

# DivR : Des outils moléculaires pour la sélection de résistances diversifiées et efficaces contre la septoriose du blé

Thierry C. MARCEL<sup>1\*</sup>, Gwilherm GAZEAU<sup>1</sup>, Hadjer BELLAH<sup>2</sup>, Jean-Noël THAUVIN<sup>3</sup>, Sandrine GELISSE<sup>1</sup>, Emmie DZIALO<sup>1</sup>, Adeline SIMON<sup>1</sup>, Reda AMEZROU<sup>1</sup>, Ellen GOUEMAND<sup>4</sup>, Benoit FOUCAULT<sup>5</sup>, Nicholas BIRD<sup>6</sup>, Gemma MOLERO MILAN<sup>5</sup>, Sébastien CAIVEAU<sup>7</sup>, Alexander LOLADZE<sup>7</sup>, Andrea SÁNCHEZ-VALLET<sup>8</sup>, Daniel CROLL<sup>2</sup>, Cyrille SAINTENAC<sup>3</sup>

1 - Université Paris-Saclay, INRAE, UR BIOGER, Palaiseau, FRANCE

2 - University of Neuchâtel, Laboratory of Evolutionary Genetics, Neuchâtel, SWITZERLAND

3 - UCA, INRAE, GDEC, Clermont-Ferrand, FRANCE

4 - Florimond-Desprez Veuve & Fils SAS, Cappelle-en-Pévèle, FRANCE

5 - KWS, Momont Recherche, Mons-en-Pévèle, FRANCE

6 - KWS UK Ltd, Thriplow, Hertfordshire, UNITED KINGDOM

7 - Syngenta France SAS, Le Jardin des Entreprises, Chartres, FRANCE

8 - CBGP, UPM-INIA, Campus de Montegancedo UPM, Pozuelo de Alarcón, Madrid, SPAIN

\*Coordinateur : Thierry C. MARCEL, [thierry.marcel@inrae.fr](mailto:thierry.marcel@inrae.fr)

## 1 Introduction

La septoriose, causée par le champignon hémibiotrophe *Zymoseptoria tritici*, est une maladie très nuisible affectant les cultures de blé tendre, mais aussi de blé dur et de triticales. Sur blé tendre, elle se rencontre sur tout le territoire avec une pression plus élevée dans la moitié Nord et l'Ouest du pays. Sa nuisibilité annuelle est très variable selon l'année et oscille entre 11 et 25 qx/ha, et peut monter jusqu'à 50 qx/ha en cas de variété sensible et d'année favorable au développement de la maladie (source : Arvalis-Institut du Végétal). La lutte contre la septoriose reste largement assurée par les traitements fongicides. Cependant, cette lutte chimique devient difficile à mener en raison de l'apparition et de la généralisation de souches résistantes aux molécules utilisées, mais aussi à cause de la nécessité de réduire l'usage des pesticides en agriculture. Face à ces évolutions, l'alternative consiste à sélectionner de nouveaux cultivars plus résistants ou tolérants à la septoriose. Toutefois, la caractérisation du niveau de résistance du blé vis-à-vis de la septoriose ainsi que sa sélection restent difficiles. Ces difficultés résident notamment dans notre méconnaissance de la plupart des gènes de résistance présents dans nos variétés ainsi que de la complexité à surveiller l'évolution de l'efficacité de ces gènes vis-à-vis des populations de septoriose.

*Z. tritici* est un champignon filamenteux soumis aussi bien à la reproduction sexuée, dont les ascospores se dispersent par le vent, qu'à la reproduction asexuée dont les pycnidiospores se dispersent par éclaboussures dues à la pluie (Cohen & Eyal, 1993 ; Suffert & Sache, 2011). Son mode de reproduction sexuée est hétérothallique, c'est-à-dire que deux souches de types sexuels opposés doivent se rencontrer pour que la reproduction sexuée soit réalisée (Waalwick *et al.* 2002 ; Suffert *et al.* 2016, 2019 ; Kema *et al.*, 2018). Ce double mode de reproduction fait que ce champignon a une capacité d'évolution adaptative très importante qui se traduit par une forte spécificité vis-à-vis de son hôte et le contournement rapide des résistances variétales (McDonald *et al.*, 2015). Un des exemples les plus récents de contournement de résistance par

*Z. tritici* est la variété de blé tendre Cellule, porteuse du gène de résistance *Stb16q* (Kildea *et al.*, 2020). Deux phases se distinguent nettement dans le processus infectieux de *Z. tritici* : une première phase asymptomatique relativement longue suivie d'une phase de nécrotrophie aboutissant à la sporulation du champignon (Palmer & Skinner 2002 ; Sanchez-Vállet *et al.* 2015). La transition entre la phase asymptomatique et la phase de nécrotrophie est accompagnée par une reprogrammation complexe de la transcription chez *Z. tritici*, impliquant notamment la surexpression de nombreux gènes encodant des petites protéines secrétées de fonction inconnue (Palma-Guerrero *et al.* 2015 ; Rudd *et al.*, 2015). Ces petites protéines secrétées sont caractéristiques des effecteurs fongiques dont le rôle est de supprimer les défenses de la plante et d'en altérer la physiologie afin de permettre l'infection (Selin *et al.*, 2016). Les effecteurs sont les déterminants de la virulence, c'est-à-dire de la capacité du pathogène à infecter et coloniser son hôte. Toutefois, certains de ces effecteurs peuvent également avoir un rôle d'avirulence lorsqu'ils sont reconnus par un gène de résistance de la plante entraînant une réaction de défense de celle-ci. L'analyse du génome de la souche *Z. tritici* IPO-323 a permis d'identifier 492 gènes ayant les caractéristiques classiques de ces effecteurs (Do Amaral *et al.*, 2012), mais le répertoire d'effecteurs est généralement très variable entre individus d'une même espèce (Karasov *et al.*, 2014 ; Hartmann & Croll, 2017). Cette variabilité dans le répertoire d'effecteurs ainsi que la variabilité de séquence de ces effecteurs expliquent en grande partie la spécificité de l'efficacité des résistances variétales vis-à-vis des souches de l'agent pathogène. Ces dernières années, plusieurs gènes d'avirulence expliquant la spécificité des souches de *Z. tritici* vis-à-vis des gènes de résistance présents dans les variétés de blé ont été identifiés, notamment *AvrStb6* (Zhong, *et al.* 2017), *Avr3D1* (Meile *et al.*, 2018), *AvrStb9* (Amezrou *et al.*, 2023) et *AvrStb20q* (Langlands-Perry *et al.*, 2023). Ces avancées ouvrent la voie vers le suivi de l'évolution des virulences au sein des populations de *Z. tritici*.

Une meilleure connaissance des gènes de résistance présents dans les variétés de blé cultivées est aussi essentielle pour mieux comprendre ces évolutions et



déterminer les virulences qu'il est le plus important de surveiller. En comparaison à d'autres maladies foliaires comme les rouilles et l'oïdium, le nombre de gènes de résistance à la septoriose cartographié chez le blé est beaucoup moins grand. Un total de 23 gènes majeurs de résistance ainsi que 89 méta-QTLs ont été identifiés et recensés dans des accessions de blé d'origine très diverses (Brown *et al.* 2015 ; Yang *et al.*, 2018 ; Langlands-Perry *et al.*, 2022). Seuls les gènes *Stb4* (Apache), *Stb6* (nombreux cultivars), *Stb9* (Courtot), *Stb11* (Apache), *Stb15* (Arina et Riband), *Stb16q* (Cellule), *Stb18* (Balance) et *Stb20q* (Renan) ont été identifiés dans des variétés cultivées en Europe (Arraiano *et al.* 2006, 2007 ; Chartrain *et al.* 2009 ; Ghaffary *et al.* 2011 ; Saintenac *et al.*, 2021 ; Langlands-Perry *et al.*, 2022). Il est difficile de savoir si les autres 14 gènes *Stb* connus sont présents dans les variétés cultivées en France car il n'existe aucun marqueur diagnostique pour ces gènes. Afin de pallier à ces difficultés, le projet FSOV 2018 S DivR avait pour objectif le développement d'outils de marquage moléculaire des gènes de résistance présents dans les variétés de blé tendre françaises et de suivi des populations fongiques.

## 2 Matériel et méthode

### ► Matériel fongique et végétal

L'unité INRAE BIOGER est impliquée dans le suivi de la population française de *Zymoseptoria tritici* pour l'évolution des résistances aux différentes molécules fongicides utilisées. Dans ce cadre, des échantillons de feuilles de blé infectées sont collectés chaque année dans des parcelles provenant de toutes les régions où le blé est cultivé ; c'est notamment le cas des parcelles du Réseau Performance (Garnault *et al.*, 2019, 2020). Ces échantillons ont été utilisés pour constituer une nouvelle collection de 625 isolats français de *Z. tritici*, collectés entre 2017 et 2019. Parmi ces 625 isolats, 40 isolats ont été sélectionnés pour être testés sur 15 variétés de blé tendre différentielles pour les gènes de résistance *Stb* qu'elles portent (Figure 1) afin de déterminer leur profil de virulences ; ces isolats ont également été testés sur les 5 variétés de blé tendre élites françaises Renan, Apache, Rubisko, Fructidor et LG-Absalon (Figure 1). D'autre part, ces échantillons

ont été utilisés pour constituer une banque d'ADNs représentatifs de la population de *Z. tritici* présente sur une parcelle (ADNs extraits à partir du broyat des feuilles provenant d'un même échantillon).

Un panel de blé composé de 285 variétés représentant la diversité génétique présente dans le matériel génétique de blé tendre élite français (Paux *et al.*, 2022 ; Thauvin *et al.*, non publié) a été évalué avec différents isolats de *Z. tritici* (Tableau 1). 220 variétés de ce panel ont été évaluées précédemment dans le cadre du projet de recherche ANR Biotechnologies Breedwheat (ANR-10-BTBR-03) avec 4 isolats de *Z. tritici* sur plantules en conditions contrôlées et au champ (Tableau 1). L'ensemble des 285 variétés du panel a été évalué dans le cadre du projet FSOV DivR avec 6 autres isolats de *Z. tritici* sur plantules en conditions contrôlées et au champ (Tableau 1).

Pour la validation fonctionnelle des gènes candidats impliqués dans la pathogénie de *Z. tritici*, nous avons utilisé l'isolat ST99CH3D7 collecté en 1999 dans un champ de blé Suisse et précédemment utilisé pour la validation fonctionnelle du gène d'avirulence *Avr3D1* (Meile *et al.*, 2018). L'isolat IPO-323 a également été utilisé pour amplifier le gène candidat *Zt\_6\_00224* ; IPO-323 a été collecté en 1982 aux Pays-Bas sur la variété Arminda, et a été le premier isolat de *Z. tritici* pour lequel le génome a été entièrement séquencé (Goodwin *et al.*, 2011).

### ► Tests d'infection en conditions contrôlées

Des tests d'infection en conditions contrôlées, sur jeunes plantes, ont été réalisés afin de déterminer le spectre de virulences de 40 souches de *Z. tritici* sur des variétés de blé tendre différentielles pour les gènes de résistance *Stb* qu'elles portent, mais aussi pour l'évaluation du panel de 285 variétés élites françaises avec 10 souches de *Z. tritici* (Tableau 1). La procédure détaillée de ces tests d'infection est disponible dans Langlands-Perry *et al.* (2022). Brièvement, pour chaque interaction testée (une plante versus un isolat) trois graines ont été semées par pot, puis les pots répartis dans des plateaux contenant 15 pots/plateau. Avant l'inoculation, les plantes ont été cultivées en chambre climatique avec une photopériode de 16h, une hygrométrie fixée à 70% et des températures de 16°C la nuit et 20°C le

Isolat	Variété <sup>1</sup>	Pays <sup>1</sup>	Année	Projet <sup>2</sup>	Essais plantules <sup>3</sup>	Essais au champ <sup>4</sup>
IPO-323	Arminda	Pays-Bas	1982	Breedwheat	2	-
IPO-09455	Premio	France	2009	Breedwheat	4	-
IPO-09415	Premio	France	2009	Breedwheat	4	2013 (2) 2014 (2)
IPO-90006	Kavkaz- K4500	Mexique	1990	Breedwheat	2	
INRA16-TM0229	Renan	France	2016	FSOV DivR	1	2019 (1) 2020 (2)
IPO-09593	Apache	France	2009	FSOV DivR	2	-
INRA09-FS0732	Soissons	France	2009	FSOV DivR	2	-
INRA09-FS0813	Soissons	France	2009	FSOV DivR	2	-
ST99CH_3D7	-	Suisse	1999	FSOV DivR	2	-
INRA19-TM0016	LG-Absalon	France	2018	FSOV DivR	1	-

**Tableau 1 :** Isolats de *Zymoseptoria tritici* utilisés pour l'évaluation du panel de 285 variétés élites françaises dans les projets ANR BreedWheat et FSOV. 1 - Variété et pays d'origine de l'isolat de *Z. tritici* ; 2 - Projet de recherche au sein duquel les données ont été acquises ; 3 - Nombre de répétitions de l'évaluation du panel en conditions contrôlées pour chaque isolat ; 4 - Année pendant laquelle l'évaluation du panel au champ a eu lieu, le nombre d'essais est indiqué entre parenthèses.



jour. Après l'inoculation, les plantes ont été placées dans une chambre climatique avec une photopériode de 16h, hygrométrie fixée à 90 % le jour, 80 % la nuit et températures de 22°C pendant le jour et 18°C la nuit. Dans les chambres climatiques, les conditions d'éclairage ont été maintenues à 300  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Dans tous les tests, la variété Taichung-29 a été utilisée comme témoin sensible à la maladie. Les plantes ont été inoculées 16 jours après semis sur la première vraie feuille avec une suspension contenant  $10^6$  spores.mL<sup>-1</sup>. Les pourcentages de surface foliaire inoculée présentant des lésions (note de nécrose ; PLACL) ou portant des pycnides (note de sporulation ; PLACP) ont été estimées visuellement à 21 et/ou 28 jours après l'inoculation. Les aires sous les courbes de progression de la maladie (AUDPC) entre les deux dates d'observation ont ensuite été calculées.

### ► Tests d'infection au champ

Des essais au champ ont été réalisés sur six sites au cours des saisons 2013, 2014, 2019 et 2020. En 2013-2014, les essais, réalisés dans le cadre du projet Breedwheat, ont été inoculés avec l'isolat IPO09415. En 2019-2020, les essais, réalisés dans le cadre du projet DivR, ont été inoculés avec l'isolat INRA16-TM0229 (Tableau 1). Chaque essai était composé de deux répétitions organisées selon un dispositif aléatoire par blocs. La sévérité de la maladie a été notée pour chaque variété en utilisant une échelle allant de 1 à 9, où 1 signifie totalement résistant et 9 totalement sensible (Naz *et al.*, 2015). Dans chaque essai deux observations ont été réalisées, sauf un essai en 2013 pour lequel seulement une seule observation a pu être faite. Les AUDPC entre les deux dates d'observation ont été calculées. Un modèle de régression multiple prenant en compte la date d'épiaison et la hauteur de la plante a été appliquée aux AUDPC, afin d'éviter l'implication de ces caractères quantitatifs dans le niveau de la maladie et de permettre l'analyse de la résistance à *Z. tritici per se*.

### ► Approches de GWAS

Des analyses d'association à l'échelle du génome (GWAS) ont été conduites sur le panel de 285 variétés de blé tendre. Les variétés de ce panel avaient précédemment été génotypées sur la puce Axiom TaBW280K (Rimbert *et al.*, 2018), qui a permis de construire une matrice de 151,248 SNPs ayant une fréquence allélique minimum (MAF) de 5%. Les données manquantes et les données hétérozygotes ont été imputées en utilisant la fonction knnImputeLarge du package scRime. Les analyses GWAS ont été réalisées avec la suite logicielle GAPIT v3.0 (Wang & Zhang, 2021) pour deux modèles : un modèle linéaire mixte (MLM) avec la méthode P3D (Zhang *et al.*, 2010 ; Rosyara *et al.*, 2016), et un modèle « Bayesian-information

and Linkage-disequilibrium Iteratively Nested Keyway » (BLINK) (Huang *et al.*, 2018). Le seuil de significativité a été fixé à  $-\text{LOG}_{10}(\text{p-value}) = 5$ . Le déséquilibre de liaison (DL) a été calculé autour de chaque SNP détecté par les analyses GWAS à l'aide du package LdcorSV (Mangin *et al.*, 2012). Le DL local a été calculé en moyennant le DL sur des fenêtres glissantes de 10 marqueurs. Les SNP ayant un intervalle chevauchant pour un DL de  $R^2=0.2$  ont été considérés comme détectant le même QTL. Tous les SNP détectés avec les deux méthodes ont été regroupés. Les QTL ont été définis séparément pour les essais en conditions contrôlées et au champ. Toutes les analyses ont été réalisées avec R version 4.1.2 (R Core Team, 2021). Les intervalles de confiance de tous les QTL ont été définis par rapport au génome de Chinese Spring RefSeq v2.1 (Zhu *et al.*, 2021).

### ► Transformation génétique de *Zymoseptoria tritici*

Trois gènes candidats issus des études de GWAS ont été priorisés pour la validation fonctionnelle parce qu'ils encodent des petites protéines secrétées, fortement surexprimées pendant la phase de transition de la maladie vers la nécrotrophie (Amezrou *et al.*, 2024). Ces trois gènes ont été identifiés sur les variétés résistantes Arina (*Stb6*, *Stb15*), Tadinia (*Stb6*, *Stb4*) et Cadenza (*Stb6*, *Stb9*), respectivement (Tableau 2).

Pour *Zt3\_0467*, nous avons exprimé de manière ectopique les allèles virulent (ST99CH3D7) et avirulent (IPO-10273) dans le fond génétique de l'isolat ST99CH3D7. Un fragment contenant le gène *Zt\_3\_00467*, comprenant 1830 pb en amont du codon d'initiation et 459 pb en aval du codon d'arrêt, a été amplifié à l'aide de l'ADN polymérase Phusion (NEB). Ce fragment a été cloné dans un vecteur pCGEN avec le gène de résistance à la néomycine comme marqueur de sélection, en utilisant le kit de clonage In-Fusion HD (Takara Bio). Les vecteurs ont été transformés à l'aide de cellules *E. coli* Stellar soumises à un choc thermique et vérifiés à l'aide du séquençage Sanger. Les plasmides confirmés ont été transformés dans des cellules d'*Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) par choc thermique suivant une procédure adaptée de Zwiers & de Waard (2001). La sélection des mutants de *Z. tritici* a été réalisée sur des plaques contenant de la généticine (150  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Pour *Zt\_6\_00224*, nous avons exprimé de manière ectopique les allèles virulent (ST99CH3D7) et avirulent (IPO-323) dans le fond génétique de l'isolat ST99CH3D7. Un fragment contenant le gène *Zt\_3\_00224*, comprenant 1990 pb en amont du codon d'initiation et 1 008 pb en aval du codon d'arrêt, a été amplifié puis cloné dans un vecteur pCGEN. Le clonage et la transformation via ATMT ont été réalisés suivant la procédure décrite ci-dessus.

Gene ID	Chrom	Coordonnées (pb)	MAM <sup>1</sup> ID	MAM position (pb)	Variété	Trait pheno
Zt_3_00467	chr_3	1540271-1541356	SNP0704075	1 541 043	Arina	PLACP <sup>2</sup>
Zt_6_00224	chr_6	960813-961081	SNP1290794	960 964	Tadinia	PLACP
Zt_9_00069	chr_9	272926-273739	SNP1806146	272 732	Cadenza	PLACP

**Tableau 2 :** Gènes candidats pour leur rôle dans le pouvoir pathogène de *Zymoseptoria tritici*, identifiés par GWAS (Amezrou *et al.*, 2024), et sélectionnés pour la validation. 1 - MAM : marqueur le plus associé ('Most Associated Marker') identifié pendant la GWAS ; 2 - PLACP : pourcentage de la surface foliaire inoculée couverte par la sporulation ('Percentage of Leaf Area Covered by Pycnidia').

Pour *Zt9\_0069*, nous avons généré des mutants knock-out dans l'isolat ST99CH3D7. Pour construire les plasmides de délétion du gène, des régions de 1085 pb en amont du codon d'initiation et de 1111 pb en aval du codon d'arrêt du gène *Zt9\_0069* ont été amplifiées à partir d'ADN génomique. Ces fragments ont été clonés dans un vecteur pCHYG avec le gène de résistance à l'hygromycine comme marqueur de sélection. Le clonage et la transformation via ATMT ont été réalisés suivant la procédure décrite ci-dessus.

La croissance de tous les mutants produits a été testée en conditions de culture axénique sur milieu Yeast Mannitol Agar (YMA) afin de vérifier que la modification génétique n'affectait pas la croissance du mutant. Pour chaque construction, trois transformants indépendants portant les différents allèles de virulence ou trois mutants knock-out ont été utilisés pour la caractérisation phénotypique *in planta*.

### ► Séquençage ciblé d'amplicons

Nous avons mis au point une méthode de séquençage ciblé d'amplicons permettant de suivre les virulences, les résistances aux fongicides et les flux de gènes dans les populations de *Z. tritici*. Au total, 798 amplicons ont été conçus sur la base de polymorphismes connus au sein de l'espèce. Les sites polymorphes ont été utilisés à la fois pour sélectionner les SNP à amplifier mais aussi pour concevoir des amorces dans des régions conservées du génome afin d'éviter de possibles biais d'amplification liés à la mauvaise hybridation des amorces. Pour cela, nous avons utilisé les informations de séquences de génomes complets disponibles pour 632 isolats de *Z. tritici* collectés dans l'aire de répartition mondiale du blé ; *i.e.* Australie, Nouvelle Zélande, Etats-Unis, Suisse, France et Israël. La longueur des amplicons conçus a été limitée à environ 200 pb pour garantir une amplification efficace et équilibrée entre les *loci*. La procédure d'identification des polymorphismes et de conception des amplicons est décrite en détail dans Bellah *et al.* (2023).

Notre approche de séquençage ciblé d'amplicons a été testée sur 192 échantillons, dont 4 échantillons étaient des mélanges équimolaires d'ADN de 26 à 30 isolats obtenus à partir de cultures pures, 10 échantillons des mélanges d'ADN de trois isolats (*i.e.* INRA10-FS1006, INRA10-FS1022 et IPO-09455) dans des proportions différentes, et 178 échantillons des ADN extraits directement à partir de feuilles de blé infectées qui ont été collectées dans différentes régions de France, Belgique, Irlande et Angleterre. Les ADN ont été extraits à l'aide du DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) puis les concentrations mesurées à l'aide d'un fluoromètre Qubit 2.0 (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA). Les 798 amplicons ont été générés pour chaque échantillon avec 10 pools d'amorces (chaque pool contenant de 50 à 96 couples d'amorces) par PCR sur un thermocycleur spécialisé Juno™ (Fluidigm Inc., San Francisco, Californie, USA). Nous avons réalisé cette expérience deux fois indépendamment sur deux puces à circuits microfluidiques intégrés LP192.24 (IFC). Le séquençage Illumina a été effectué en mode paire pour générer des lectures de 100 pb sur la plateforme NovaSeq™6000 à Integragen Inc. (Evry, France) et a produit 363,89 Go de données brutes de séquençage pour chaque puce.

Pour chaque paire de séquences, les lectures *forward* et *reverse* ont été fusionnées afin d'obtenir des pseudo-lectures simples. Ces pseudo-lectures ont ensuite été alignées sur le génome de référence IPO-323 puis les lectures analysées et dénombrées pour chacun des *loci* ciblés par notre approche ; seulement les *loci* avec une couverture minimale de 50 lectures ont été considérés afin de réduire les biais dans l'évaluation des fréquences alléliques. La procédure d'identification des fréquences alléliques aux SNP ciblés est décrite en détail dans Bellah *et al.* (2023). Pour analyser la diversité génétique et la structure de la population de *Z. tritici*, nous avons réalisé une analyse en composantes principales (PCA) en n'utilisant que les résultats de la deuxième répétition (puce Fluidigm), et en excluant les SNP liés à la pathogénie et à la résistance aux fongicides, afin de refléter une structure de population neutre. D'autre part, après l'alignement des pseudo-lectures sur le génome de IPO323, pour chaque amplicon dans chaque échantillon, nous avons assemblé les séquences identiques puis nous les avons comptés en nombre de lectures par million de lectures alignées (Reads per million mapped reads, RPM). Cela a permis d'identifier les variants distincts pour chaque amplicon, puis d'analyser la distribution de ces variants en fonction de l'origine géographique des échantillons et de la virulence d'isolats précédemment caractérisés (pathotype et séquence).

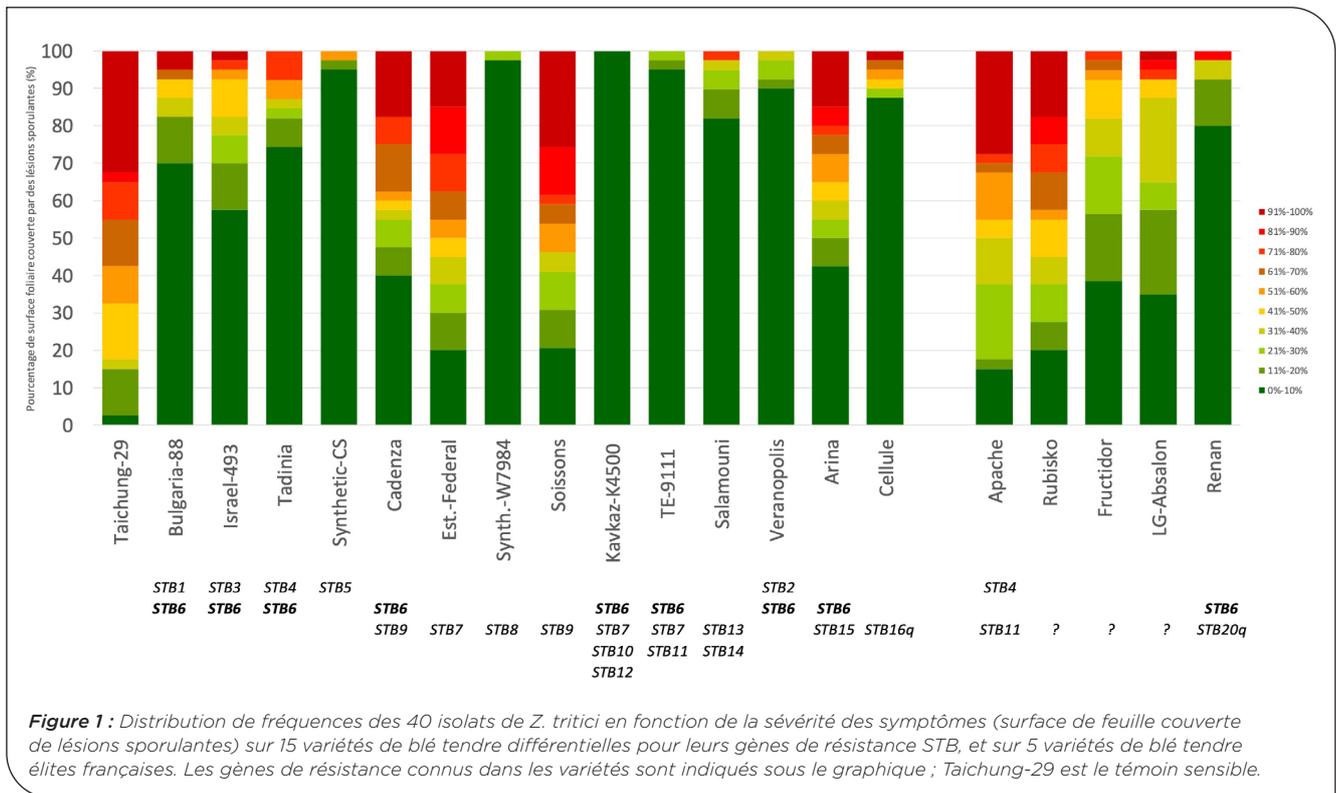
## 3 Résultats

### ► Spectre de virulence des isolats collectés en France en 2018

Une nouvelle collection représentative de la population française de *Z. tritici* a été constituée en isolant des isolats monospores à partir d'échantillons de feuilles de blé infectées collectées à travers la France en 2017 ( $n = 344$ ), 2018 ( $n = 258$ ) et 2019 ( $n = 23$ ). Cette collection est donc composée de 625 isolats, provenant de 12 régions françaises et de 27 variétés élites de blé tendre. Cette collection vient compléter l'importante collection d'isolats de référence de *Z. tritici* disponible à INRAE BIOGER, et comprenant notamment 2236 isolats collectés en 2009-2010 sur les variétés Apache et Premio dans le cadre du projet FSOV 2008 H. Parmi les 258 isolats collectés en 2018, 40 ont été choisis provenant des 12 régions et de 17 variétés différentes, afin d'établir leur capacité à infecter 15 variétés de blé tendre différentielles pour les gènes de résistance *Stb* qu'elles portent (*Stb1* à *Stb16q*) ainsi que sur les 5 variétés de blé tendre élites françaises Apache, Rubisko, Fructidor, LG-Absalon et Renan (Figure 1).

Nous considérons un isolat comme virulent (*i.e.* capable de causer une infection) sur une variété donnée lorsqu'il produit une surface foliaire sporulante supérieure à 10 %, par opposition à avirulence (*i.e.* incapable de causer une infection). Lorsqu'il est virulent, l'agressivité d'un isolat se traduit par la variation quantitative de la sévérité de l'infection. Parmi les 15 variétés différentielles, la variété témoin sensible 'Taichung-29' est effectivement sensible à 39 des isolats caractérisés (ces isolats sont virulents), mais l'agressivité des isolats varie entre 10 % et 100 % de surface foliaire sporulante. L'isolat qui n'est



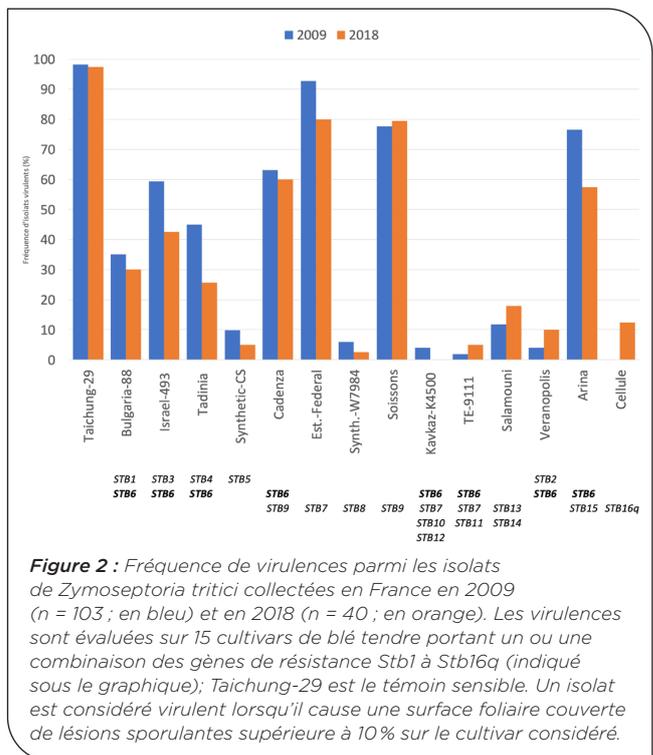


pas virulent sur 'Taichung-29' est virulent sur quatre autres variétés, indiquant que 'Taichung-29' possède tout de même un ou plusieurs facteurs de résistance. Les isolats sont particulièrement agressifs sur les variétés Cadenza, Estanzuela Federal, Soissons et Arina, porteuses des gènes de résistance *Stb6*, *Stb7*, *Stb9* et *Stb15*. Le niveau d'agressivité des isolats est variable sur les variétés élites françaises, allant d'Apache (plus agressifs) à Renan (moins agressifs).

La fréquence de virulence des isolats de *Z. tritici* est très variable d'une variété à une autre mais à globalement peu évoluée entre 2009 et 2018 (Figure 2). Des isolats virulents ont été observés sur toutes les variétés, quelques soient le ou les gènes de résistance portés, mais aucune variété n'était sensible à tous les isolats testés. Aucun isolat n'était virulent sur Cellule en 2009 alors que la virulence sur cette variété, porteuse de *Stb16q*, apparaît en 2018. La fréquence d'isolats virulents reste très faible (inférieure à 10%) sur les variétés Synthetic-CS, Synthetic-W7984, Kavkaz-K4500, TE-9111 et Veranopolis, indiquant l'efficacité des gènes de résistance *Stb2*, *Stb5*, *Stb8*, *Stb11*, *Stb10* et *Stb12* vis-à-vis des populations françaises de *Z. tritici*. Aucune souche virulente n'a été détectée sur Kavkaz-K4500 (*Stb10* et *Stb12*) en 2018. Cette caractérisation a permis d'établir un profil de virulences pour chaque isolat (i.e. ensemble des gènes de résistance *Stb* vis-à-vis desquels l'isolat est virulent). Parmi les 40 isolats de 2018, nous avons pu distinguer 33 spectres de virulences différents. Cette importante diversité dans les spectres de virulences traduit la très grande diversité génétique présente dans les populations de *Z. tritici*. A cause de cette diversité, il semble préférable de caractériser les populations de *Z. tritici* en termes de fréquences de virulences vis-à-vis des différents gènes *Stb*, plutôt qu'en termes d'occurrences des spectres de virulence aussi appelés 'races' d'en d'autres pathosystèmes.

### ► Validation fonctionnelle de 3 gènes d'avirulence chez *Z. tritici*

Parmi la collection d'isolats constituée en 2009-2010 dans le cadre du projet FSOV 2010 K, 103 isolats ont été sélectionnés pour constituer un panel de génétique d'association chez *Z. tritici*. Ce panel a été utilisé pour mener une étude de génétique d'association à l'échelle du génome (i.e. GWAS) afin d'identifier les gènes d'avirulence correspondant aux gènes de résistance *Stb* portés par les 15 variétés de blé tendre différentielles (Figure 2). Cette étude a permis



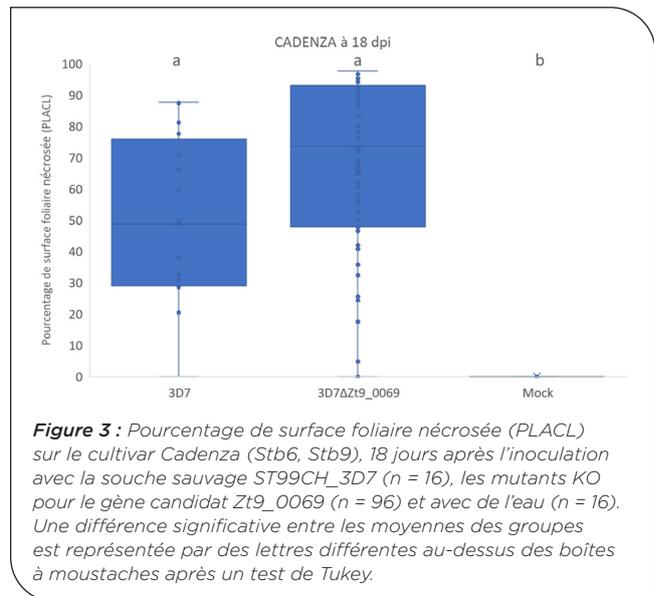
d'identifier 65 gènes candidats pour leur implication dans la pathogénie de *Z. tritici*, dont 19 gènes étaient fortement surexprimés pendant la phase de transition de la maladie vers la nécrotrophie (Amezrou *et al.*, 2024). Trois de ces gènes candidats ont été priorisés pour la validation fonctionnelle, notamment parce qu'ils encodent des petites protéines secrétées. Ces trois gènes ont été identifiés sur les variétés résistantes Arina (*Stb6*, *Stb15*), Tadinia (*Stb6*, *Stb4*) et Cadenza (*Stb6*, *Stb9*), respectivement.

L'isolat ST99CH\_3D7 est virulent sur les trois variétés Arina, Tadinia et Cadenza. Il porte l'allèle associé à une plus faible agressivité pour le gène candidat *Zt9\_0069*, identifié sur Cadenza. L'inactivation du gène *Zt9\_0069* dans la souche ST99CH\_3D7 n'a pas permis de confirmer le rôle de ce gène dans le pouvoir pathogène de *Z. tritici* sur Cadenza (Figure 3). L'inactivation de *Zt9\_0069* semble conférer une agressivité plus importante à l'isolat ST99CH\_3D7Δ*Zt9\_0069* (*i.e.* plus 20% PLACL) mais cette différence n'est pas statistiquement significative. Il est possible que l'effet de ce gène sur la pathogénie de *Z. tritici* soit relativement faible et donc difficile à mettre en évidence ; un plus grand nombre de répétitions dans l'évaluation phénotypique de ces mutants pourrait permettre de clarifier cette question.

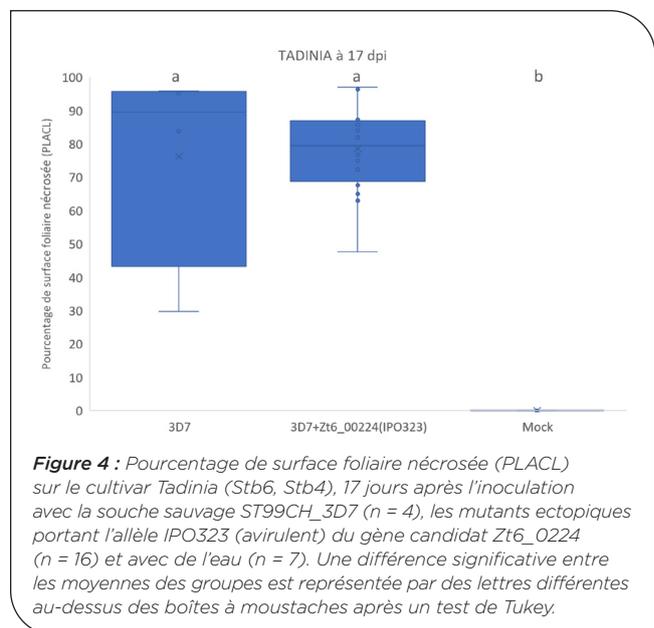
L'isolat ST99CH\_3D7 porte l'allèle associé à une agressivité plus importante pour les gènes candidats *Zt6\_0224* et *Zt3\_0467*, identifiés sur Tadinia et Arina respectivement. L'introduction ectopique de l'allèle de l'isolat IPO-323 (associé à une agressivité moins importante) pour le gène *Zt6\_0224*, dans le fond génétique de ST99CH\_3D7, n'a pas permis de confirmer le rôle de ce gène dans le pouvoir pathogène de *Z. tritici* sur la variété Tadinia (Figure 4). A contrario, l'introduction ectopique de l'allèle de l'isolat IPO-10273 (associé à une agressivité moins importante) pour le gène *Zt3\_0467*, dans le fond génétique de ST99CH\_3D7, a permis de confirmer le rôle de ce gène dans le pouvoir pathogène de *Z. tritici* sur la variété Arina (Figure 5 ; Amezrou *et al.*, 2024). Ce résultat implique que la variété Arina est capable de reconnaître l'allèle IPO-10273 de *Zt3\_0467* pour induire une réaction de défense. Toutefois, cette reconnaissance conduit à un phénotype quantitatif (*i.e.* moins 11% PLACP) que nous n'avons pu mettre en évidence qu'au tout début de l'apparition des symptômes à 14 dpi. La variété Arina est porteuse des gènes de résistance *Stb6* et *Stb15*. *AvrStb6* a été identifié précédemment, et code pour une petite protéine secrétée, typique d'un effecteur (Zhong *et al.*, 2017). *Zt3\_00467* code également pour une petite protéine secrétée, et pourrait interagir avec *Stb15* (Hafeez *et al.*, 2023) ou avec un autre gène de résistance qui n'aurait pas encore été détecté dans la variété Arina.

### ► Suivi des populations de *Z. tritici* en France

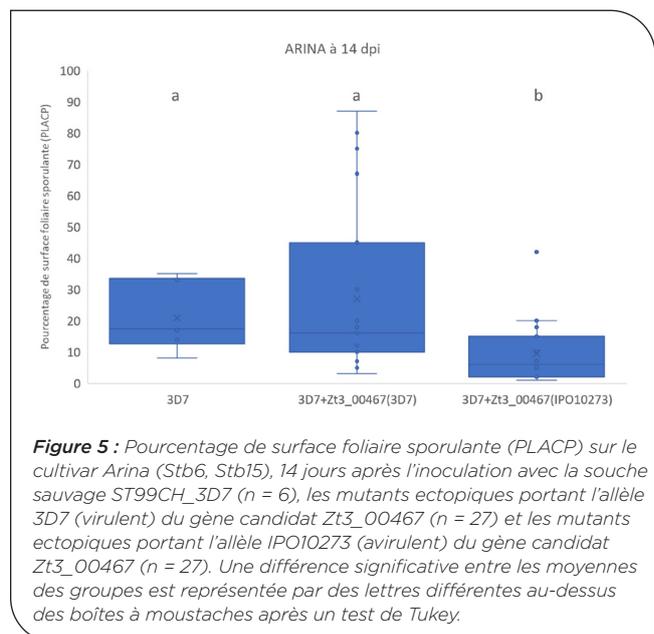
Les amplicons conçus ciblent des SNP associés à 65 gènes candidats pour leur implication dans la pathogénie de *Z. tritici*, qui ont été identifiés au cours de l'étude GWAS de Amezrou *et al.* (2024) ; ces gènes incluent notamment les gènes d'avirulence *AvrStb6* et *AvrStb9* connus chez *Z. tritici* (Zhong *et al.*, 2017 ; Amezrou *et al.*, 2023). Les amplicons conçus ciblent également des mutations connues dans 25 gènes impliqués dans la résistance aux fongicides ; dont



**Figure 3 :** Pourcentage de surface foliaire nécrosée (PLACL) sur le cultivar Cadenza (*Stb6*, *Stb9*), 18 jours après l'inoculation avec la souche sauvage ST99CH\_3D7 (n = 16), les mutants KO pour le gène candidat *Zt9\_0069* (n = 96) et avec de l'eau (n = 16). Une différence significative entre les moyennes des groupes est représentée par des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches après un test de Tukey.



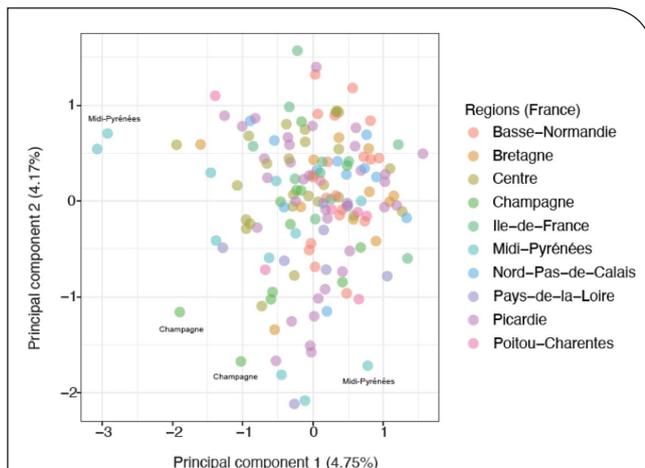
**Figure 4 :** Pourcentage de surface foliaire nécrosée (PLACL) sur le cultivar Tadinia (*Stb6*, *Stb4*), 17 jours après l'inoculation avec la souche sauvage ST99CH\_3D7 (n = 4), les mutants ectopiques portant l'allèle IPO323 (avirulent) du gène candidat *Zt6\_0224* (n = 16) et avec de l'eau (n = 7). Une différence significative entre les moyennes des groupes est représentée par des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches après un test de Tukey.



**Figure 5 :** Pourcentage de surface foliaire sporulante (PLACP) sur le cultivar Arina (*Stb6*, *Stb15*), 14 jours après l'inoculation avec la souche sauvage ST99CH\_3D7 (n = 6), les mutants ectopiques portant l'allèle 3D7 (virulent) du gène candidat *Zt3\_00467* (n = 27) et les mutants ectopiques portant l'allèle IPO10273 (avirulent) du gène candidat *Zt3\_00467* (n = 27). Une différence significative entre les moyennes des groupes est représentée par des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches après un test de Tukey.

les gènes mitochondriaux *CYTB* et *AOX*, et les gènes nucléaires de la bêta-tubuline 1 (résistance à la carbendazime), *CYP51* (résistance aux azoles), et *SDH1*, *SDH2*, *SDH3* et *SDH4* (résistance aux SDHI) (Fraaije *et al.*, 2007 ; Steinhauer *et al.*, 2019 ; Torriani *et al.*, 2009 ; Zhan *et al.*, 2006). La résistance multidrogues (MDR) aux fongicides chez *Z. tritici* est médiée par l'insertion d'éléments transposables dans la région promotrice du transporteur membranaire *MgMFS1* (Omrane *et al.*, 2015, 2017) ; nous avons conçu 16 amplicons couvrant trois des insertions d'éléments transposables et des haplotypes précédemment signalés afin de détecter la présence ou absence de ces insertions. Enfin, nous avons conçu 691 amplicons supplémentaires ciblant des SNP répartis chaque 50 kb le long des 21 chromosomes de *Z. tritici*, afin de capturer la structure de la diversité génétique neutre dans les populations de *Z. tritici*.

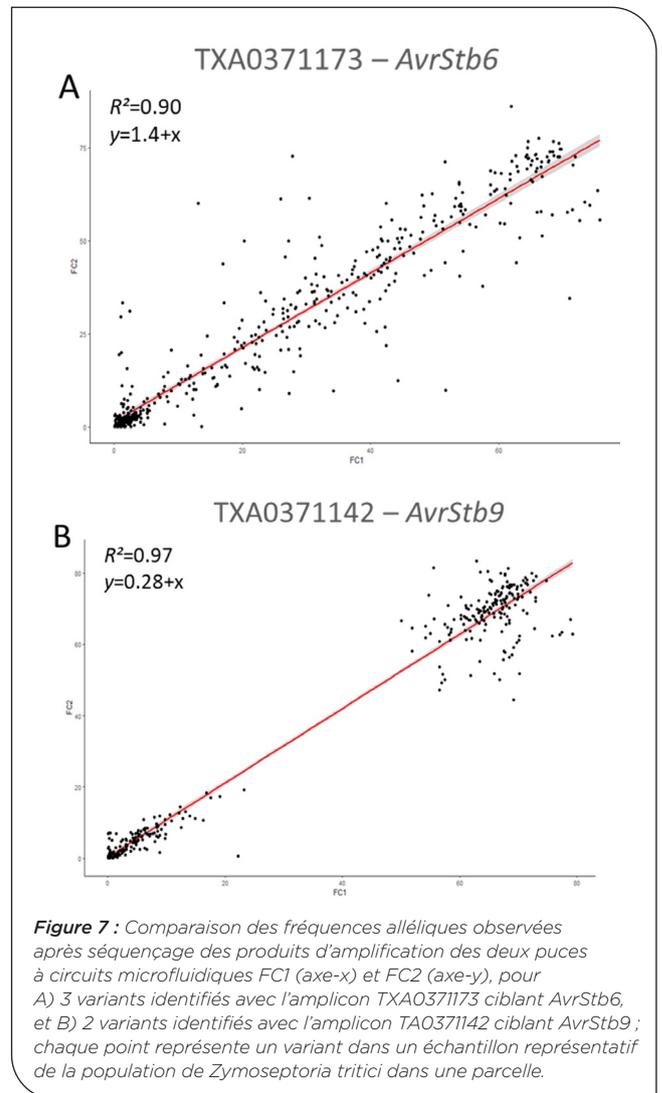
Nous avons utilisé 158 échantillons de feuilles de blé infectées par *Z. tritici* collectées dans des champs à travers la France en 2018 et 2019 ; chaque échantillon correspond à un ADN extrait à partir du broyat de feuilles de blé infectées provenant de la même parcelle (même variété, même traitement). Sur la base d'une analyse en composantes principales de 82 SNP à l'échelle du génome, nous avons trouvé une légère différenciation pour les échantillons provenant du Midi-Pyrénées et de Champagne (Figure 6 ; Bellah *et al.*, 2023). Cependant, la différenciation globale entre tous les échantillons était très faible, les première et deuxième composantes principales n'expliquant qu'environ 4% de la variabilité.



**Figure 6 :** Analyse en composantes principales représentant la structure génétique de la population française de *Zymoseptoria tritici* basée sur 691 marqueurs répartis le long des 21 chromosomes de *Z. tritici*. Chaque échantillon correspond à plusieurs feuilles de blé infectées, collectées dans une même parcelle ; les différentes couleurs représentent différentes régions (d'après Bellah *et al.*, 2023).

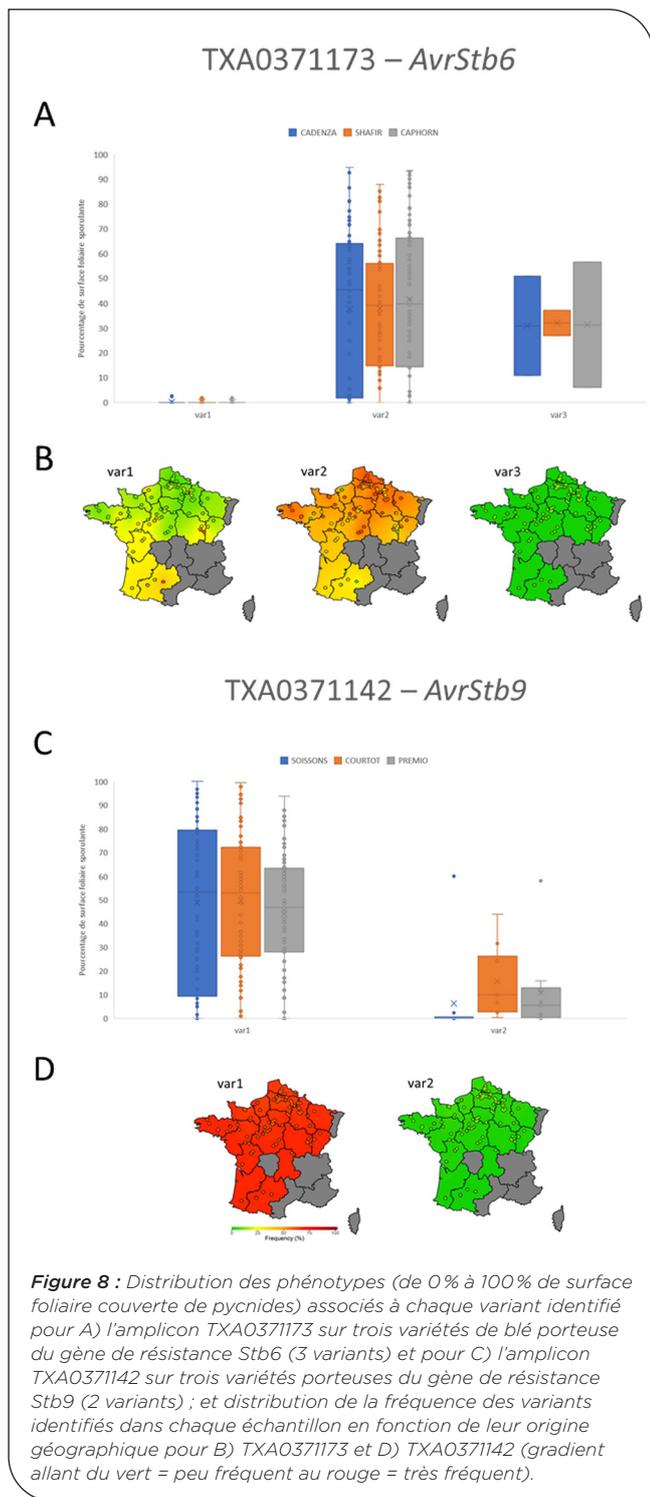
Nous nous sommes ensuite intéressés à deux amplicons ciblant les gènes *AvrStb6* (i.e. TXA0371173) et *AvrStb9* (i.e. TXA0371142). Pour l'amplicon ciblant *AvrStb6*, 3 variants de séquence ont été identifiés parmi tous les échantillons analysés, alors que pour l'amplicon ciblant *AvrStb9*, 2 variants ont été identifiés. Les fréquences alléliques de chacun de ces variants pour chaque échantillon ont été comparées entre les deux puces à circuits microfluidiques utilisées. Pour ces deux amplicons, la reproductibilité des fréquences alléliques calculées pour chaque variant est très bonne puisque

$R^2 = 0,90$  dans le cas de l'amplicon ciblant *AvrStb6* (Figure 7A) et  $R^2 = 0,97$  dans le cas de l'amplicon ciblant *AvrStb9* (Figure 7B). Les deux nuages de points visibles pour TXA0371142 traduisent des fréquences alléliques très différentes entre les deux variants détectés (Figure 7B).



**Figure 7 :** Comparaison des fréquences alléliques observées après séquençage des produits d'amplification des deux puces à circuits microfluidiques FC1 (axe-x) et FC2 (axe-y), pour A) 3 variants identifiés avec l'amplicon TXA0371173 ciblant *AvrStb6*, et B) 2 variants identifiés avec l'amplicon TA0371142 ciblant *AvrStb9* ; chaque point représente un variant dans un échantillon représentatif de la population de *Zymoseptoria tritici* dans une parcelle.

Nous avons ensuite analysé le phénotype associé à ces variants sur des variétés porteuses du gène de résistance *Stb6* (i.e. Cadenza, Shafir, Caphorn) ou du gène de résistance *Stb9* (i.e. Soissons, Courtot, Premio), ainsi que la distribution géographique de ces variants. Pour TXA0371173 (i.e. *AvrStb6*), le variant 1 est clairement associé à un phénotype avirulent alors que les variants 2 et 3 sont associés à des phénotypes virulents (Figure 8A) ; d'autre part, le variant 1 est plus fréquent dans la moitié Sud du pays alors que le variant 2 est plus fréquent dans la moitié Nord (Figure 8B). Pour TXA0371142 (i.e. *AvrStb9*), le variant 2 est associé à un phénotype avirulent globalement peu fréquent à l'échelle du pays, alors que le variant 1 est associé à un phénotype virulent globalement très fréquent (Figure 8C,D). Ces résultats indiquent que notre approche peut se révéler très efficace pour le suivi des gènes d'intérêts chez *Z. tritici*, notamment les gènes liés au pouvoir pathogène et à la résistance aux fongicides.

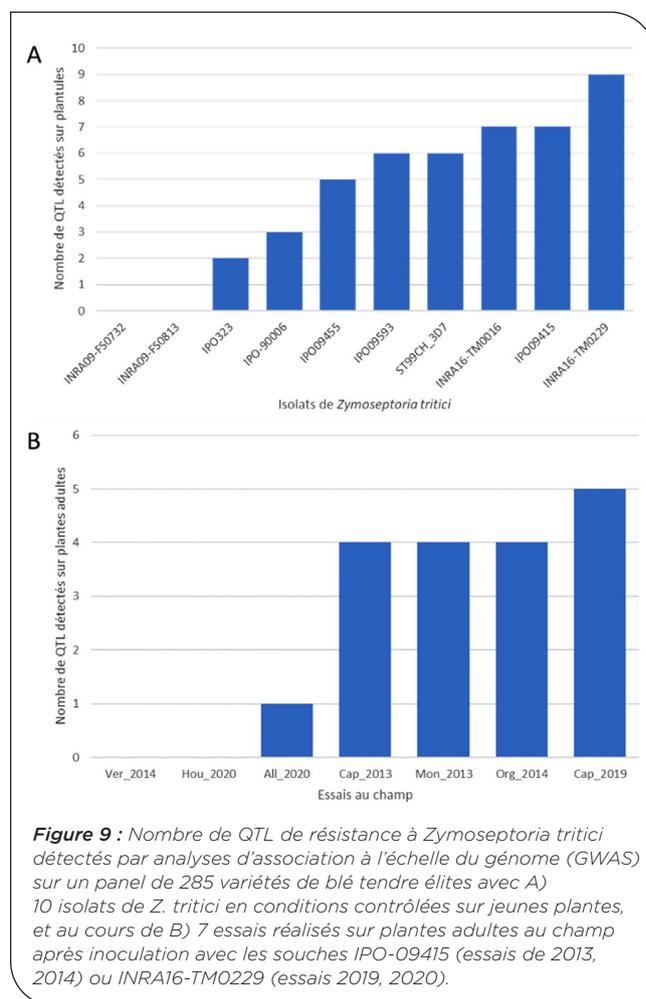


**Figure 8 :** Distribution des phénotypes (de 0% à 100% de surface foliaire couverte de pycnides) associés à chaque variant identifié pour A) l'amplicon TXA0371173 sur trois variétés de blé porteuse du gène de résistance *Stb6* (3 variants) et pour C) l'amplicon TXA0371142 sur trois variétés porteuses du gène de résistance *Stb9* (2 variants) ; et distribution de la fréquence des variants identifiés dans chaque échantillon en fonction de leur origine géographique pour B) TXA0371173 et D) TXA0371142 (gradient allant du vert = peu fréquent au rouge = très fréquent).

### ► Identification des gènes de résistance à la septoriose dans les variétés de blé françaises

Le panel de 285 variétés élités de blé a été phénotypé en conditions contrôlées au stade plantules avec 10 isolats de *Z. tritici* présentant un spectre de virulence différent, et au stade plantes adultes au cours de 7 essais au champ inoculés avec 2 des isolats utilisés en conditions contrôlées. Au stade plantules, la sévérité des symptômes (*i.e.* surfaces foliaires nécrosées et sporulantes) était fortement dépendante des isolats, l'isolat INRA09-FS0732 étant le moins agressif, et les isolats IPO-09415 et INRA16-TM0229 les plus agressifs. Les symptômes variaient aussi fortement en fonction

des variétés et des interactions variété\*isolat, suggérant la présence de résistances spécifiques aux isolats. Vingt-et-unes variétés présentaient moins de 10% de sporulation en moyenne, tous isolats confondus. Ces données mettent en évidence la diversité des interactions entre les isolats de *Z. tritici* et les cultivars de blé, tout en identifiant un certain nombre de variétés de blé présentant une résistance à large spectre au stade plantule. Au stade plantes adultes, 4 essais ont été inoculés avec l'isolat IPO-09415 (en 2013 et 2014) et 3 avec l'isolat INRA16-TM0229 (en 2019 et 2020). Les essais inoculés avec l'isolat IPO-09415 présentaient globalement plus de symptômes et une sévérité plus forte de la maladie que les essais inoculés avec INRA16-TM0229. La résistance observée dans ces essais était majoritairement quantitative, avec cependant plusieurs cas de résistance majeure. Quatre cultivars (Ambition, Azzerti, Cellule et Barok) se sont classés parmi les dix les plus résistants dans tous les essais au champ, ce qui suggère la présence d'une résistance stable dans ces variétés.



**Figure 9 :** Nombre de QTL de résistance à *Zymoseptoria tritici* détectés par analyses d'association à l'échelle du génome (GWAS) sur un panel de 285 variétés de blé tendre élités avec A) 10 isolats de *Z. tritici* en conditions contrôlées sur jeunes plantes, et au cours de B) 7 essais réalisés sur plantes adultes au champ après inoculation avec les souches IPO-09415 (essais de 2013, 2014) ou INRA16-TM0229 (essais 2019, 2020).

En conditions contrôlées, 40 QTL de résistance ont été identifiés contre les 10 isolats évalués. Le nombre de QTL identifiés est très variable d'un isolat à un autre, avec aucun QTL détecté pour les isolats INRA09-FS0732 et INRA09-FS0813 malgré la distribution quantitative des symptômes, et jusqu'à 9 QTL détectés avec l'isolat INRA16-TM0229 (Figure 9A). Parmi tous les QTL identifiés, 33 ont été détectés avec un seul isolat de *Z. tritici*, illustrant la spécificité de ces résistances vis-à-vis

de l'isolat, 6 ont été détectés avec deux isolats et 1 avec quatre isolats. Sur plantes adultes au champ, 17 QTL ont été détectés dans les 7 essais réalisés. Aucun QTL n'a pu être détecté à l'aide des données collectées dans les essais Ver\_2014 et Hou\_2020, et jusqu'à 5 QTL ont été détectés dans l'essai Cap\_2019 (Figure 9B). Onze QTL ont été identifiés dans les essais inoculés avec l'isolat IPO-09415, et 6 QTL ont été détectés dans les essais inoculés avec l'isolat INRA16-TM0229. Dans l'ensemble, ces QTL présentent des résistances quantitatives plus faibles que les QTL identifiés en conditions contrôlées. Un seul QTL a été détecté dans deux essais différents inoculés avec le même isolat, IPO-09415, illustrant la faible stabilité de la plupart des QTL de résistance identifiés au champ. Enfin, un seul des 20 QTL détectés au stade plantules à l'aide des isolats IPO-09415 et INRA16-TM0229 a également été détecté lors des essais au champ. Ces résultats indiquent que la résistance du blé contre *Z. tritici* dépend fortement du stade de développement du blé et de l'environnement.

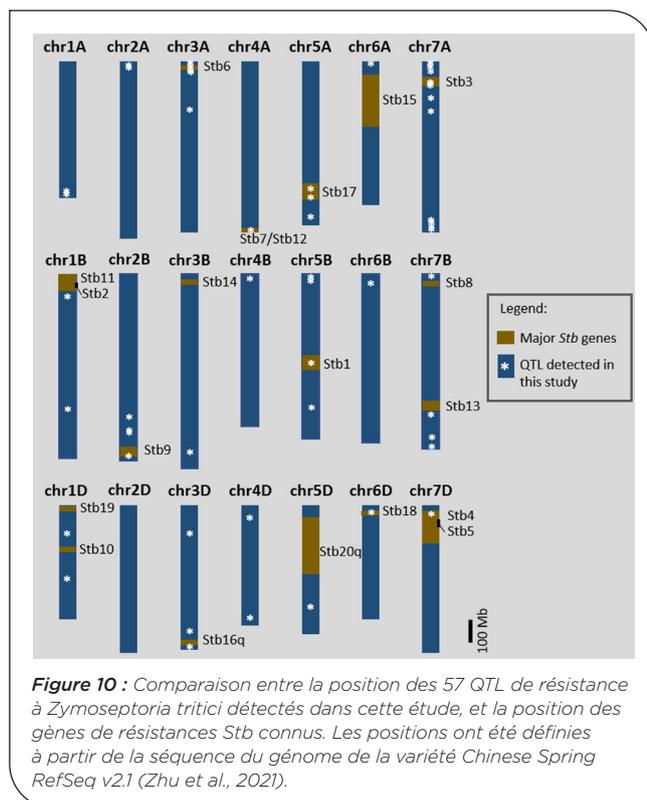
Au total, ce sont 57 QTL de résistance qui ont été détectés, 40 au stade plantules et 17 au stade plantes adultes au champ. Ces QTL sont répartis sur 20 des 21 chromosomes du blé hexaploïde (Figure 10). Trente-cinq de ces QTL co-localisent avec des régions génétiques connues pour être porteuses de gènes de résistances *Stb*. Le chevauchement entre les QTL de résistance et la position connue des gènes *Stb* a été étudiée en fonction du spectre de virulence de chaque isolat utilisé. Les QTL de résistance identifiés co-localisent avec les gènes de résistance majeur *Stb1*, *Stb3*, *Stb4* et *Stb11* mais les isolats utilisés pour la détection sont virulents sur ces gènes *Stb* correspondants, suggérant la présence d'un autre gène de résistance ou d'une version allélique du gène ayant un spectre de résistance différent. En revanche, les QTL qui co-localisent avec les gènes *Stb5*, *Stb6*, *Stb9*, *Stb10*, *Stb12*, *Stb13*, *Stb17* et *Stb18* ont été identifiés avec un

isolat avirulent, suggérant la présence de ces gènes dans certaines variétés françaises. L'ensemble de ces résultats donne un aperçu des principaux gènes de résistance *Stb* présents dans les variétés de blé françaises.

## 4 Discussion

Le projet DivR a permis de réaliser des avancées significatives dans notre connaissance du pathosystème blé tendre-septoriose, et tout particulièrement dans le déterminisme génétique et l'architecture génétique des interactions entre variétés de blé et isolats de *Z. tritici*.

Cinquante-sept QTL de résistance ont été identifiés dans une collection de 285 variétés principalement issues du catalogue officiel français, démontrant qu'un nombre remarquablement élevé de régions génomiques est impliqué dans la résistance à la septoriose. Ce nombre est d'autant plus remarquable qu'il existe très probablement de nombreuses autres régions qui n'ont pas été détectées, parce que le spectre de virulences des isolats utilisés ne le permettait pas, ou par manque de puissance statistique pour détecter des effets quantitatifs trop faibles ou des allèles de résistance trop peu fréquents dans notre panel. C'est notamment le cas des 21 variétés présentant une résistance large spectre au stade plantule (moins de 10% PLACP en moyenne, tous isolats confondus) et des 4 variétés présentant la résistance la plus efficace au stade plantes adultes au champ (tous isolats et essais confondus). Ces variétés représentent des sources de résistance précieuses pour améliorer la résistance du blé à la septoriose, mais les 57 QTL identifiés ne permettent pas d'expliquer le niveau de résistance dans ces variétés, probablement parce que les gènes de résistance sont en fréquence trop faible dans le panel. Une approche de cartographie QTL dans des populations biparentales issues de croisements avec ces variétés pourrait être envisagée afin d'identifier les gènes de résistance qu'elles portent. Brown *et al.* (2015) soulignaient déjà cette multiplicité des régions génomiques impliquées dans la résistance du blé à la septoriose ; une synthèse bibliographique des différentes études concernant ce sujet leur a permis de recenser 21 gènes de résistance dite 'qualitative' (*i.e.* gènes *Stb*) et surtout plus de 89 QTL de résistance dite 'quantitative'. Des résultats similaires ont été obtenus au cours d'analyses GWAS avec des panels de variétés provenant d'Europe (Yates *et al.*, 2018 ; Riaz *et al.*, 2020 ; Zakieh *et al.*, 2023), d'Afrique (Mekonnen *et al.*, 2021), du Moyen-Orient (Mahboubi *et al.*, 2022) ou d'Australie (Yang *et al.*, 2022). Parmi les 57 QTL identifiés, 10 QTL (4 plantules et 6 plantes adultes) se trouvent dans des régions du génome où aucune résistance à *Z. tritici* n'a été identifiée auparavant, indiquant que ces 10 QTL représentent de nouvelles cibles pour la sélection de variétés résistantes à la septoriose. D'autre part, l'intervalle de confiance de plusieurs des QTL identifiés chevauche la position de gènes de résistance *Stb* connus, et pourraient donc indiquer la présence de ces gènes *Stb* dans les variétés françaises. C'est notamment le cas de *Stb6*, *Stb9* et *Stb18* identifiés dans près de 50%, 17% et 7% des variétés du panel, respectivement. Les gènes *Stb5*, *Stb10*, *Stb11*, *Stb12* et *Stb13* semblent également être présents dans les variétés françaises. Inversement, des gènes précédemment identifiés dans les variétés françaises n'ont pas été détectés dans cette étude,



notamment *Stb15* (Arraiano & Brown, 2006), *Stb16q* (Santenac *et al.*, 2021) et *Stb20q* (Langlands-Perry *et al.*, 2022). Ces résultats suggèrent qu'au moins 11 des 23 gènes *Stb* connus pourraient être présents dans les variétés de blé tendre françaises, mais à des fréquences variables d'un gène à l'autre.

Une des caractéristiques les plus frappantes des QTL de résistance identifiés est leur spécificité vis-à-vis des isolats de *Z. tritici* utilisés. Le panel de variétés a été phénotypé avec dix isolats, et seulement 7 des 57 QTL ont été détectés avec plusieurs de ces isolats. Il est également intéressant de remarquer que presque chaque nouvel isolat utilisé a permis de détecter de nouvelles régions génomiques impliquées dans la résistance ; les isolats ne l'ayant pas permis n'ont en fait permis de détecter aucun QTL (*i.e.* INRA09-FS0732 et INRA09-FS0813). Au vu de l'importance de la reproduction sexuée et de la diversité génétique dans les populations de *Z. tritici* (Kema *et al.*, 2018 ; Feurtey *et al.*, 2023), le nombre d'isolats génétiquement différents est virtuellement illimité et nous pourrions imaginer poursuivre indéfiniment ces études GWAS avec de nouveaux isolats et détecter de nouveaux QTL de résistance. Nous avons aussi caractérisé le spectre de virulence de 40 souches de *Z. tritici* sur les variétés de blé porteuses des gènes de résistance *Stb1* à *Stb16q*, et nous avons observé 33 spectres de virulence différents parmi ces 40 souches. Il est probable que la caractérisation de ces souches sur un nombre encore plus grand de sources de résistance aurait abouti à l'identification d'un nombre encore plus grand de spectres de virulence, et que nous pourrions indéfiniment caractériser de nouvelles souches pour identifier de nouveaux spectres de virulence. Nous avons également observé qu'il existait pour chacun des gènes de résistance testé, qu'il ait été identifié dans les variétés de blé françaises ou pas, des souches virulentes dans les populations françaises de *Z. tritici*. La complexité des interactions entre le blé et *Z. tritici*, du fait du nombre très important de facteurs de résistance dans le blé et de l'importante spécialisation aux variétés des isolats de *Z. tritici*, rend inconcevable l'identification et la caractérisation de tous les facteurs génétiques impliqués dans ces interactions. Cette très forte spécificité entre variétés résistantes et isolats sous-entend aussi que de nombreux gènes de résistance sont impliqués dans des interactions gène-pour-gène avec des gènes d'avirulence de *Z. tritici*. Ces interactions gène-pour-gène ont été mises en évidence dans le pathosystème blé-*Z. tritici* depuis le début des années 2000 (Kema *et al.*, 2000 ; Brading *et al.*, 2002), mais l'identification des premiers gènes *Stb* impliqués dans la résistance et gènes *AvrStb* reconnus par ces gènes de résistance est plus récente. Cela concerne notamment *Stb6* et *AvrStb6* (Zhong *et al.*, 2017 ; Santenac *et al.*, 2018), *AvrStb9* (Amezrou *et al.*, 2023), *Stb15* (Hafeez *et al.*, 2023) et *Stb16q* (Santenac *et al.*, 2021). Une particularité de ces interactions gène-pour-gène dans le pathosystème blé-*Z. tritici* est qu'elles peuvent concerner des résistances quantitatives, telles que cela a été montré pour *Avr3D1* (Meile *et al.*, 2018 & 2023) et *AvrStb20q* (Langlands-Perry *et al.*, 2023). Ces interactions gène-pour-gène pourraient donc concerner un très grand nombre des gènes ou QTL de résistance identifiés dans cette étude, faisant de l'identification des couples gène *Stb*-gène *AvrStb* un véritable défi dans ce pathosystème.

L'identification et la validation fonctionnelle des gènes impliqués dans l'interaction blé-*Z. tritici* est très importante afin de mieux comprendre ce pathosystème, de pouvoir introduire les gènes de résistance dans les variétés, et de pouvoir suivre l'efficacité des résistances ainsi que l'évolution des virulences correspondantes dans les populations de l'agent pathogène. Une meilleure connaissance des gènes d'avirulence de *Z. tritici* représente également un avantage certain pour détecter, caractériser et identifier les gènes de résistance dans le blé, notamment via des approches de sélection assistée par effecteurs (Vleeshouwers & Oliver, 2014). Le projet DivR a contribué à l'étude de trois gènes candidats précédemment identifiés au cours d'une étude GWAS pour être des facteurs du pouvoir pathogène de *Z. tritici* sur les variétés Cadenza (*Stb6*, *Stb9*, *Stb+*), Tadinia (*Stb6*, *Stb4*) et Arina (*Stb6*, *Stb15*) (Amezrou *et al.*, 2024). Seulement un de ces trois gènes, *Zt3\_00467*, a pu être validé pour son rôle dans le pouvoir pathogène de *Z. tritici* sur la variété Arina. Ce gène pourrait correspondre au facteur d'avirulence *AvrStb15* ou à l'avirulence vis-à-vis d'un autre gène de résistance présent dans la variété Arina. Notre difficulté à confirmer cette interaction reflète la difficulté susmentionnée de faire correspondre les gènes *Stb* avec les gènes *AvrStb* identifiés. D'autre part, notre difficulté à confirmer le rôle des autres gènes candidats dans le pouvoir pathogène de *Z. tritici* sur les variétés Cadenza et Tadinia pourrait être dû au caractère quantitatif des interactions rendant l'effet de ces gènes compliqué à mettre en évidence. L'identification des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de *Z. tritici* permet également d'envisager le développement d'outils moléculaires de suivi des populations de l'agent pathogène. Nous avons développé un test de séquençage d'amplicons basé sur la microfluidique, combinant les avantages du séquençage à haut débit et de la PCR multiplexée (Bellah *et al.*, 2023). Nous avons évalué les performances de 798 *loci* pour génotyper de manière fiable et sensible des marqueurs sélectionnés au hasard à l'échelle du génome, ainsi que des gènes liés à la pathogénicité et à la résistance aux fongicides. L'ensemble des marqueurs à l'échelle du génome fournit un outil pour évaluer la structure génétique des populations de *Z. tritici* directement à partir de feuilles de blé collectées sur le terrain. Une grande partie des marqueurs conçus peut être amplifiée de manière cohérente à travers les échantillons, et donc utilisée pour surveiller l'émergence de mutations pertinentes et fournir une évaluation des fréquences alléliques dans les populations de *Z. tritici*. L'analyse des amplicons concernant les gènes *AvrStb6* et *AvrStb9* a démontré la capacité de notre approche à détecter différents variants associés à la virulence ou à l'avirulence de *Z. tritici*, et à étudier la fréquence de ces variants à l'échelle nationale.

Les résultats du projet DivR ont donc permis de réaliser des avancées significatives dans notre connaissance du pathosystème blé tendre-*Z. tritici*, mais il est important de poursuivre l'effort sur l'identification des gènes de résistance dans le blé et des gènes d'avirulence chez *Z. tritici*, d'améliorer l'identification des couples de gènes *Stb-AvrStb*, et d'implémenter ces connaissances dans le développement d'outils d'aide au développement de variétés durablement résistantes à la maladie et dans le suivi des populations de l'agent pathogène.

## Références bibliographiques

- Amezrou R, Audéon C, et al.** (2023). A secreted protease-like protein in *Zymoseptoria tritici* is responsible for avirulence on Stb9 resistance gene in wheat. *PLoS Pathol.* 19(5): e1011376.
- Amezrou R, Ducasse A, et al.** (2024). Quantitative pathogenicity and host adaptation in a fungal plant pathogen revealed by whole-genome sequencing. *Nat. Comm.* 15(1): 1933.
- Arraiano LS, Brown JKM.** (2006). Identification of isolate-specific and partial resistance to septoria tritici blotch in 238 European wheat cultivars and breeding lines. *Plant Pathol.* 55(6):726-738.
- Arraiano LS, Chartrain L, et al.** (2007). A gene in European wheat cultivars for resistance to an African isolate of *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Pathol.* 56(1): 73-78.
- Bellah H, Gazeau G, et al.** (2023). A highly multiplexed assay to monitor pathogenicity, fungicide resistance and gene flow in the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *PLoS ONE* 18(2): e0281181.
- Brading PA, Verstappen ECP, et al.** (2002). A gene-for-gene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the *Septoria tritici* blotch pathogen. *Phytopathology* 92(4): 439-445.
- Brown JKM, Chartrain L, et al.** (2015). Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genetics and Biology* 79:33-41.
- Chartrain L, Sourdille P, et al.** (2009). Identification and location of Stb9, a gene for resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat cultivars Courtot and Tonic. *Plant. Pathol.* 58:547-555.
- Cohen L, Eyal Z.** (1993). The histology of processes associated with the infection of resistant and susceptible wheat cultivars with *Septoria tritici*. *Plant Pathol.* 42(5):737-743
- Do Amaral AM, Antoniw J, et al.** (2012). Defining the predicted protein secretome of the fungal wheat leaf pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS ONE* 7(12): e49904.
- Feurtey A, Lorrain C, et al.** (2023). A thousand-genome panel retraces the global spread and adaptation of a major fungal crop pathogen. *Nat. Comm.* 14(1): 1059.
- Fraaije B A, Cools HJ, et al.** (2007). A novel substitution I381V in the sterol 14 -demethylase (CYP51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. *Mol. Plant Pathol.* 8(3): 245-254.
- Garnault M, Duplaix C, et al.** (2019). Spatiotemporal dynamics of fungicide resistance in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in France. *Pest Manag. Sci.* 75(7): 1794-1807.
- Garnault M, Duplaix C, et al.** (2020). Large-scale study validates that regional fungicide applications are major determinants of resistance evolution in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in France. *New Phytol.* 229: 3508-3521.
- Ghaffary SMT, Robert O, et al.** (2011). Genetic analysis of resistance to septoria tritici blotch in the French winter wheat cultivars Balance and Apache. *Theor. Appl. Genet.* 123(5):741-754.
- Goodwin SB, Ben M'Barek S, et al.** (2011). Finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals dispensome structure, chromosome plasticity, and stealth pathogenesis. *PLoS Genet.* 7(6): e1002070.
- Hafeez AN, Chartrain L, et al.** (2023). *Septoria tritici* blotch resistance gene Stb15 encodes a lectin receptor-like kinase. *bioRxiv*: 2023.09.11.557217.
- Hartmann FE, Croll D.** (2017). Distinct Trajectories of massive recent gene gains and losses in populations of a microbial eukaryotic pathogen. *Mol. Biol. Evol.* 34:2808-2822.
- Huang M, Liu X, et al.** (2018). BLINK: a package for the next level of genome-wide association studies with both individuals and markers in the millions. *GigaScience* 8(2).
- Karasov TL, Horton MW, Bergelson J.** (2014). Genomic variability as a driver of plant-pathogen coevolution? *Curr. Opin. Plant Biol.* 18:24-30.
- Kema GHJ, Gohari AM, et al.** (2018). Stress and sexual reproduction affect the dynamics of the wheat pathogen effector AvrStb6 and strobilurin resistance. *Nat. Genet.* 50(3): 375-380.
- Kildea S, Byrne JJ, et al.** (2020). First report of virulence to the septoria tritici blotch resistance gene Stb16q in the Irish *Zymoseptoria tritici* population. *New Dis. Rep.* 41(1): 13-13.
- Langlands-Perry C, Cuenin M, et al.** (2022). Resistance of the wheat cultivar «Renan» to *Septoria* leaf blotch explained by a combination of strain specific and strain non-specific QTL mapped on an ultra-dense genetic map. *Genes* 13(1).
- Langlands-Perry C, Pitarch A, et al.** (2023). Quantitative and qualitative plant-pathogen interactions call upon similar pathogenicity genes with a spectrum of effects. *Front. Plant Sci.* 14.
- Mahboubi M, Talebi R, et al.** (2022). Genetic analysis of novel resistance sources and genome-wide association mapping identified novel QTLs for resistance to *Zymoseptoria tritici*, the causal agent of septoria tritici blotch in wheat. *J. Appl. Genet.* 63: 429-445.
- Mangin B, Siberchicot A, et al.** (2012). Novel measures of linkage disequilibrium that correct the bias due to population structure and relatedness. *Heredity* 108(3): 285-291.
- McDonald MC, McDonald BA, Solomon PS.** (2015). Recent advances in the *Zymoseptoria tritici*-wheat interaction: insights from pathogenomics. *Front. Plant Sci.* 6(102).
- Meile L, Croll D., et al.** (2018). A fungal avirulence factor encoded in a highly plastic genomic region triggers partial resistance to septoria tritici blotch. *New Phytol.* 219(3): 1048-1061.
- Meile L., Garrido-Arandia M, et al.** (2023). Natural variation in Avr3D1 from *Zymoseptoria* sp. contributes to quantitative gene-for-gene resistance and to host specificity. *New Phytol.* 238(4): 1562-1577.
- Mekonnen T, Sneller CH, et al.** (2021). Genome-wide association study reveals novel genetic loci for quantitative resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front. Plant Sci.* 12.
- Omrane S, Audéon C, et al.** (2017). Plasticity of the MFS1 promoter leads to multidrug resistance in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *mSphere* 2(5): e00393-17.
- Omrane S, Sghyer H, et al.** (2015). Fungicide efflux and the MgMFS1 transporter contribute to the multidrug resistance phenotype in *Zymoseptoria tritici* field isolates. *Environ. Microbiol.* 17(8): 2805-2823.

- Palma-Guerrero J, Torriani SFF, et al.** (2015). Comparative transcriptome analyses of *Zymoseptoria tritici* strains show complex lifestyle transitions and intra-specific variability in transcription profiles. *Mol. Plant Pathol.* 17(6):845-859.
- Palmer C-L, Skinner W.** (2002). *Mycosphaerella graminicola*: latent infection, crop devastation and genomics. *Mol. Plant Pathol.* 3(2):63-70.
- Paux E, Lafarge S, et al.** (2022). Breeding for economically and environmentally sustainable wheat varieties: an integrated approach from genomics to selection. *Biology* 11(1): 149.
- R Core Team.** R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, (2021).
- Riaz A, KockAppelgren P, et al.** (2020). Genetic analysis using a multi-parent wheat population identifies novel sources of *Septoria tritici* blotch resistance. *Genes* 11(8).
- Rimbert H, Darrier B, et al.** (2018). High throughput SNP discovery and genotyping in hexaploid wheat. *PLoS ONE* 13(1): e0186329.
- Rosyara UR, De Jong WS, et al.** (2016). Software for genome-wide association studies in autopolyploids and its application to potato. *Plant Genome* 9(2).
- Rudd J, Kanyuka K, et al.** (2015). Transcriptome and metabolite profiling the infection cycle of *Zymoseptoria tritici* on wheat (*Triticum aestivum*) reveals a biphasic interaction with plant immunity involving differential pathogen chromosomal contributions, and a variation on the hemibiotrophic lifestyle definition. *Plant Physiol.* 167(3):1158-85.
- Saintenac C, Cambon F, et al.** (2021). A wheat cysteine-rich receptor-like kinase confers broad-spectrum resistance against *Septoria tritici* blotch. *Nat. Comm.* 12(1): 433.
- Saintenac C, Lee W-S, et al.** (2018). Wheat receptor-kinase-like protein *Stb6* controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Nature Genetics* 50(3): 368-374.
- Sánchez-Vallet A, McDonald MC, et al.** (2015). Is *Zymoseptoria tritici* a hemibiotroph? *Fungal Genetics and Biology* 79(0): 29-32.
- Selin C, de Kievit TR, et al.** (2016). Elucidating the role of effectors in plant-fungal interactions: Progress and Challenges. *Front. Microbiol.* 7.
- Steinhauer D, Salat M, et al.** (2019). A dispensable paralog of succinate dehydrogenase subunit C mediates standing resistance towards a subclass of SDHI fungicides in *Zymoseptoria tritici*. *PLoS Pathog.* 15(12): e1007780.
- Suffert F, Delestre G, et al.** (2016). Fashionably late partners have more fruitful encounters: Impact of the timing of co-infection and pathogenicity on sexual reproduction in *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genetics and Biology* 92:40-49.
- Suffert F, Delestre G, Gélisse S.** (2019). Sexual reproduction in the fungal foliar pathogen *Zymoseptoria tritici* is driven by antagonistic density dependence mechanisms. *Microb. Ecol.* 77: 110-123.
- Suffert F, Sache I.** (2011). Relative importance of different types of inoculum to the establishment of *Mycosphaerella graminicola* in wheat crops in north-west Europe. *Plant Pathol.* 60(5):878-889.
- Torriani SFF, Brunner PC, et al.** (2009). QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag. Sci.* 65(2): 155-162.
- Vleeshouwers VGAA, Oliver RP.** (2014). Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27(3): 196-206.
- Waalwijk C, Mendes O, et al.** (2002). Isolation and characterization of the mating-type idiomorphs from the wheat *septoria* leaf blotch fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology* 35(3):277-286.
- Wang J, Zhang Z.** (2021). GAPIT version 3: boosting power and accuracy for genomic association and prediction. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 19: 629-640.
- Yang N, McDonald MC, et al.** (2018). Genetic mapping of *Stb19*, a new resistance gene to *Zymoseptoria tritici* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 131: 2765-2773.
- Yang N, Ovenden B, et al.** (2022). Multi-stage resistance to *Zymoseptoria tritici* revealed by GWAS in an Australian bread wheat diversity panel. *Front. Plant Sci.* 13.
- Yates S, Mikaberidze A, et al.** (2022). Precision phenotyping reveals novel loci for quantitative resistance to *Septoria tritici* blotch. *Plant Phenomics* 2019: 3285904
- Zakieh M, Alemu A, et al.** (2023). Exploring GWAS and genomic prediction to improve *Septoria tritici* blotch resistance in wheat. *Sci. Rep.* 13(1): 15651.
- Zhan J, Stefanato FL, McDonald, BA.** (2006). Selection for increased cyproconazole tolerance in *Mycosphaerella graminicola* through local adaptation and in response to host resistance. *Mol. Plant Pathol.* 7(4): 259-268.
- Zhang Z, Ersoz E, et al.** (2010). Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 42: 355-360.
- Zhu T, Wang L, et al.** (2021). Optical maps refine the bread wheat *Triticum aestivum* cv Chinese Spring genome assembly. *The Plant Journal* 107(1): 303-314.
- Zhong Z, Marcel TC, et al.** (2017). A small secreted protein in *Zymoseptoria tritici* is responsible for avirulence on wheat cultivars carrying the *Stb6* resistance gene. *New Phytol.* 214(2): 619-631.
- Zwiers L-H, de Waard MA.** (2001). Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene disruption in the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Curr. Genet.* 39: 388-393.

## DivR : Des outils moléculaires pour la sélection de résistances diversifiées et efficaces contre la septoriose du blé

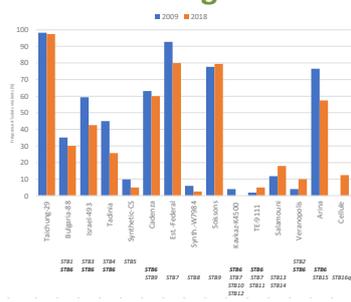
Thierry C. MARCEL<sup>1\*</sup>, Gwilherm GAZEAU<sup>1</sup>, Hadjer BELLAH<sup>2</sup>, Jean-Noël THAUVIN<sup>3</sup>, Sandrine GELISSE<sup>1</sup>, Emmie DZIALO<sup>1</sup>, Adeline SIMON<sup>1</sup>, Reda AMEZROU<sup>1</sup>, Ellen GOUDEMAND<sup>4</sup>, Benoit FOUCAULT<sup>5</sup>, Nicholas BIRD<sup>6</sup>, Gemma MOLERO MILAN<sup>5</sup>, Sébastien CAIVEAU<sup>7</sup>, Alexander LOLADZE<sup>7</sup>, Andrea SÁNCHEZ-VALLET<sup>8</sup>, Daniel CROLL<sup>2</sup>, Cyrille SAINTENAC<sup>3</sup>

1 - Univ Paris-Saclay, INRAE, UR BIOGER, Palaiseau, FR  
 2 - Univ Neuchâtel, Lab Evol Genet, Neuchâtel, CH  
 3 - UCA, INRAE, GDEC, Clermont-Ferrand, FR  
 4 - Florimond-Desprez V&F SAS, Cappelle-en-Pévèle, FR  
 5 - KWS, Momont Recherche, Mons-en-Pévèle, FR

6 - KWS UK Ltd, Thriplow, Hertfordshire, UK  
 7 - Syngenta France SAS, Chartres, FR  
 8 - CBGP, UPM-INIA, Campus de Montegancedo UPM, Madrid, ES  
 \*Coordinateur : thierry.marcel@inrae.fr

**La septoriose, causée par le champignon *Zyloseptoria tritici*, est une maladie très nuisible affectant la culture du blé.** La sélection de nouvelles variétés résistantes à la septoriose est ralentie par notre méconnaissance des gènes de résistance présents dans nos variétés ainsi que par la complexité à surveiller l'évolution de l'efficacité de ces gènes vis-à-vis des populations de *Z. tritici* génétiquement très diversifiées. Le projet FSOV 2018 S DivR avait pour objectifs le développement d'outils de marquage moléculaire des gènes de résistance présents dans les variétés et de suivi des populations fongiques.

### Efficacité des gènes de résistance *Stb*

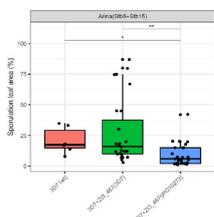


**Figure 1.** Fréquence de virulence d'isolats Français de *Z. tritici* collectés en 2009 (n=103) et en 2018 (n=40) sur des variétés de blé portant les gènes *Stb1* à *Stb16q*

- La fréquence d'isolats virulents est très variable d'une variété à une autre mais a globalement peu évolué entre 2009 et 2018.
- Des isolats virulents ont été identifiés sur toutes les variétés mais les gènes de résistance *Stb2*, *Stb5*, *Stb8*, *Stb11*, *Stb10* et *Stb12* restent les plus efficaces.

### Identification des gènes *AvrStb* chez *Z. tritici*

Une étude GWAS a permis d'identifier 65 gènes candidats pour leur implication dans le pouvoir pathogène de *Z. tritici* sur 15 variétés de blé tendre différentielles pour les gènes de résistance *Stb* qu'elles portent.<sup>2</sup>



**Figure 3.** Pourcentage de surface foliaire sporulante sur la variété Arina après inoculation avec la souche ST99CH\_3D7 (n=6), les mutants ectopiques portant l'allèle 3D7 (virulent) du gène *Zt\_00467* (n=27) et les mutants ectopiques portant l'allèle IPO10273 (avirulent) (n=27).

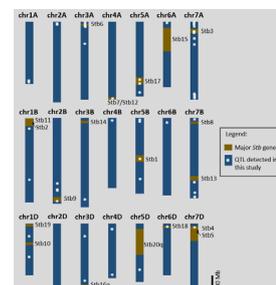
- Zt\_00467* encode une petite protéine sécrétée jouant un rôle dans le pouvoir pathogène de *Z. tritici* sur la variété Arina (*Stb6*, *Stb15*).

Articles en lien avec le projet:

<sup>1</sup>Thauvin *et al.* En préparation; <sup>2</sup>Amezrou *et al.* (2024). *Nat. Comm.* 15(1): 1933; <sup>3</sup>Bellah *et al.* (2023). *PLoS ONE* 18(2): e0281181;

### Identification des gènes *Stb* dans les variétés françaises

Une étude d'association à l'échelle du génome (GWAS) a été réalisée sur un panel de 285 variétés inoculé avec 10 isolats sur plantules en conditions contrôlées et 2 isolats sur plantes adultes au champ.<sup>1</sup>

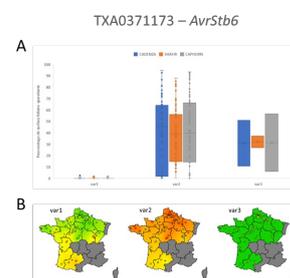


**Figure 2.** Comparaison entre la position des 57 QTL de résistance et des gènes *Stb* connus sur RefSeq v2.1.

- 57 régions génomiques impliquées dans la résistance, dont 10 nouveaux QTL détectés.
- Les QTL détectés sont fortement dépendants de l'isolat utilisé, du stade de développement du blé, et de l'environnement.

### Suivi des populations de *Z. tritici* en France

Nous avons développé un test de séquençage d'amplicons, combinant séquençage à haut débit et PCR multiplexée<sup>3</sup>, ciblant des SNP associés à des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène (65), la résistance aux fongicides (25), ou répartis aléatoirement le long du génome (691).



**Figure 4.** A) Association entre 3 variants identifiés pour l'amplicon TXA0371173 et la virulence sur des variétés portant *Stb6*, et B) répartition géographique des 3 variants.

- Capacité de suivre les fréquences alléliques dans les populations de *Z. tritici*.

FSOV 2018 S

