

FsoV



syngenta



FSOV 2018 S DivR – Des outils moléculaires pour la sélection de résistances diversifiées et efficaces contre la septoriose du blé

Thierry C. MARCEL*, Gwiltherm GAZEAU, Hadjer BELLAH, Jean-Noël THAUVIN, Sandrine GELISSE, Emmie DZIALO, Adeline SIMON, Reda AMEZROU, Ellen GOUEMAND, Benoit FOUCAULT, Nicholas BIRD, Gemma MOLERO MILAN, Sébastien CAIVEAU, Alexander LOLADZE, Andrea SÁNCHEZ-VALLET, Daniel CROLL, Cyrille SAINTENAC

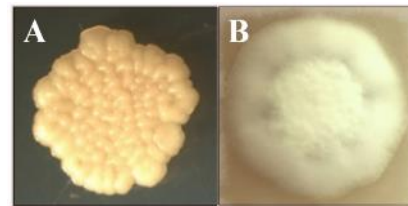


INTRODUCTION

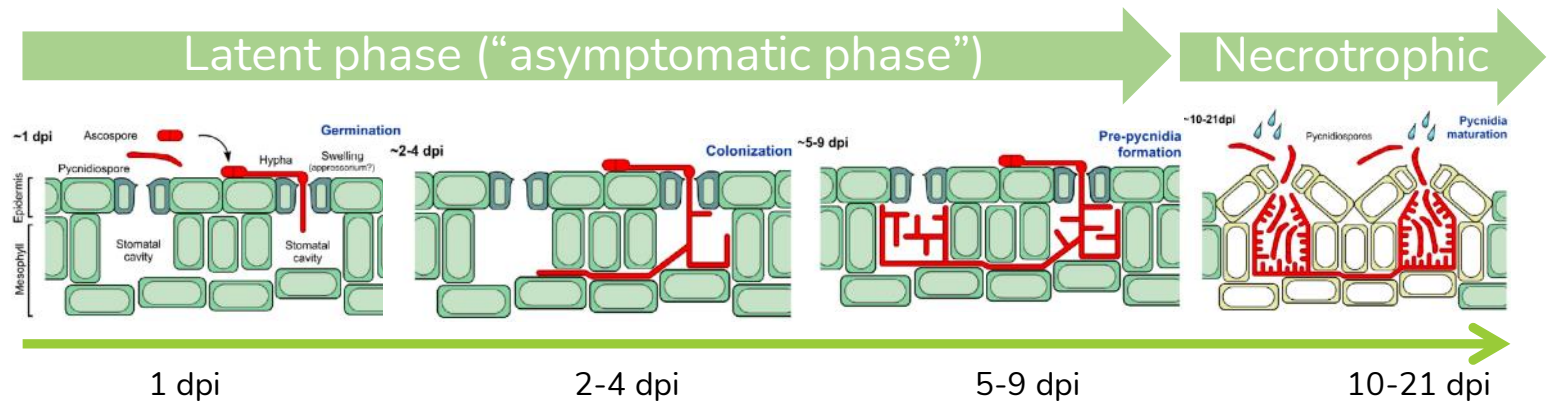
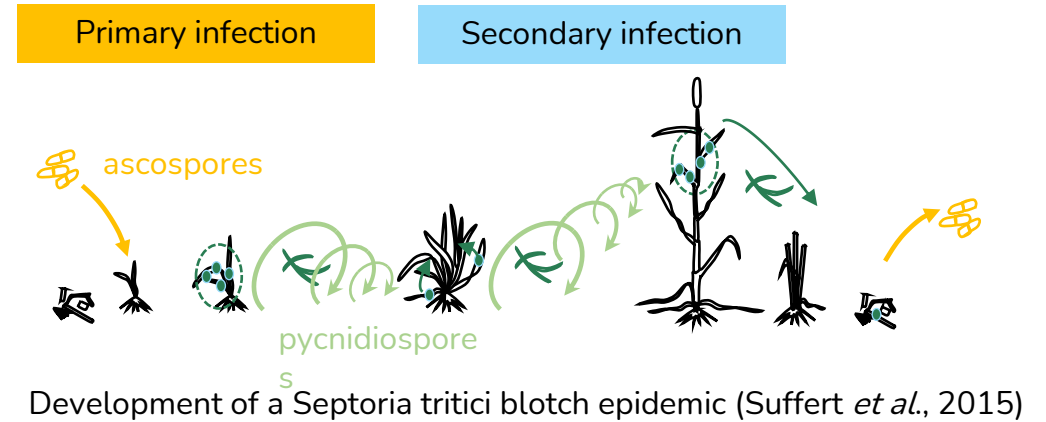
Maladie de la septoriose sur le blé



- Ascomycete (Dothideales)
- Heterothallic (Mat1, Mat2)
- Dimorphic (yeast, mycelium)
- Latent necrotroph



Dimorphism of *Z. tritici*:
 A: yeast form
 B: mycelium form
 (Picture by Solweig LUCE)



Plant infection stages of *Zymoseptoria tritici* (Steinberg, 2015)



INTRODUCTION

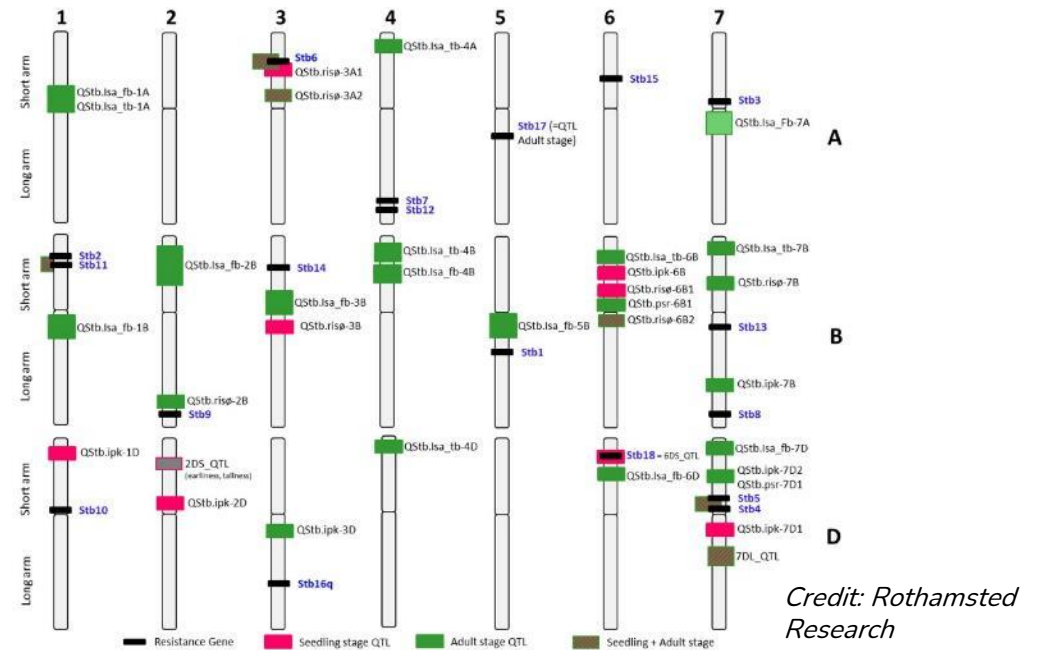
Génétique de la résistance à *Z. tritici*



Gènes de résistance connus dans le Blé Tendre:

(revus par Brown *et al.*, 2015)

- 23 gènes de résistance *Stb*
- 89 QTL dont 27 meta-QTL
- Des études GWAS récentes...



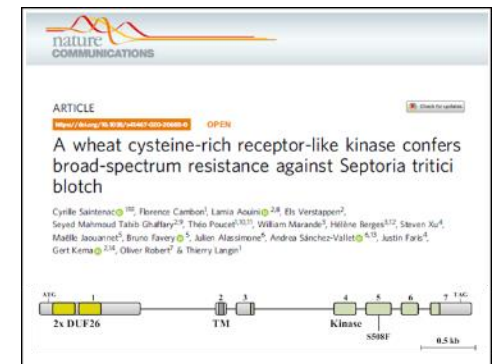
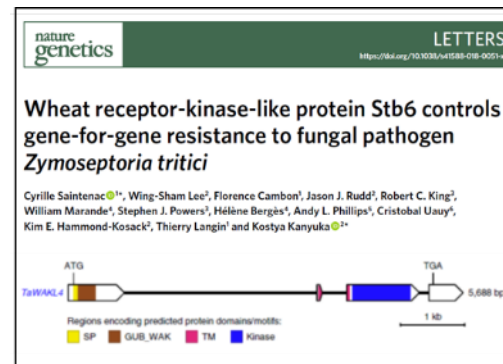
Peu d'études conduites dans le Blé Dur:

- Quelques études GWAS (Kidane *et al.*, 2017; Ballini *et al.*, 2020)
- QTL dans la variété de pays 'Agili39' (Ferjaoui *et al.*, 2022)

Clonage des gènes *Stb6*, *Stb16q*, *Stb15*

(Saintenac *et al.* 2018 & 2021; Hafeez *et al.* 2023)

- Codent pour des RLK ('receptor-like protein kinases') de trois sous-familles différentes



Credit: Rothamsted Research

INTRODUCTION

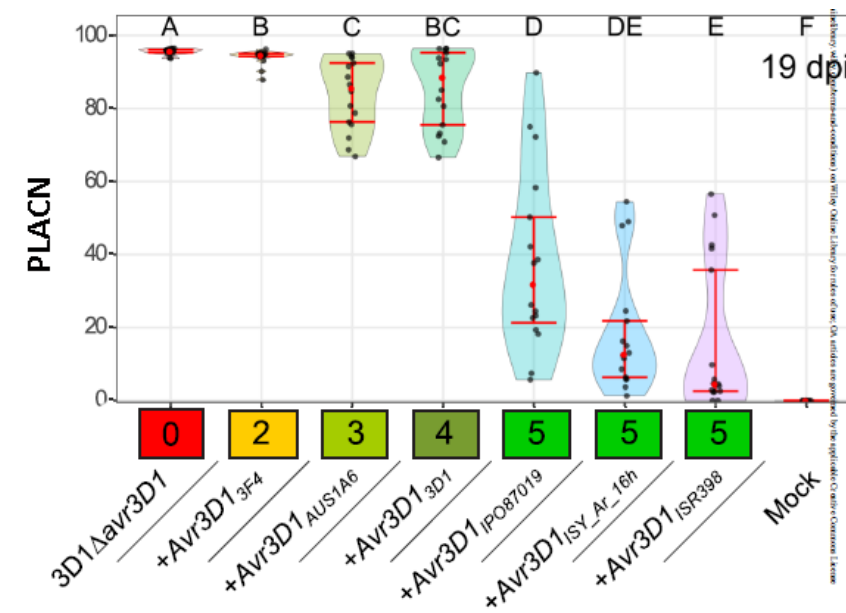
Interactions qualitative et quantitative entre gènes *Stb* et gènes *AvrStb*

AvrStb6, une petite protéine secrétée responsable de l'avirulence sur les variétés de blé portant le gène de résistance *Stb6* (Zhong *et al.*, 2017)



> L'interaction *Stb6-AvrStb6* conduit à une réaction de résistance complète à la maladie (asymptomatique)

Avr3D1, une petite protéine secrétée qui déclenche une résistance partielle à STB (Meile *et al.*, 2018)



> Différentes isoformes d'Avr3D1 conduisent à différents niveaux d'infection (Meile *et al.*, 2023)



INTRODUCTION

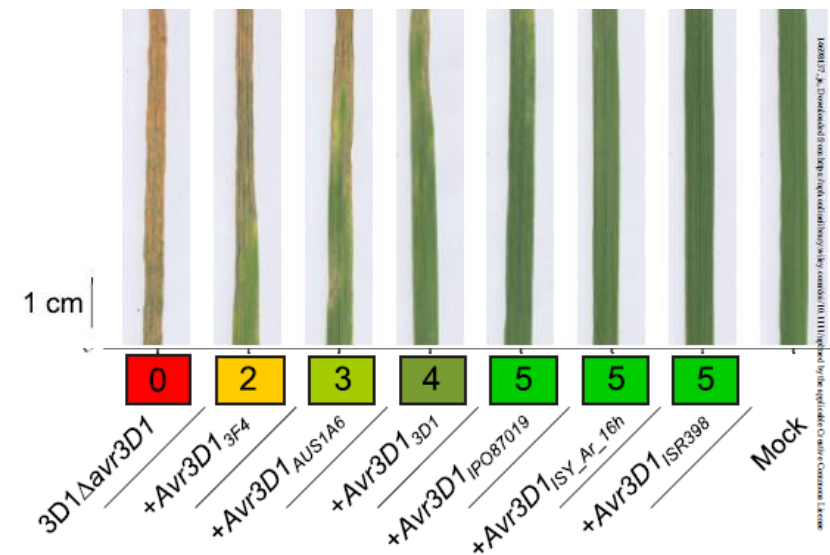
Interactions qualitative et quantitative entre gènes *Stb* et gènes *AvrStb*

AvrStb6, une petite protéine secrétée responsable de l'avirulence sur les variétés de blé portant le gène de résistance *Stb6* (Zhong *et al.*, 2017)



> L'interaction *Stb6-AvrStb6* conduit à une réaction de résistance complète à la maladie (asymptomatique)

Avr3D1, une petite protéine secrétée qui déclenche une résistance partielle à STB (Meile *et al.*, 2018)



> Différentes isoformes d'Avr3D1 conduisent à différents niveaux d'infection (Meile *et al.*, 2023)



INTRODUCTION

FSOV 2018 S DivR – Des outils moléculaires pour la sélection de résistances diversifiées et efficaces contre la septoriose du blé

Objectif: Intégrer nos connaissances sur la génétique de la résistance à la septoriose et la génétique du pouvoir pathogène de *Zymoseptoria tritici* pour développer des outils moléculaires permettant de sélectionner des variétés de blé plus durablement résistantes à la maladie.

WP1 : Une collection d'isolats et de populations récents de *Z. tritici*

> Constitution d'une nouvelle collection de souches de référence et d'une banque d'ADNs de *Zt*

WP2 : Une méthode pour suivre l'émergence des virulences dans les populations de *Z. tritici*

> Identification des gènes *AvrStb* et suivi de leurs fréquences alléliques dans les populations de *Zt*

WP3: Des marqueurs SNP associés aux gènes de résistance *Stb* présents dans les variétés de blé tendre françaises

> Identification des résistances dans les variétés françaises par des études GWAS et méta-analyses



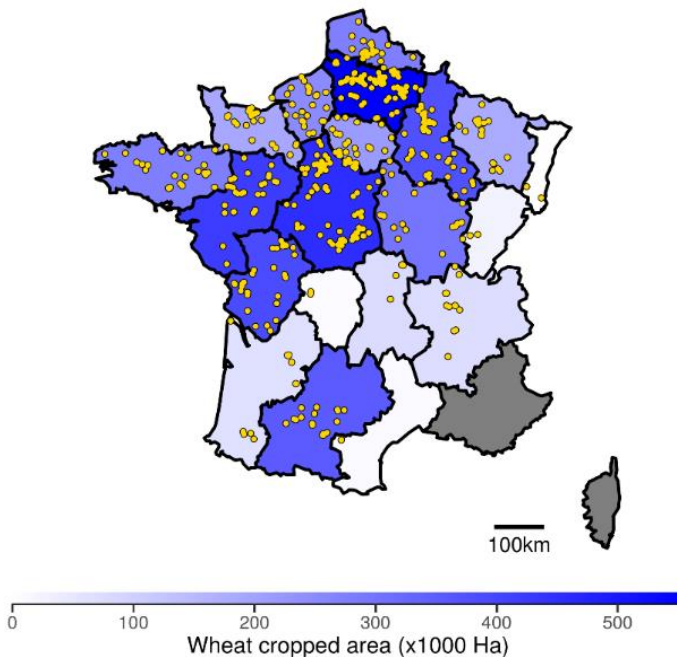
WP1 : Collections d'isolats et d'ADNs

- a- Constitution d'une banque d'ADN de populations françaises de *Zt*
- b- Une nouvelle collection de souches de référence de *Zt*

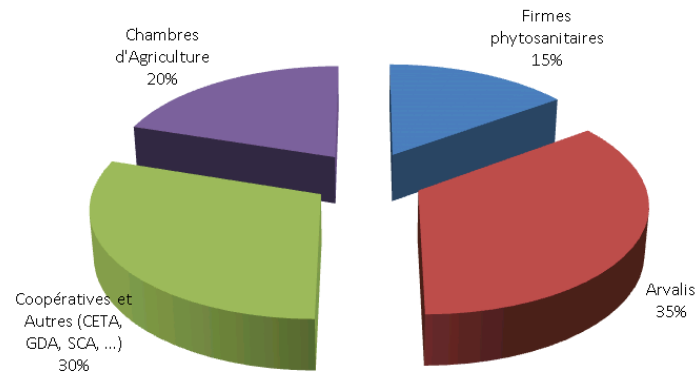
PERFORMANCE Network



Geographic distribution of trials from PERFORMANCE Network between 2004 and 2017



Repartition of trials from PERFORMANCE Network between 2004 and 2017



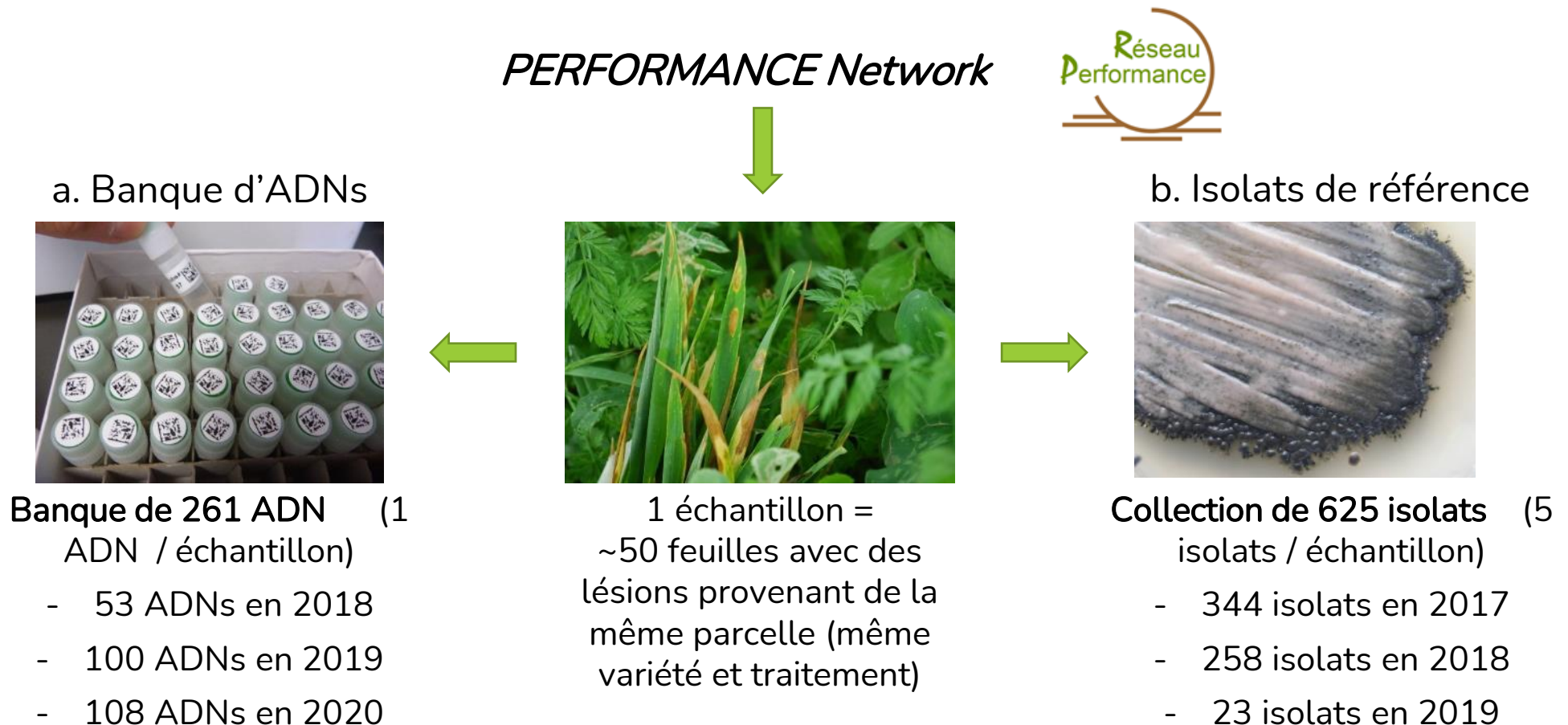
- >1000 essais en France depuis 2004
- Protocoles communs mis-à-jour chaque année
- Suivi des résistances aux fongicides dans les populations de *Z. tritici*
- Déterminer la performance des traitements dans un contexte de développement des résistances

(Garnault *et al.*, 2019, 2020)



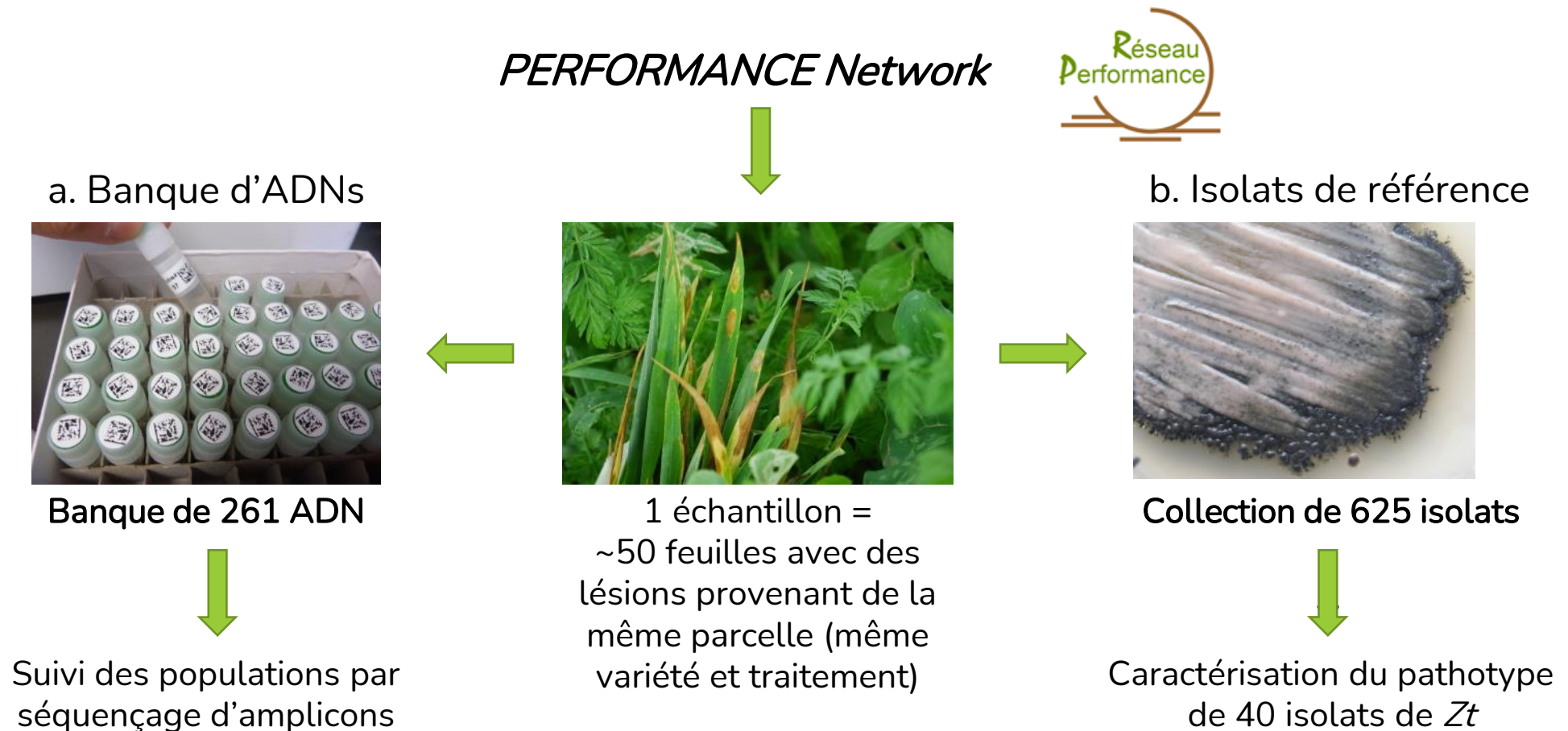
WP1 : Collections d'isolats et d'ADNs

- a- Constitution d'une banque d'ADN de populations françaises de *Zt*
- b- Une nouvelle collection de souches de référence de *Zt*



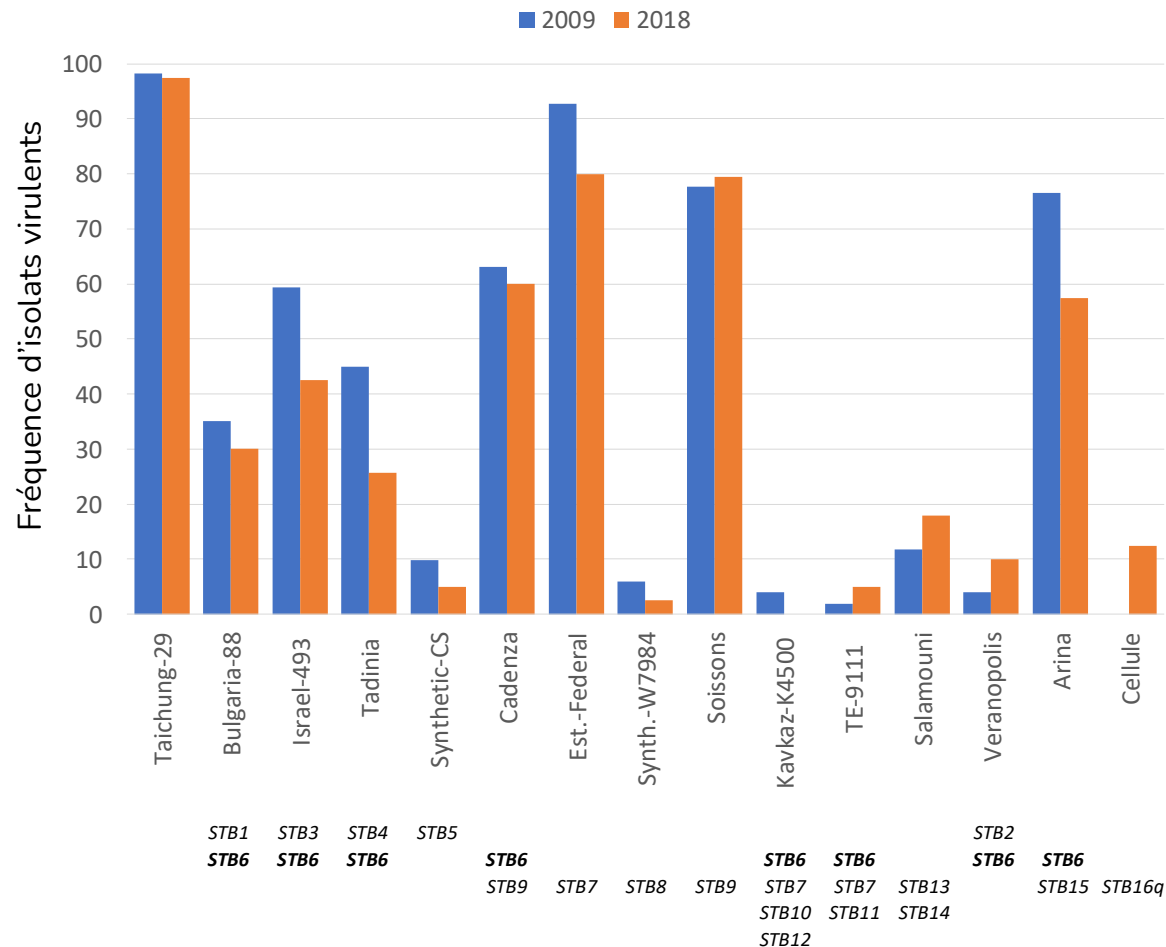
WP1 : Collections d'isolats et d'ADNs

- a- Constitution d'une banque d'ADN de populations françaises de *Zt*
- b- Une nouvelle collection de souches de référence de *Zt*



WP1 : Collections d'isolats et d'ADNs

- a- Constitution d'une banque d'ADN de populations françaises de *Zt*
- b- Une nouvelle collection de souches de référence de *Zt*



Fréquence de virulences parmi les isolats de *Z. tritici* collectées en France en 2009 (n=103; en bleu) et en 2018 (n=40; en orange).

> 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.



WP2 : Suivi des populations de *Z. tritici*

Identification de gènes impliqués dans le pouvoir pathogène par GWAS

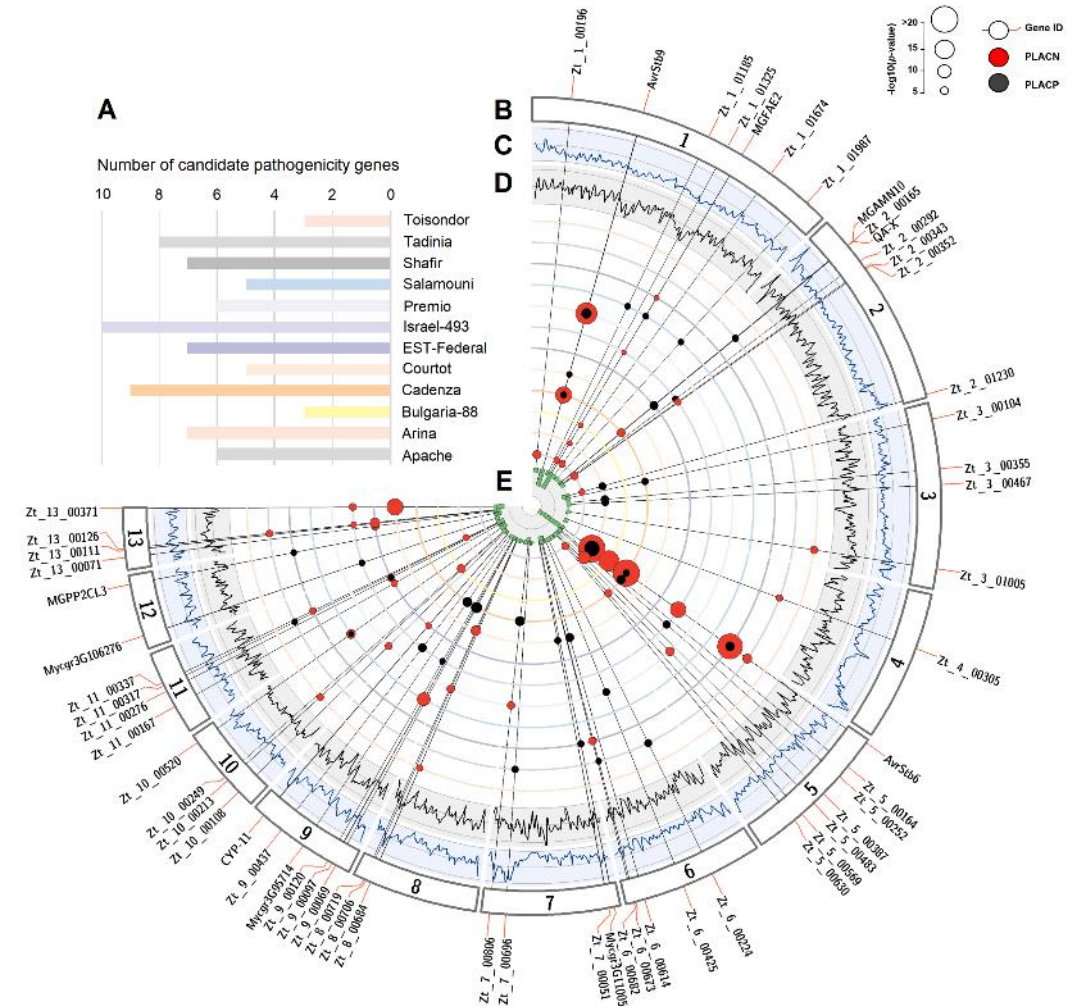
Utilisation des pathotypes de 103 isolats français collectés en 2009 pour l'identification de gènes *Avr* par GWAS (Projet ANR Gandalf).

> L'architecture génétique de la pathogénicité de *Z. tritici* est complexe: polygénique et majoritairement quantitative.

> Les gènes de pathogénicité sont pour la plupart spécifiques de la variété hôte testée.

> Nous avons identifié 65 gènes de pathogénicité candidats, dont 19 sont surexprimés pendant l'infection incl. *AvrStb6* et *AvrStb9*.

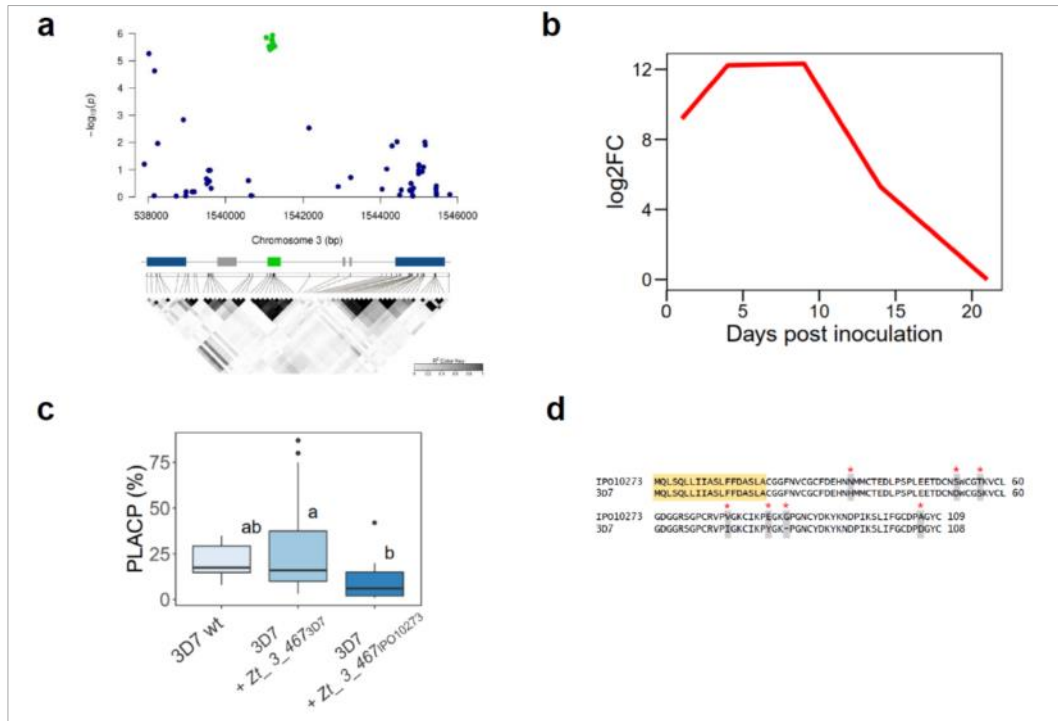
DivR: Validation fonctionnelle de 3 gènes candidats



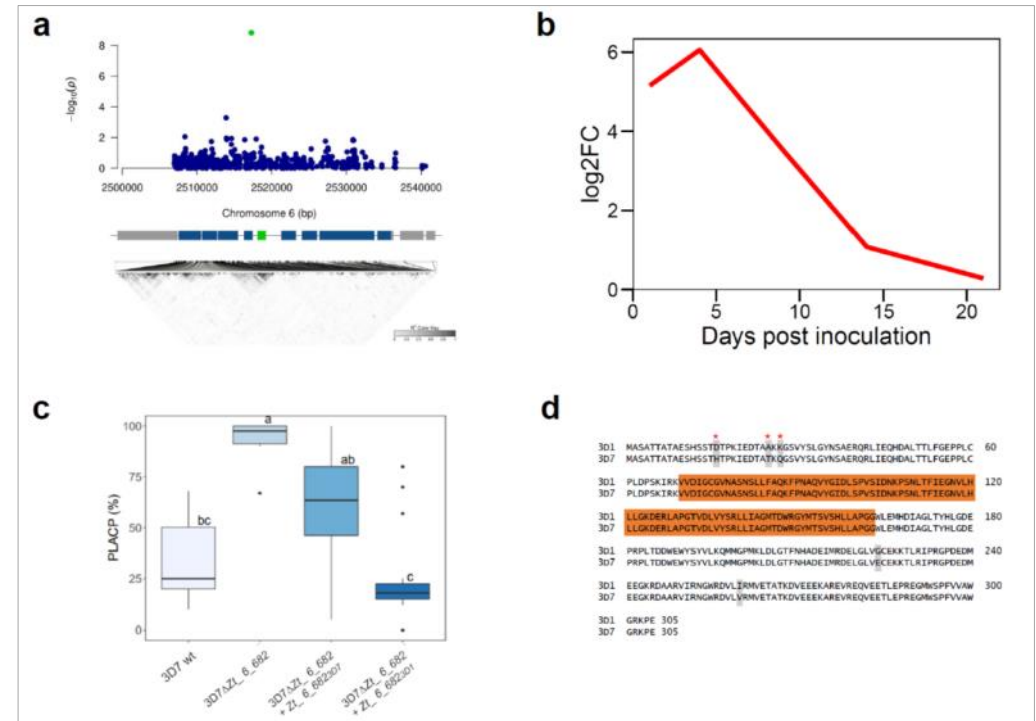
WP2 : Suivi des populations de *Z. tritici*

a- Validation fonctionnelle de gènes d'avirulence candidats

Zt_3_00467, un gène typique des effecteurs



Zt_6_00682, une méthyltransférase



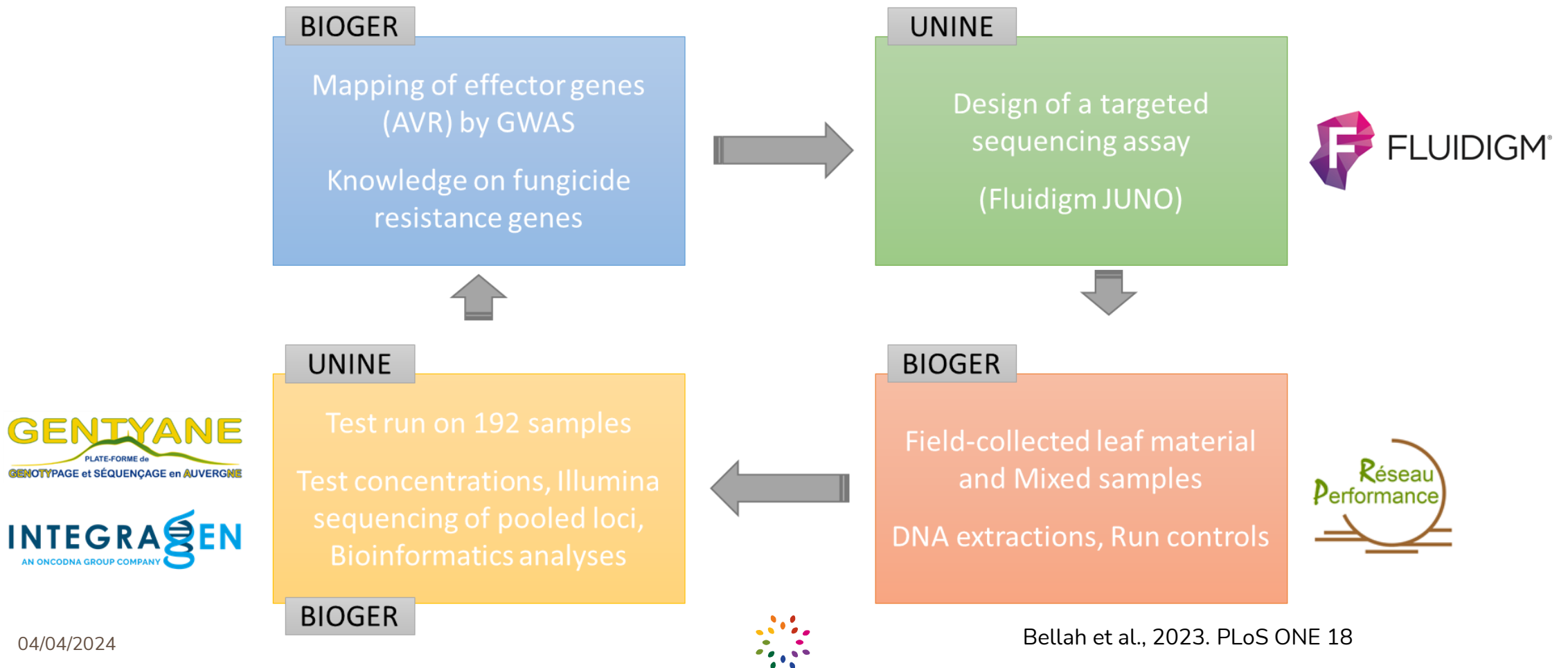
> Les gènes impliqués dans la pathogénicité de *Z. tritici* peuvent encoder des petites protéines secrétées typiques des effecteurs, mais peuvent aussi encoder des protéines prédites sans signal de sécrétion.



WP2 : Suivi des populations de *Z. tritici*

c- Fréquence des virulences dans les populations françaises de *Zt*

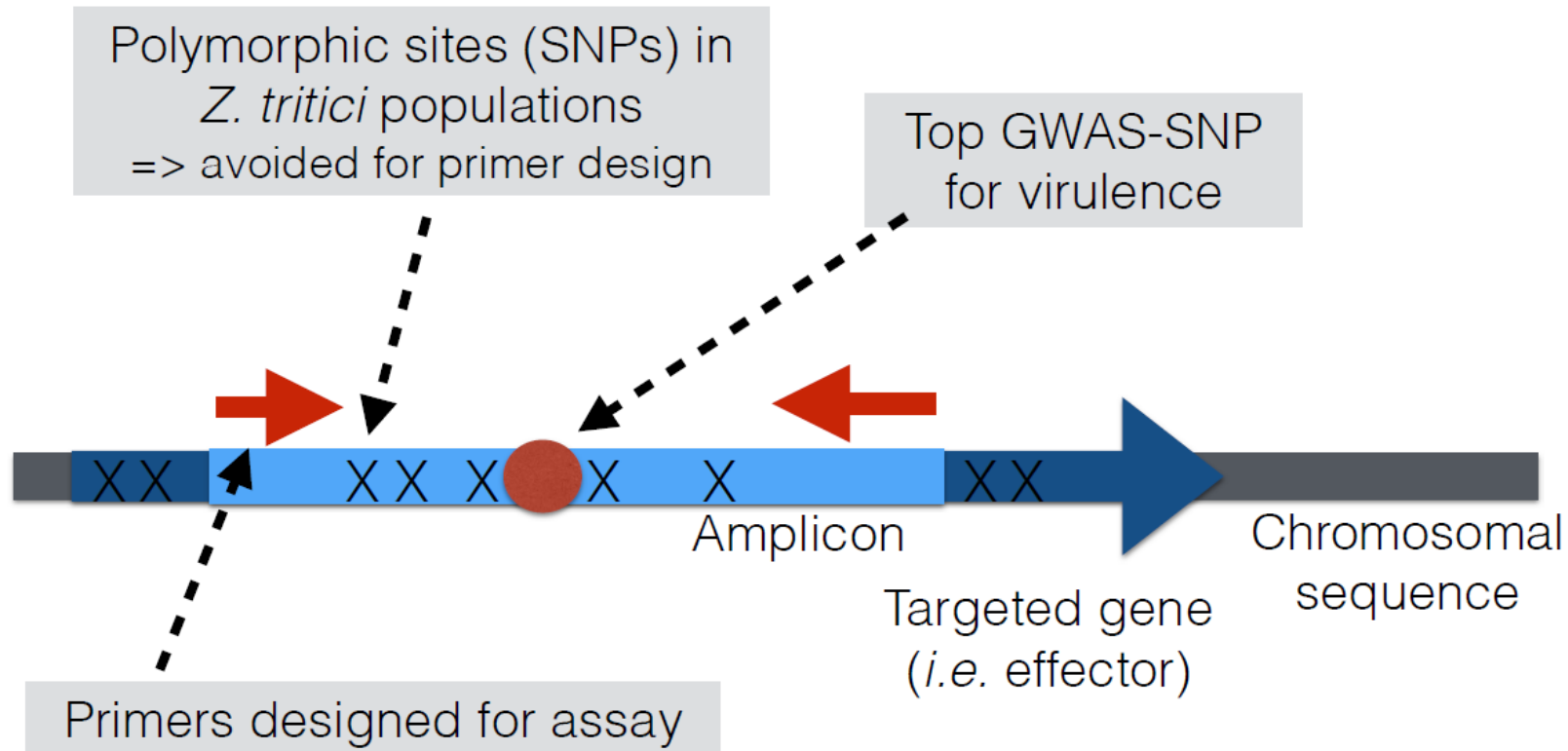
Mise au point d'une méthode de séquençage ciblé d'amplicons pour suivre les virulences, les résistances aux fongicides et les flux de gènes dans les populations de *Z. tritici*.



WP2 : Suivi des populations de *Z. tritici*

c- Fréquence des virulences dans les populations françaises de *Zt*

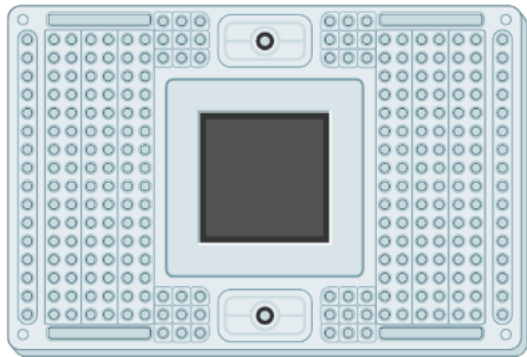
La conception des amorces a été optimisée en intégrant les données de polymorphisme de 632 génomes de *Zymoseptoria tritici*.



WP2 : Suivi des populations de *Z. tritici*

c- Fréquence des virulences dans les populations françaises de *Zt*

Amplification in microfluidic chambers on a chip



24 pools or primers
798 primer pairs

- 65 amplicons: gènes de pathogénicité candidats
- 41 amplicons: gènes de résistance aux fongicides
- 691 amplicons: marqueurs neutres, suivi de la diversité génétique

192 samples



NovaSeq 6000 Illumina sequencing of amplicons



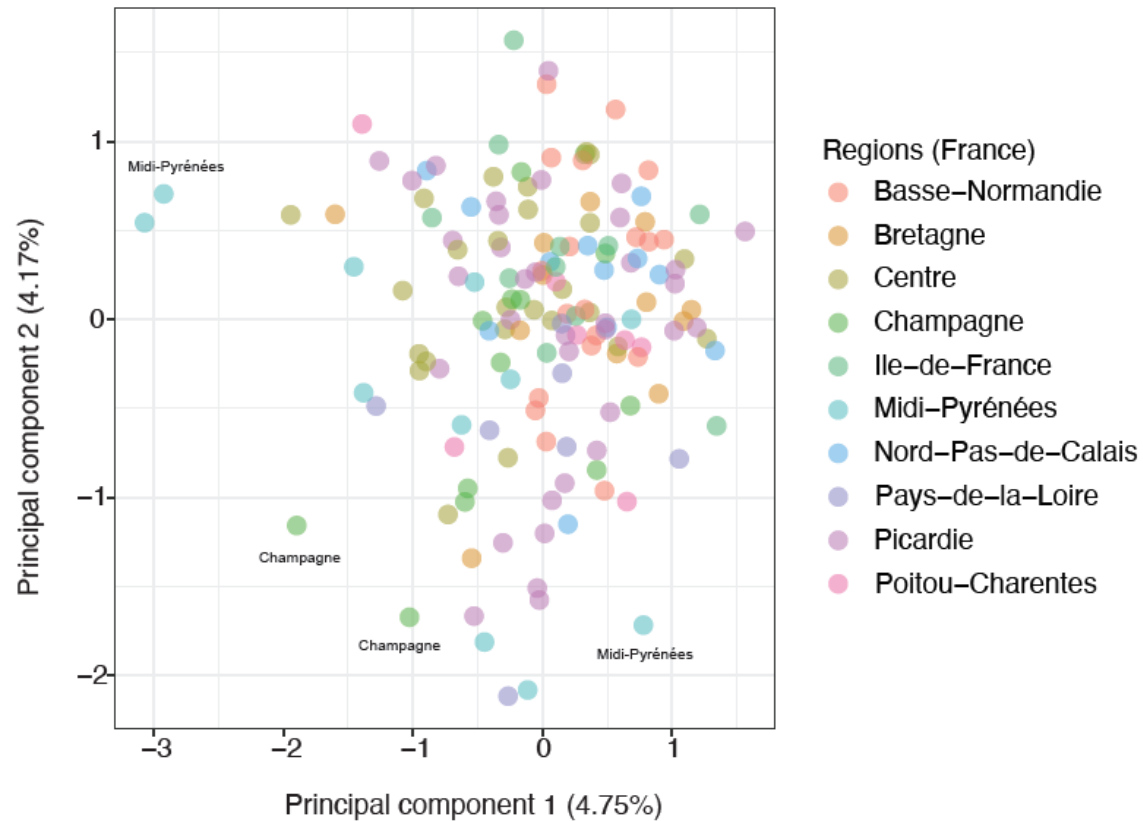
Banque d'ADNs

→ Deux répétitions: 2 418 905 407 paires de lecture (338,89 Gb)



WP2 : Suivi des populations de *Z. tritici*

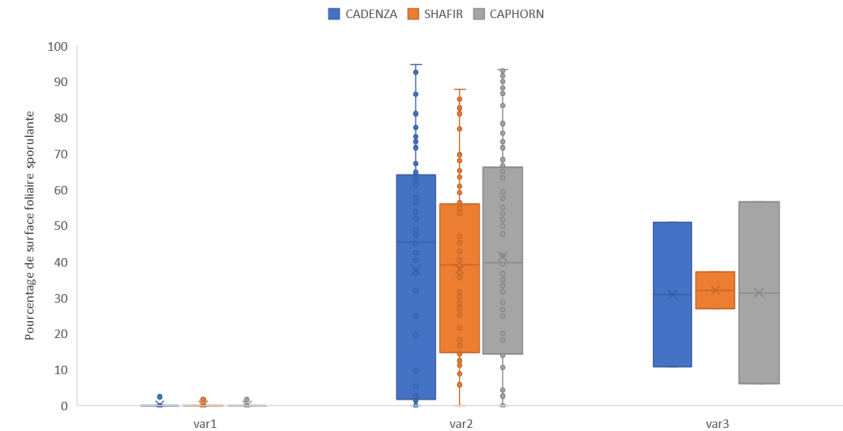
c- Fréquence des virulences dans les populations françaises de *Zt*



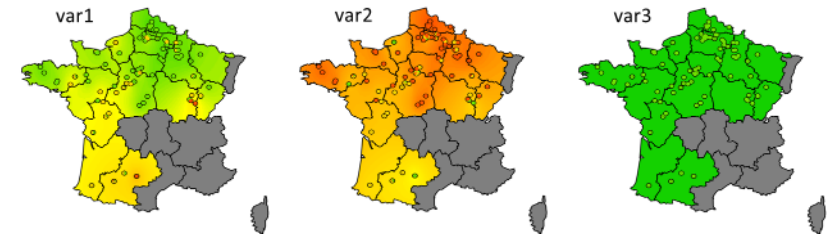
> Faible différenciation génétique entre les populations françaises de *Zt* (marqueurs neutres)

TXA0371173 – *AvrStb6*

A



B



> Capacité de suivre les fréquences alléliques dans les populations de *Zt*, ex. identification de 3 variants pour un amplicon ciblant *AvrStb6*.



WP3. Les gènes de résistance *Stb*

a- Génétique de la résistance dans les variétés de blé françaises



(2013-2014)

220 variétés

4 essais au champ

4 inoculés avec IPO-09415

4 essais plantules

IPO-09415

IPO-09455

IPO-09006

IPO-323



DivR

(2019-2021)

285 variétés

5 essais au champ

4 inoculés avec INRA16-TM0229

1 en inoculation naturelle

6 essais plantules

IPO-09593 (220 variétés)

INRA09-FS0732 (240 variétés)

INRA09-FS0813 (240 variétés)

INRA16-TM0016

INRA16-TM0229

ST99CH_3D7

TaBW420K
Axiom
array



Matrice de 151,248 SNPs



Panel de variétés évalué
avec 10 isolats de *Z. tritici*



GWAS
MLM & BLINK



WP3. Les gènes de résistance *Stb*

a- Génétique de la résistance dans les variétés de blé françaises

> 57 régions génomiques impliquées dans la résistance (40 sur plantules, 17 au champ), répartis sur 20 des 21 chromosomes du blé:

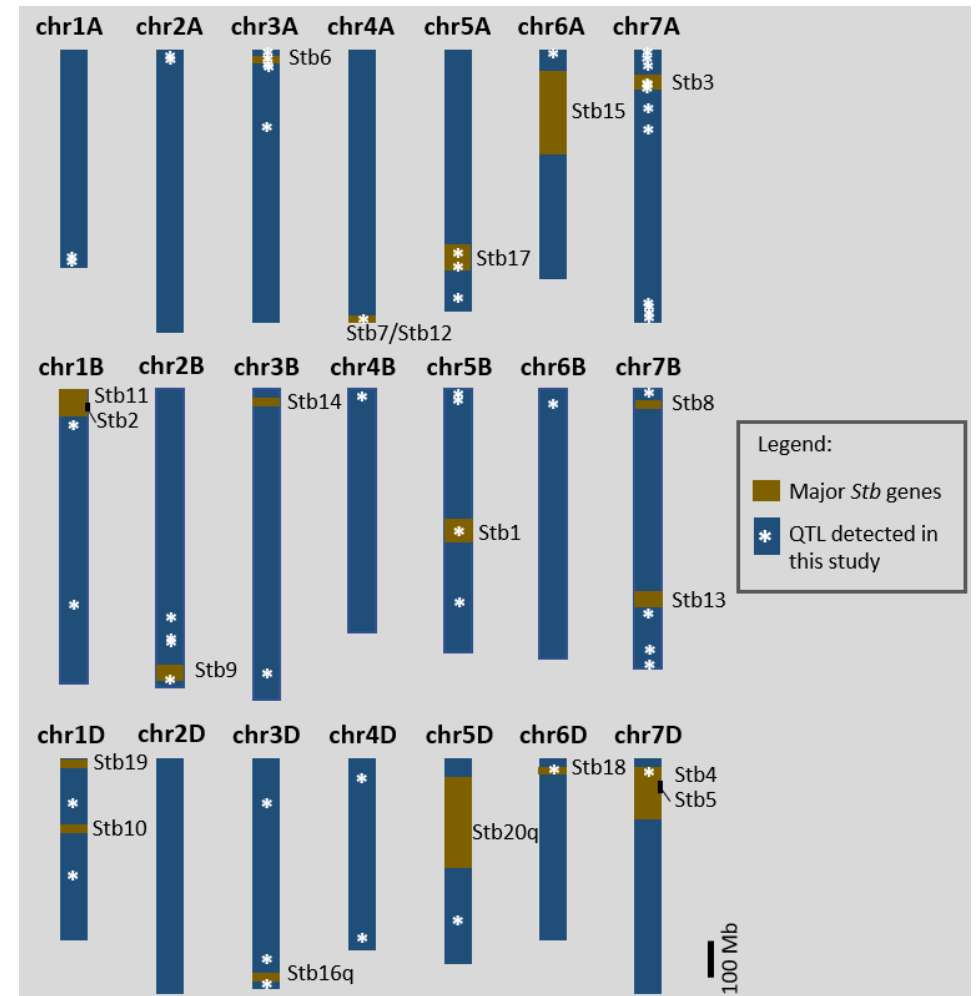
- Parmi les QTL détectés, 10 sont nouveaux
- Les 3 QTL les plus significatifs colocalisent avec les gènes de résistance *Stb6*, *Stb9* et *Stb18*

> Spécificité des QTL vis-à-vis du stade de développement:

- 1/20 QTL détecté à la fois sur plantules et plantes adultes avec le même isolat

> Spécificité des QTL vis-à-vis de l'environnement:

- 1/17 QTL détecté dans plusieurs essais au champ avec le même isolat



TAKE-HOME MESSAGES

WP1 : Une collection d'isolats et de populations récents de *Z. tritici*

> Des isolats virulents ont été identifiés sur tous les gènes de résistance *Stb* connus mais la fréquence d'isolats virulents est très variable d'un gène à l'autre – les gènes de résistance *Stb2*, *Stb5*, *Stb8*, *Stb11*, *Stb10* et *Stb12* restent les plus efficaces.

WP2 : Une méthode pour suivre l'émergence des virulences dans les populations de *Z. tritici*

> *DivR* a contribué à la validation fonctionnelle des gènes de pathogénicité de *Z. tritici* – ces gènes peuvent encoder des petites protéines secrétées typiques des effecteurs, mais peuvent aussi encoder des protéines prédites sans signal de sécrétion.

> Cette connaissance des gènes de pathogénicité nous a permis de développer un outil de séquençage d'amplicons ciblés pour le suivi des virulences dans les populations de *Z. tritici*

WP3: Des marqueurs SNP associés aux gènes de résistance *Stb* présents dans les variétés de blé tendre françaises

> Identification de 57 régions génomiques impliquées dans la résistance dont 10 nouveaux QTL détectés.

> La génétique de l'interaction entre le blé et *Z. tritici* est complexe – polygénique, majoritairement quantitative, et fortement spécifique de la variété, du stade de développement de la plante et de l'environnement.



TAKE-HOME MESSAGES

Publication des résultats du projet DivR

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

A highly multiplexed assay to monitor pathogenicity, fungicide resistance and gene flow in the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*

Hadjer Belah¹, Gwilhem Gazeau², Sandrine Gélisse², Rada Amezrou², Thierry C. Marcel^{1*}, Daniel Croll^{1*}

1 Laboratory of Evolutionary Genetics, Institute of Biology, University of Neuchâtel, Neuchâtel, Switzerland, **2** INRAE, UR BIOGER, Université Paris-Saclay, Thiverval-Grignon, France

* daniel.croll@unine.ch (DC)



Abstract

Crop pathogens pose severe risks to global food production due to the rapid rise of resistance to pesticides and host resistance breakdowns. Predicting future risks requires monitoring tools to identify changes in the genetic composition of pathogen populations. Here we report the design of a microfluidics-based amplicon sequencing assay to multiplex 798 loci targeting virulence and fungicide resistance genes, and randomly selected genome-wide markers for the fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. The fungus causes one of the most devastating diseases on wheat showing rapid adaptation to fungicides and host resistance. We optimized the primer design by integrating polymorphism data from 632 genomes of the same species. To test the performance of the assay, we genotyped 192 samples in two replicates. Analysis of the short-read sequence data generated by the assay showed a fairly stable success rate across samples to amplify a large number of loci. The performance was consistent between samples originating from pure genomic DNA as well as material extracted directly from infected wheat leaves. In samples with mixed genotypes, we found that the assay recovers variations in allele frequencies. We also explored the potential of the amplicon assay to recover transposable element insertion polymorphism relevant for fungicide resistance. As a proof-of-concept, we show that the assay recovers the pathogen population structure across French wheat fields. Genomic monitoring of crop pathogens contributes to more sustainable crop protection and yields.

OPEN ACCESS

Citation: Belah H, Gazeau G, Gélisse S, Amezrou R, Marcel TC, Croll D (2023) A highly multiplexed assay to monitor pathogenicity, fungicide resistance and gene flow in the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. PLOS ONE 18(2): e0211181. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211181>

Editor: Angela Fadden, University College Dublin, IRELAND

Received: July 19, 2022

Accepted: January 17, 2023

Published: February 8, 2023

Copyright: © 2023 Belah et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Raw sequencing data are available on the NCBI Sequence Read Archive (SRA) under BioProject PRJNA84707.

Funding: HB was supported by the Swiss State Secretariat for Education, Research and Innovation (SERI) through a Swiss Government Excellence Scholarship. Funding was also awarded by the French Fund to support Plant Breeding (FDV2018 S-DNR) to TM and DC. INRAE BIOGER benefits from the support of Saclay Plant Sciences-SPS

Introduction

Approximately 30 percent of all crop diseases are caused by fungi [1]. Plant pathogenic fungi affect crops at various life cycle stages and plant tissues, including seeds, root and leaf development, and inflorescence [2–5]. Yield reductions by pathogenic fungi cause food insecurity and economic losses [6, 7]. Crop protection is primarily achieved through the application of a

nature communications



Article

<https://doi.org/10.1038/s41467-024-48108-1>

Quantitative pathogenicity and host adaptation in a fungal plant pathogen revealed by whole-genome sequencing

Received: 23 December 2022

Accepted: 14 February 2023

Published online: 02 March 2023

Check for updates

Rada Amezrou¹, Aurélie Ducaze¹, Jérôme Compain², Nicolas Lapelle^{1,3}, Anahí Pitarich¹, Laetitia Dupont¹, Johann Confais¹, Henriette Goyeau¹, Gert H. J. Kema⁴, Daniel Croll¹, Joëlle Anselomé², Andrea Sanchez-Vallet⁵ & Thierry C. Marcel¹

Knowledge of genetic determinism and evolutionary dynamics mediating host-pathogen interactions is essential to manage fungal plant diseases. Studies on the genetic architecture of fungal pathogenicity often focus on large-effect effector genes triggering strong, qualitative resistance. It is not clear how this translates to predominately quantitative interactions. Here, we use the *Zymoseptoria tritici*-wheat model to elucidate the genetic architecture of quantitative pathogenicity and mechanisms mediating host adaptation. With a multi-host genome-wide association study, we identify 19 high-confidence candidate genes associated with quantitative pathogenicity. Analysis of genetic diversity reveals that sequence polymorphism is the main evolutionary process mediating differences in quantitative pathogenicity, a process that is likely facilitated by genetic recombination and transposable element dynamics. Finally, we use functional approaches to confirm the role of an effector-like gene and a methyltransferase in phenotypic variation. This study highlights the complex genetic architecture of quantitative pathogenicity, extensive diversifying selection and plausible mechanisms facilitating pathogen adaptation.

Fungal diseases cause major damage to crop production and threaten food security worldwide¹. Understanding the molecular dialogue between pathogens and their hosts is essential to design durable and effective control strategies. Major molecular factors in the ability of fungal pathogens to cause disease are effectors. These are proteins delivered into the host apoplast or translocated inside cells to manipulate host physiology or suppress its immunity to favor infection². In turn, plants respond to pathogen invasion by activating defence mechanisms based on recognition of pathogen-associated molecular patterns and effectors by cell surface and intracellular receptors. The discovery of resistance genes (R) that encode receptors

has provided potential means to control fungal diseases through resistance breeding³. However, pathogens have repeatedly overcome host resistance by evading recognition or by suppression of host immunity. These rapid adaptations are mainly driven by genetic variation at pathogenicity genes and genome evolution⁴. Gene diversification, deletions or horizontal acquisitions have generated adaptive variants at loci encoding effectors. Transposable elements (TEs), high mutation and recombination rates are thought to contribute considerably to the extensive genome variation in many fungal species^{5,6}. In the case of an agglutinogenic host-pathogen interaction, the fate of genetic variation is determined partly by the selection pressure

¹Université Paris-Saclay, INRAE, UR BIOGER, Palaiseau, France, ²Université Paris-Saclay, INRAE, UR URG, Versailles, France, ³Plant Research International B.V., Wageningen, The Netherlands, ⁴Department of Ecology and Evolution, University of Neuchâtel, Neuchâtel, Switzerland, ⁵CIRG, INIA, Campus de Montegarden 19M, Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain, ⁶e-mail: radadamez@unine.ch, thierry.marcel@inrae.fr



+
article en cours de préparation:
A large phenotyping assay reveals the genetic architecture of resistance to Septoria tritici blotch in French wheat cultivars



merci