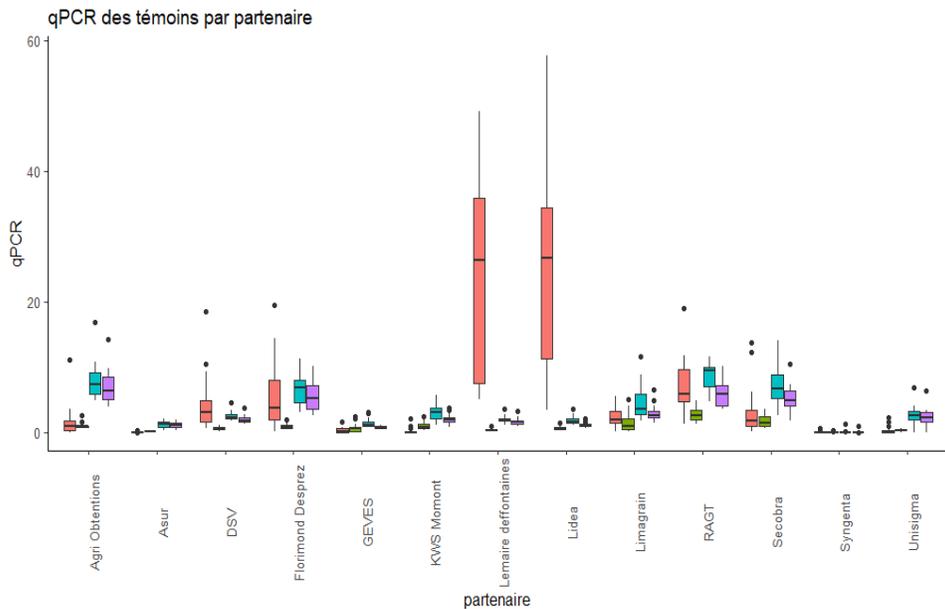
- **13 sites en 2020/2021**
- **42 variétés réparties en 2 panels**
 - 6 sites pour le panel 1
 - 7 sites pour le panel 2
- 4 témoins identiques dans les 2 panels
- 25 variétés par site
- **2 modalités:**
 - Inoculée (DFE, début floraison et fin floraison)
 - Non inoculée
- 2 répétitions par modalité
- Traitement fongicide quand possible
- 3 lignes
- **Notations feuilles et épis**
- **Prélèvements de grains pour analyses qPCR (*M. majus*, *M. nivale* et *F. graminearum*)**



Des sensibilités variétales différentes?



- 8 sites avec une pression significative sur les épis des témoins
- Notations feuilles également réalisées
- Majorité des sites avec du *Microdochium* spp. excepté les sites sans traitement fongicide

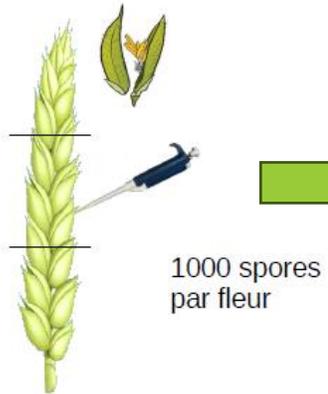


➔ Pression naturelle liée à « l'environnement »: climat + dispositif

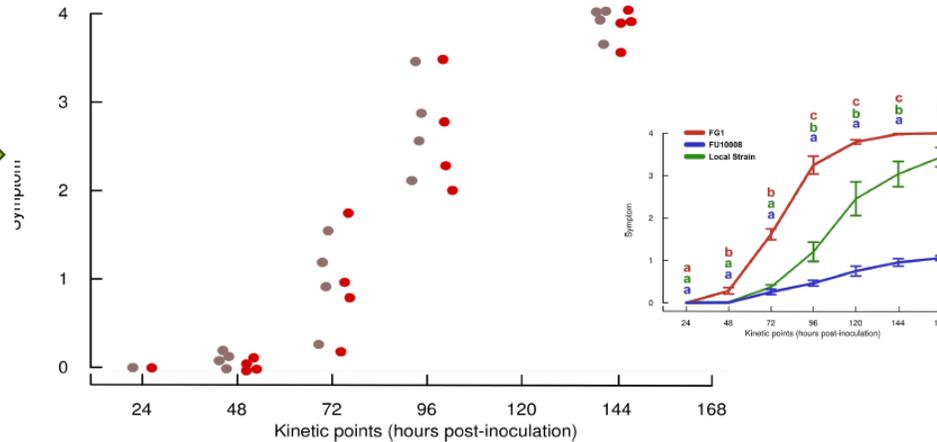


Interactions plante-pathogène

- Tests de l'agressivité d'isolats de *Microdochium* sur épis
- Etude des réponses protéomiques de l'infection et comparaison avec *F. graminearum* (Fabre et al., 2019)



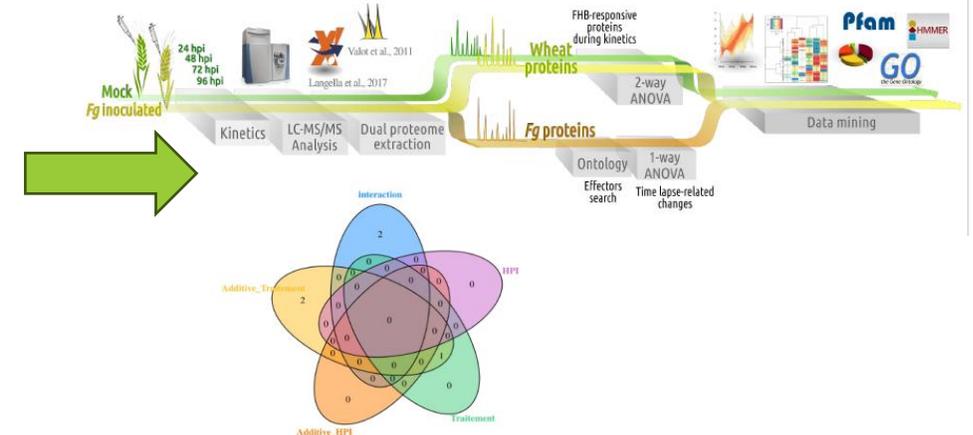
M majus 18056
M nivale 12085



- Inoculation dans la cavité florale

- Typologie de symptômes proches de *F. graminearum*
- Dynamique comparable mais variance plus forte

Dual proteome
Protocole FHB (Fabre et al., 2019) → ~5500 protéines du blé et ~1100 protéines fongiques)



- 6000 protéines de blé comparables avec *F. graminearum*
- Seulement 300 protéines fongiques et essentiellement des protéines histones/ribosomiques
- Des symptômes visibles mais peu de biomasses fongiques?

→ De nouvelles expérimentations lancées post-projet
→ Analyses génomiques et pangénomiques en cours



Conclusions et perspectives

- **De nouvelles ressources** utiles pour l'ensemble de la communauté nationale et internationale: génomes, populations, marqueurs génétiques, ...
- Une meilleure connaissance de la **structure génétique des populations** → Caractériser d'autres populations : gazon, autres céréales, ...
- Des facteurs « **agro-climatiques** » à risque précisés → Vers une valorisation opérationnelle?
- Des méthodes de phénotypage améliorés mais une maladie qui reste difficile à phénotyper
- Du progrès génétique possible → Cible prioritaire?
- Vers une meilleure compréhension de l'interaction blé/*Microdochium* spp.?



Remerciements



Christophe GIGOT

Cindy VITRY

Stéphanie LE PRIEUR

Marie-Laure DELARUE



Marie FOULONGNE-ORIOU

Marie-Anne GARCIA



Cyrille SAINTENAC

Ludovic BONHOMME



Laure DUCHALAIS



Edouard PENEZ



Julien RATET



Jean-Philippe MAIGNIEL

Valérie CADOT



Sylvain CHOMBART



Philippe MOMONT



Anne-Charlotte LOMBART



Sylvie DUTRIEZ



Constance LAVERGNE



Gabriel BEUDIN



Romain LAMERAND



Hugo MUSSET



Auberi AVALLE

Et tous les collègues impliqués dans le projet



