

Actions pour mieux exploiter et accroître la résistance du blé au piétin-verse et à la jaunisse nanisante de l'orge

Joseph JAHIER¹, Hélène MURANTY¹, Maxime TROTTET¹, Philippe LONNET², Éric MARGALÉ², Jayne STRAGLIATTI², Patrice SÉNELLART², Jean-Baptiste REGNARD², Axel OLIVIER^{*2},

* Coordinateur : Axel OLIVIER, aolivier@invivo-group.com, Tél. : 01 40 66 20 78

1 - INRA UMR 118, APBV - BP 35327, 35653 Le Rheu

2 - GIE Club 5 - 83 avenue de la Grande Armée, 75782 Paris Cedex 16

1. Identification et marquage de facteurs génétiques de résistance au piétin-verse chez le blé

► Introduction

Le piétin-verse, dont l'agent est le champignon *Oculimacula yallundae* syn. *Pseudocercospora herpotrichoides*, est une maladie du blé d'hiver très répandue dans le nord-ouest de l'Europe et dans la région du 'Pacific Northwest' aux USA. Il peut causer la verse et des pertes de rendement significatives. L'incorporation de gènes de résistance constitue un important objectif en création variétale.

Deux sources de résistance sont disponibles chez le blé tendre. La première a été rapportée chez la variété française Cappelle inscrite dans les années 50. Les travaux de Law et al (1975) puis de Muranty et al (2002) ont montré que la résistance de Cappelle est due au gène *Pch2*, localisé sur le chromosome 7A et efficace seulement au stade jeune plante et à des QTL de résistance présents sur les chromosomes 1A, 2B, 5A et 7A.

La seconde résistance a un niveau plus élevé que chez Cappelle. Elle est due au gène *Pch1* introduit sur le chromosome 7D à partir de l'espèce apparentée *Aegilops ventricosa* (2n=28, DDN^{VN}). *Pch1* a été très utilisé en sélection en Europe et aux USA. Cependant le niveau de résistance conférée par *Pch1* s'est avéré insuffisant dans certains fonds génétiques. En effet, des variétés portant *Pch1* subissent des pertes de rendement significatives en cas de fortes attaques. C'est pourquoi les sélectionneurs souhaitent adjoindre à *Pch1* d'autres facteurs de résistance.

Une première stratégie consiste à cumuler *Pch1* avec tout ou partie du système polygénique de Cappelle. L'expérience montre que cet objectif est difficile à atteindre en raison de la lourdeur des tests et du caractère quantitatif de la résistance. Cependant, cet objectif semble avoir été réalisé avec la variété Rendez-Vous dans les années 80, ainsi qu'avec la variété Balthazar qui en est issue.

La recherche de QTL de résistance au piétin-verse a été entreprise à l'aide de 3 familles de lignées recombinantes obtenues selon un plan dialléle à 3 parents (1 très résistant, 1 moyennement résistant, 1 sensible).

Ce travail repose sur des tests d'évaluation de la résistance, en particulier au stade adulte au champ, et la cartographie génétique complète ou partielle du matériel.

► Matériel et méthodes

Matériel

Trois familles de lignées recombinantes, issues du croisement selon un plan demi-dialléle des variétés Balthazar, Shango et Ritmo, ont été utilisées.

Évaluations de la résistance

La résistance au piétin-verse a été évaluée au stade adulte au champ. L'implantation du matériel a été réalisée en rangs de 150 cm semés avec 90 grains en octobre. Deux rangs de matériel à étudier étaient séparés par un rang de la variété très sensible Moisson. L'inoculation était réalisée en novembre ou décembre à l'aide de grains d'avoine stérilisés puis contaminés par le champignon. Onze tests ont permis d'évaluer l'ensemble du matériel : 3 à Rennes, en 2004, 2005 et 2006, comportant 285 à 360 lignées par test selon les années, et 8 dans 4 sites des partenaires du GIE Club 5, en 2005 et 2006, comportant 96 lignées par test. Dans chaque test, les lignées recombinantes étaient présentes dans un ou deux blocs, alors que les témoins (VPM, Cappelle, Moisson, Balthazar, Shango et Ritmo) étaient présents dans tous les blocs (12 blocs à Rennes, 3 blocs dans chaque site des partenaires du GIE Club 5). En 2005 et 2006, quelques lignées recombinantes ont été évaluées dans deux ou trois sites pour servir de génotypes "ponts".

La notation du matériel a été effectuée au moment de la floraison. 30 à 50 tiges collectées dans le mètre central de chaque rang étaient notées pour la part de section de tige attaquée par le champignon ce qui permettait de calculer un pourcentage moyen de section de tige attaquée pour chaque génotype.

Génotypage

Le polymorphisme des variétés parentales Balthazar, Shango et Ritmo a été testé pour 314 marqueurs microsatellites générant au moins un locus sur les chromosomes 1A, 2B, 5A, 7A et 7D.

Les lignées recombinantes ont été génotypées à l'aide de marqueurs SSR. Les produits d'amplification par PCR des marqueurs ont été visualisés par coloration au nitrate d'argent après migration sur gel de polyacrylamide, ou à l'aide d'un analyseur de fragments d'ADN Licor ou d'un séquenceur capillaire 3130xl. 133 couples d'amorces ont été utilisés pour le génotypage des lignées recombinantes, ce qui a produit 179 loci (80 dans la population Ritmo x Balthazar, 117 dans la population Shango x Balthazar, et 114 dans la population Shango x Ritmo).

Analyse des données

Les analyses de variance des données phénotypiques et le calcul des moyennes ajustées utilisées pour la recherche de QTL ont été réalisées à l'aide du logiciel R. Les cartes

génétiques des trois familles de lignées recombinantes ont été construites à l'aide du logiciel mapmaker et une carte consensus a été obtenue à l'aide du logiciel Carthagene. La recherche de QTL a été réalisée par "composite interval mapping" (CIM) dans chaque population à l'aide du logiciel QTL CARTOGRAPHER.

► Résultats

Variation phénotypique

Les évaluations réalisées ont généré des résultats fiables : en analyse de variance, les effets lignées sont très significatifs (analyse avec les témoins), ainsi que les effets famille et lignées intra-famille (analyse sans les témoins après ajustement des effets blocs). Cependant, la précision des essais est assez variable, avec des coefficients moyens de variation (CMV = écart-type résiduel / moyenne) compris entre 0.118 et 0.350. Par ailleurs, on observe une interaction génotype x site significative, qui se traduit par des inversions de classement des génotypes Cappelle, Shango et Ritmo (moyennement sensibles ou moyennement résistants) et par des corrélations nulle, faiblement positive ou faiblement négative des moyennes ajustées des lignées recombinantes de la famille Shango x Ritmo entre les 3 années d'évaluation à Rennes.

Cartes génétiques

Les données de génotypage ont permis d'obtenir des cartes partielles des chromosomes visés (1A, 2B, 5A, 7A, 7D) pour chacun des trois familles de lignées recombinantes. Ces cartes sont très fragmentées (14 à 21 groupes de liaison, 9 à 19 marqueurs non liés) et partielles (498 à 791 cM pour 5 chromosomes, taux de couverture estimé de 64 à 95 % selon les chromosomes). La carte consensus pour les trois familles comporte 28 groupes de liaison parmi lesquels seulement 8 contiennent 2 locus communs ou plus pour chaque paire possible de populations, alors que 6 contiennent les locus des trois populations, mais seulement 1 pour une population, 11 contiennent des locus de seulement deux populations et 3 contiennent des locus d'une seule population. 16 marqueurs sont non liés.

Détection de QTL

La recherche de QTL par CIM dans chaque famille en analyse multicaractère prenant en compte les 3 essais de Rennes a permis d'identifier 14 régions portant des QTL, réparties sur les 5 chromosomes visés, montrant un LR (Likelihood Ratio) supérieur au seuil de 11.4 (Tabl.1) (seuil par défaut du logiciel utilisé, QTL Cartographer). L'effet de ces régions dans chaque essai a ensuite été analysé. Le locus *Pch1*, qui ségrège dans les familles Shango x Balthazar et Ritmo x Balthazar, est identifié sur le groupe de liaison 7D2 dans tous les essais et dans ces deux familles. Il explique 25 à 84 % de la variation selon l'essai. Des QTL moins stables et/ou d'effet moins important ont été détectés sur les autres chromosomes. En effet, seules cinq des régions identifiées en multicaractère présentent des effets significatifs quand on analyse chaque essai séparément.

► Discussion et perspectives

Les travaux de Chapman et al (2008) ont identifié quelques marqueurs microsatellites liés à *Pch1* et *Pch2*. Nous avons cartographié une partie des marqueurs microsatellites liés à *Pch1* mis en évidence par ces travaux dans les familles Shango x Balthazar et Ritmo x Balthazar : ces marqueurs sont liés au QTL détecté dans tous les essais. Nous avons également cartographié deux des marqueurs microsatellites liés à *Pch2* dans les mêmes familles : aucun QTL n'a été détecté à proximité de ces marqueurs. Il semble donc que soit *Pch2* ne ségrège pas dans ces familles, soit son effet n'est pas détectable dans les évaluations au stade adulte que nous avons réalisées. Une comparaison des allèles des variétés parentales Balthazar, Shango et Ritmo avec ceux de Cappelle pour ces marqueurs pourrait permettre de trancher entre ces deux hypothèses.

Une analyse conjointe de toutes les familles et de toutes les données phénotypiques obtenues sur les 3 années et dans 5 sites sera réalisée afin d'exploiter pleinement la puissance du dispositif utilisé pour l'identification de QTL. Ensuite, les régions chromosomiques porteuses de QTL de résistance au piétin-verse identifiées pourront être enrichies en marqueurs, en premier lieu par l'analyse de nouvelles sources de marqueurs microsatellites.

Chromosome	Famille	Groupe de liaison	Marqueur en amont	LR au pic	Parent portant l'allèle favorable	Part de variance expliquée au pic ± 10 cM
				en multicaractère		
1A	SxB	1A1	gwm136	12.7	Shango	NS ¹
	SxB	1A1	cf15	23.4	Balthazar	12.1 % ²
	SxR	1A1	barc158	13.5	Ritmo	21.4 % ³
2B	SxB	2B1	gwm614	17.9	Shango	NS ¹
	SxR	2B1	gwm614	14.5	Shango	13.6 % ⁴
	SxR	2A-2B	wmc025ba	18.5	Shango	NS ¹
	RxB	2B3	gwm257	15.0	Ritmo	NS ¹
5A	SxB	5A1	barc100	15.0	Shango	7.6 % ⁴
	SxB	5A1	barc180d	20.8	Shango	NS ¹
	SxR	5A2	gwm497b	11.4	Shango	NS ¹
	RxB	5A1	barc186	13.4	Balthazar	NS ¹
7A	SxB	7A1-7A2	gpw2233	15.2	Balthazar	13 % ²
	SxB	7A1-7A2	wmc083	11.8	Shango	NS ¹
	SxR	7A1	gwm233	14.4	Ritmo	NS ¹
7D	RxB	7D1	gwm111	16.7	Ritmo	NS ¹
	SxB	5A3-7D	cf169	53.3	Balthazar	32.8 à 74.2 %
	RxB	7D2	barc76	32.8	Balthazar	8.6 à 83.7 %

1 : pas d'effet significatif dans les essais analysés individuellement

2 : effet significatif dans un seul essai, Desprez 2006

3 : effet significatif dans un seul essai, Rennes 2005

4 : effet significatif dans un seul essai, Nickerson 2006

Les accolades dans la colonne marqueur regroupant chacune deux lignes indiquent que la région détectée dans les deux familles est la même, même si le marqueur en amont n'est pas le même.

Tableau 1 : Régions portant des QTL de résistance au piétin-verse au stade adulte détectées en analyse multicaractère avec les 3 essais de Rennes.

2. Accroissement du nombre de copies de *Pch1* dans le blé tendre

► Introduction

[voir Action 1]. Nous envisageons une deuxième stratégie qui consiste à accroître le niveau de résistance du blé en augmentant le nombre de copies de *Pch1* dans son génome. Cet objectif s'est appuyé sur l'observation suivante : une plante homozygote pour le gène *Pch1* est plus résistante qu'une plante hétérozygote. Le travail comporte deux phases :

- effectuer l'introgression de *Pch1* dans le blé dur, au niveau des chromosomes du groupe d'homéologie 7 (7A et/ou 7B),
- croiser les blés durs résistants avec le blé tendre résistant (7D) afin de créer des lignées de blé tendre possédant *Pch1* sur deux voire trois paires de chromosomes du groupe 7.

Par recombinaison homéologue, le gène *Pch1* porté par le 7D^V d'*Ae. ventricosa* accession 11 a été introduit sur le chromosome 7A du blé dur (Huguet-Robert et al, 2001). Le gène *Pch1* introduit sur le 7D du blé tendre est marqué par l'endopeptidase *Ep-D1b* (origine *Ae. ventricosa* n°10). L'allèle correspondant dans l'accession n°11 est *Ep-D1c* (allèle nul). De plus, étant donné que les niveaux de résistance des accessions d'*Ae. ventricosa* sont différents, on admet que les 2 gènes ont des formes alléliques différentes.

Nous présentons ici le développement de lignées de blé tendre possédant le gène *Pch1* à la fois sur le chromosome 7A et sur le chromosome 7D et l'évaluation de leur niveau de résistance au piétin-verse. Par souci de clarté le gène *Pch1* sur le 7D sera désigné *Pch1_{vent10}* et celui sur le 7A *Pch1_{vent11}*.

► Matériel et méthodes

Matériel

La variété de blé tendre cv. *Virtuose* qui possède *Pch1_{vent10}* sur le chromosome 7D a été croisée par la lignée n°300 de blé dur portant *Pch1_{vent11}* sur le 7A pour créer des blés tendres possédant *Pch1* sur les chromosomes 7A et 7D.

Analyses cytologiques

Les dénombrements chromosomiques à partir de méristèmes radiculaires et l'observation des comportements méiotiques ont été faits selon les protocoles standards.

Utilisation des marqueurs Endopeptidase

Les allèles du gène *EpD1* ont été détectés par la méthode d'isoélectrofocalisation de Mena et al (1993).

Résistance au champ

L'implantation, l'inoculation et la notation du matériel ont été décrits dans l'action 1.1.

► Résultats

Extraction de lignées possédant *Pch1* sur le 7A et 7D

L'hybride pentaploïde (2n=35, AABBD) '*Virtuose* × 300' a été autofécondé. Dans la descendance F2 de 90 plantes, aucune plante n'avait ni 41 ni 42 chromosomes. 15 plantes ayant entre 37 et 40 chromosomes ont été autofécondées. En F3, 60 demi-grains avec embryons ont été dénombrés. Le test endopeptidase à partir des demi-grains sans embryon a révélé 26 plantes a priori homozygotes EpD1b

(7D) et EpD1c (7A). 5 plantes sur 26 ont été éliminées en raison de leur faible vigueur ou stérilité. Des anthères au stade métaphase I de la méiose ont été prélevées sur ces plantes. L'analyse méiotique a montré une fréquence variable de multivalents. Dans un premier temps, on les a imputés à une différence de structure chromosomique entre le blé dur résistant et '*Virtuose*' et non pas à la duplication de *Pch1* dans le génome. Nous avons en définitive retenu 5 plantes à 2n=42.

90 plantes de la descendance F4 de ces 5 plantes ont été semées. 29 se sont avérées euploïdes. 20 d'entre elles ont produit assez de semences pour que leur résistance puisse être évaluée.

Évaluation de la résistance

Au stade jeune plante

Les lignées 300 × *Virtuose* sont apparues au moins aussi résistantes que *Virtuose*. Mais la qualité du test n'a pas permis de conclure à des niveaux de résistance supérieur à celui de *Virtuose*.

Au stade adulte au champ

L'attaque sur les témoins est celle attendue. Les cultivars *Oratorio* et *Virtuose* qui possèdent *Pch1_{vent10}* sont moins attaqués que *Cappelle* qui à son tour est significativement moins attaqué que le témoin sensible cv. *Soissons* (Tabl. 2). Les lignées 300 × V présentent des comportements différents. Certaines sont aussi sensibles que *Soissons* alors que d'autres sont du niveau d'*Oratorio* et *Virtuose*. Il est apparu manifeste que le contenu en gènes ou allèles de *Pch1* n'est pas le même dans les différentes lignées. Suite à l'observation de multivalents dans les cellules mères du pollen des plantes F3 '300 × V', nous avons émis l'hypothèse que les chromosomes 7A et 7D de ces lignées peuvent se recombiner.

	Pourcentage moyen de section de tige attaquée	Comparaison des moyennes par le test Newman-Keuls (seuil 5 %)			
Soissons	97.84	A			
300 x V - 29	85.31	A	B		
300 x V - 69	84.88	A	B		
300 x V - 63	83.81	A	B		
300 x V - 4	82.56	A	B		
300 x V - 68	82.56	A	B		
300 x V - 3	81.69	A	B		
300 x V - 10	78.19	A	B	C	
300 x V - 1	77.25	A	B	C	
300 x V - 8	75.25		B	C	
300 x V - 9	74.06		B	C	
300 x V - 66	74.06		B	C	
300 x V - 67	73.94		B	C	
300 x V - 6	69.26		B	C	
Cappelle	68.06		B	C	
300 x V - 70	67.88		B	C	
300 x V - 5	65.76		B	C	
300 x V - 2	57.72			C	
300 x V - 61	44.44				D
300 x V - 26	40.75				D
Oratorio	37.13				D
300 x V - 11	32.00				D
300 x V - 19	29.31				D
Virtuose	28.31				D

Tableau 2 : Évaluation de la résistance au champ des lignées 300 × V

Mise en évidence de recombinaisons 7A-7D

Nous avons analysé la méiose de l'hybride pentaploïde entre la variété de blé tendre Courtot et la lignée 300. Le fonds génétique de cette dernière est celui de Creso. Nous avons démontré (non publié) que Creso et Courtot ne présentent pas de différence de structure chromosomique.

Creso présente en métaphase I de méiose 14 bivalents et 7 univalents dans la majorité des cellules mères du pollen (CMP). Chez l'hybride Courtot x 300, on observe un trivalent dans 80 % des CMP. A l'aide de la technique d'hybridation in situ GISH (Figure 1), on a pu montrer que ce trivalent est constitué de deux chromosomes du génome A et d'un chromosome du génome D. Il est donc vraisemblable que ce trivalent est de type 7Ac-7A300-7Dc (7Ac et 7Dc sont de Courtot et 7A300 de 300). Le chromosome 7Dc s'apparie avec 7A300 au niveau de la partie distale de leur bras long.

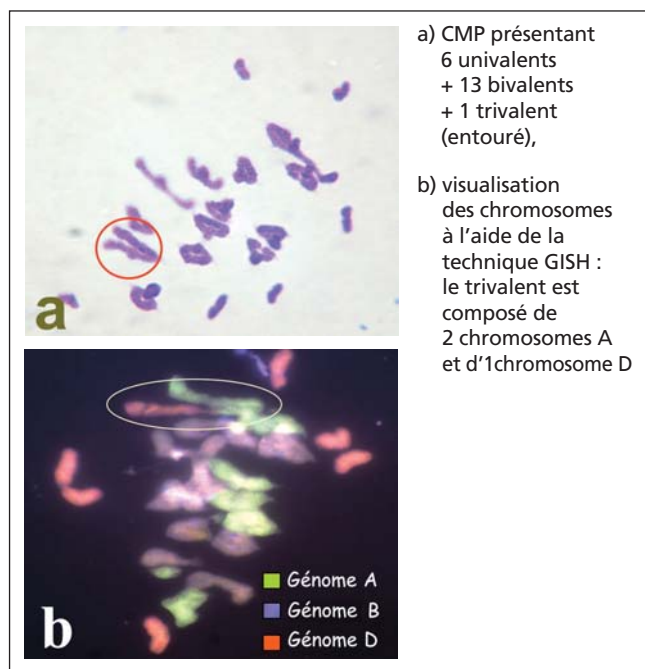


Figure 1 : Appariement méiotique chez l'hybride pentaploïde ($2n=35$, AABBDD) entre le blé tendre Courtot et la lignée de blé dur 300.

► Discussion – Perspectives

L'introgression *Pch1_{vent11}* est très courte et située en position distale du bras long 7AL. Elle contient de la chromatine initialement présente sur la région homéologue du 7D d'*Ae. ventricosa*. Elle présente donc un niveau élevé d'homologie avec la région correspondante sur le chromosome 7D du blé. Bien que cette introgression soit très courte, le chromosome 7A introgressé s'apparie avec une fréquence élevée (80 %) avec le 7D dans l'hybride pentaploïde entre le blé résistant et le blé tendre. La conséquence est que des recombinaisons se produisent et que *Pch1_{vent11}* passe sur le chromosome 7D. Dans l'hybride 300 x V, le 7D porte *Pch1_{vent10}* et 7A *Pch1_{vent11}*. Les événements de recombinaison de type 7A-7D peuvent aboutir à 5 situations quant au contenu en gène *Pch1* dans les lignées de blé tendre sélectionnées :

- α 0 copies *Pch1_{vent11}* + 4 copies *Pch1_{vent10}*
- β 1 copies *Pch1_{vent11}* + 3 copies *Pch1_{vent10}*
- δ 2 copies *Pch1_{vent11}* + 2 copies *Pch1_{vent10}*
- Φ 3 copies *Pch1_{vent11}* + 1 copies *Pch1_{vent10}*
- γ 4 copies *Pch1_{vent11}* + 0 copies *Pch1_{vent10}*

Les marqueurs endopeptidase EpD1c (null) et EpD1b auraient dû nous permettre de sélectionner des blés tendres portant *Pch1_{vent11}* sur le 7A et *Pch1_{vent10}* sur le 7D en l'absence d'appariement 7A-7D. En fait, nous avons sélectionné les 4 premières situations ci-dessus. De plus, il est important de souligner que tant que les deux gènes sont présents dans une lignée, cette lignée évolue. Si le passage d'une génération à la suivante passe par quelques plantes, on a une dérive génétique qui aboutit à des lignées fixées possédant 4 copies de l'un des deux gènes *Pch1*.

On a observé que les lignées 300 x V présentent des niveaux de résistance variable vis-à-vis du piétin-verse. Dans l'état actuel de nos connaissances, il est impossible de savoir ou prédire les niveaux de résistance correspondant aux contenus géniques α à Φ ci-dessus. Pour apporter un début de réponse, nous multiplions chaque année sous forme SSD les lignées 300 x V. Nous allons aboutir à un ensemble de lignées possédant 4 copies de *Pch1_{vent11}* ou de *Pch1_{vent10}* que nous évaluerons. Nous formulons les hypothèses que *i*) l'expression des gènes de résistance est réduite lorsque la combinaison génique n'est pas 2-2 et que *ii*) aucune de nos lignées n'était fixée de type 2-2. Mais si à l'avenir on était en mesure de la créer, cette lignée pourrait avoir un niveau de résistance supérieur aux génotypes actuels de blé tendre ou blé dur possédant 2 copies de *Pch1_{vent11}* et de *Pch1_{vent10}*.

Nous projetons de réduire l'introgression *Pch1* sur le chromosome 7A à l'aide de la mutation *ph1b* promotrice d'appariement homéologue. Lorsque sa taille sera suffisamment réduite pour éviter des appariements de type 7A-7D, on sera en mesure de créer et d'évaluer des blés tendres avec un dosage accru du nombre de copies du gène *Pch1*.

3. Élargissement de la variabilité pour la résistance à la jaunisse nanisante de l'orge

► Introduction

La jaunisse nanisante de l'orge est une maladie induite par des virus du groupe des lutéovirus, plus de 7 espèces ont été décrites, avec une variabilité intra-espèce. L'espèce *BYDV-PAV* est la plus fréquente en France. Ces virus ont été trouvés sur une centaine d'espèces de poacées, et sont transmis selon un mode persistant par des pucerons. Plus de 20 espèces de pucerons sont vectrices du virus dont les plus importantes en France sont : *Rhopalosiphum padi*, *Sitobion avenae* et *Metopolophium dirrhodum*.

On n'a pas trouvé de source de résistance au VJNO chez le blé tendre. Seulement un gène de tolérance (*Bdv1*) a été décrit chez la variété Frontana et localisé sur le bras court du chromosome 7D (Singh 1993). D'autres sources de tolérance ont été décrites (Burnett et al 1995).

Les sources de résistance semblent fréquentes chez les triticales pérennes (*Thinopyrum*, *Elymus*, ...). Essentiellement quatre croisements interspécifiques ont eu un début d'exploitation en sélection : 1) TC14 développé en Australie, est une translocation du chromosome 7D/7Ag dérivée de *Thinopyrum intermedium* (Banks et al, 1995) ; 2) la lignée d'addition chinoise (Zhong) du chromosome 2Ag dérivée de *Th. intermedium* (Larkin et al, 1995) ;

3) P29 est une lignée de substitution dérivée du chromosome 7D/7Agⁱ dérivée de *Th. intermedium* (Anderson et al, 1998) ; 4) OK7211542 est un amphiploïde partiel *Triticum aestivum/Th. ponticum* (Comeau et al, 1994). Les trois premiers induisent une résistance partielle à la multiplication du virus et dans certains cas un échappement à l'infection d'une certaine proportion des plantes. OK7211542 est décrit comme immun. Actuellement, TC14 est le plus utilisé en sélection. A ce jour, le gène *Bdv2* de TC14 est présent dans deux variétés australiennes, mais dans aucune variété européenne.

Nos objectifs étaient :

- a - introduire dans le blé la résistance de l'amphiploïde partiel *Triticum aestivum/Th. ponticum* OK7211542 et la résistance portée par le chromosome 2Ag de *Th. intermedium*.
- b - évaluer la résistance d'une lignée construite avant le début du programme et cumulant la résistance du chromosome 2Ag et celle du chromosome transloqué 7D/7Ag de la lignée de TC14.

► Matériel et méthodes

La lignée d'addition ditélosomique pour le bras chromosomique 2AgL (qui porte la résistance du 2Ag) et l'amphiploïde OK7211542 à 2n=56 chromosomes ont été croisés puis rétrocroisés par Courtot ph, lignée de Courtot possédant la mutation *ph1* promotrice d'appariement homéologue. Les plantes BC1 les plus résistantes à JNO et homozygotes *ph1ph1* ont été croisées par Courtot. Dans la descendance des plantes résistantes et ayant un nombre de chromosomes proches de 42 ont été sélectionnées puis rétrocroisées par Courtot.

OK7211542 a été rétrocroisé deux fois par Courtot. Des plantes possédant l'addition monosomique pour un chromosome (2n=43) et aussi résistantes que OK7211542 ont été produites.

Un test Elisa pour évaluer la résistance à JNO a été mis en œuvre selon Barloy et al (2003). Des techniques de cytologie ont également été utilisées pour le dénombrement chromosomique et l'analyse du comportement méiotique.

► Résultats

Évaluation de la lignée cumulant les résistances portées par les chromosomes 2Ag et 7Ag de Th. intermedium

Nous avons produit une lignée désignée ZT à 2n=44 chromosomes possédant le chromosome transloqué 7D-7Ag présent dans TC14, et le chromosome 2Ag. La chromatine de *Th. intermedium* a pu être visualisée à l'aide de la technique GISH (Figure 2). Cette lignée a été inoculée par 5 souches PAV de JNO. Les tests ont confirmé les niveaux de résistance partielle dus à 2Ag et 7D/7Ag et montré un effet additif des deux résistances. La nouvelle lignée se caractérise par une proportion de plantes infectées moindre que chez ses parents et une concentration en virus très faible chez les plantes infectées. La principale perspective de ce travail est, lorsque la résistance de 2Ag aura été introduite dans un chromosome de blé, la construction de variétés de blé efficaces vis-à-vis de JNO.

Ce travail a été proposé pour publication à Plant Pathology. Les reviewers ont demandé d'apporter quelques améliorations au manuscrit. Nous allons resoumettre une nouvelle version en juillet 2008.



Figure 2 : Les chromosomes de la lignée ZT ont été visualisés à l'aide de la technique GISH. Les 2 chromosomes 2Ag sont en rouge et les 2 chromosomes transloqués 7D-7Ag sont indiqués par une flèche.

Transfert de la résistance présente dans l'amphiploïde partiel T. aestivum/Th. ponticum

a : extraction d'une lignée d'addition disomique
 Dans la descendance du 3^{ème} rétrocroisement de OK 7211542 par Courtot, une lignée d'addition disomique (2n=44) très stable a été sélectionnée. Elle est aussi résistante que OK 7211542, ce qui semble indiquer que la résistance de OK 7211542 est portée par un seul chromosome et qu'elle pourrait être monogénique. Cette information est importante, car pour le transfert, il est possible de travailler à partir d'une population relativement réduite.

b : transfert de la résistance dans le blé
 La sélection s'est poursuivie pendant deux années dans les descendance OK 7211542 / 2*Courtot ph / 2*Courtot. Le matériel sélectionné est fertile et euploïde. Néanmoins nous avons été confronté au problème du faible niveau de sensibilité de Courtot qui a fait que les plantes hétérozygotes qui multiplient plus le virus que OK 7211542 ou l'addition disomique sont difficiles à sélectionner. Nous avons été conduits en deuxième année à rétrocroiser le matériel par Orvantis qui est plus sensible que Courtot. En troisième année, nous avons sélectionné des plantes dans le rétrocroisement qui à leur tour ont été rétrocroisées par Orvantis. Nous n'avons pas réussi, à l'aide de la technique d'hybridation in situ GISH, à démontrer la présence d'un transfert. Néanmoins ce résultat ne signifie pas qu'il n'y a pas de transfert car il a déjà été montré par plusieurs laboratoires que des introgressions de courte taille ne sont pas détectables.

Transfert de la résistance portée par le chromosome 2Ag de Th. intermedium

Nous avons suivi les mêmes étapes que dans le transfert ci-dessus. Le rétrocroisement par Orvantis s'est avéré indispensable, dans la mesure où la résistance conférée par 2Ag est partielle et à dominance partielle. En troisième année, nous avons sélectionné dans la descendance de 3 familles en rétrocroisement par Orvantis des plantes résistantes. Deux familles semblaient très intéressantes par la fréquence des plantes retenues.

Ces dernières ont été rétrocroisées par Orvantis prise comme femelle. Ainsi en 2007, on devrait être en mesure de sélectionner sur la résistance et sur la fréquence de transmission par le pollen. L'objectif est clairement de sélectionner des introgressions qui se transmettent bien à l'état hétérozygote.

► Conclusion

Actuellement les sélectionneurs ne disposent que du seul gène (*Bdv2*) de résistance partielle à JNO issu de *Th. intermedium*. Son utilisation pose des difficultés dans la mesure où elle induit un fort déficit de fertilité dans de nombreux fonds génétiques. Si l'on veut développer la lutte génétique vis-à-vis de JNO, il apparaît indispensable et urgent d'élargir la variabilité utilisable en sélection. Nous n'avons pas atteint l'objectif fixé concernant le transfert des deux résistances '2Ag et OK 7211542'. A l'issue des 3 années, nous avons sélectionné du matériel fertile, à 42 chromosomes et en ségrégation pour la résistance dans le fonds génétique sensible d'Orvantis. Le travail se poursuit dans le cadre d'un nouveau contrat FSOV.

4. Recombiner les deux introgressions chevauchantes portant les gènes *Pch1* et *Bdv2*

► Introduction

La sélection pour la sélection de l'état sanitaire du blé tendre a pour objectif l'introduction dans un même génotype d'un maximum de gènes de résistance aux différentes maladies.

Des obstacles au cumul des gènes peuvent survenir. L'un d'eux, dans le cas du blé, est dû au fait que certains gènes d'origine interspécifique sont portés par des introgressions chevauchantes d'origine interspécifique différente. En conditions normales, deux introgressions chevauchantes à l'état hémizygote dans un génotype ne peuvent se recombiner entre elles ou avec la partie chromosomique équivalente (région homéologue) du même chromosome de blé ne portant pas l'introgression. Néanmoins, les cytogénéticiens ont élaboré des stratégies pour favoriser les recombinaisons entre régions homéologues et par conséquent réduire la longueur des segments étrangers tout en conservant les gènes d'intérêt. La plupart reposent sur l'utilisation de la mutation *ph1* promotrice d'appariement homéologue à la méiose.

Nous nous proposons de cumuler, dans un même génotype, les gènes de résistance *Pch1* et *Bdv2* portés par des introgressions chevauchantes sur le bras long du chromosome 7DL du blé tendre (Figure 3). Le gène *Pch1* a été introduit dans le blé à partir de la triticée sauvage *Aegilops ventricosa*, il constitue le seul élément majeur de résistance au piétin-verse chez le blé. L'introgression est de très petite taille, moins de 5 % du chromosome 7D. Le gène *Bdv2* de résistance partielle à la jaunisse nanisante de l'orge (JNO) est porté par un segment chromosomique introduit de *Thinopyrum intermedium* qui occupe 40 % du bras 7DL en position distale.

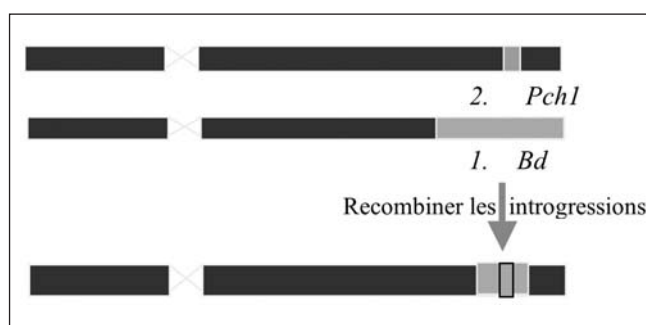


Figure 3 : représentation schématique des introgressions et de l'objectif du travail.

► Matériel

Avant le début de la mise en œuvre du projet, l'INRA a produit dans le fonds génétique de cv. Courtot un génotype possédant les deux introgressions à l'état hétérozygote et la mutation *ph1* à l'état homozygote. Ce matériel très stérile, en raison de la présence simultanée de *ph1* et de *Bdv2*, a été rétrocroisé deux fois par Soissons. Une sélection alternativement vis-à-vis du piétin-verse et de la JNO a abouti à un ensemble de lignées dont certaines pourraient avoir la recombinaison recherchée.

► Résultats

Nous nous sommes heurtés à de nombreuses difficultés :

- il est impossible d'évaluer simultanément sur de jeunes plantes la résistance au piétin et à la jaunisse,
- pour chacun des gènes de résistance, nous avons un marqueur moléculaire. Dans notre projet, ils sont d'aucune utilité, car dans les recombinaisons éventuelles entre les deux introgressions, ils peuvent être perdus,
- la résistance conférée par *Bdv2* est partielle. Dans les descendances en rétrocroisement hétérozygotes pour le gène, la détection de la présence de ce dernier n'est pas évidente,
- la variété Soissons utilisée en rétrocroisement est moins sensible que prévu.

En 2004, nous avons évalué simultanément la résistance de 35 lignées vis-à-vis des deux maladies. Elles sont toutes résistantes au piétin-verse. Aucune d'entre elles n'est significativement plus résistante à la JNO que Soissons. Les plantes avec les plus faibles D.O. ont été croisées par la variété très sensible cv. Sunstar qui constitue le fonds génétique de TC14, première lignée portant *Bdv2*. L'examen des F1 devrait permettre de conclure quant au cumul sur le chromosome 7D de *Pch1* et de *Bdv2*.

Nous avons aussi appliqué la technique GISH sur les plantes qui semblent les plus prometteuses. La chromatine de *Th. intermedium* n'a pu être détectée. Mais dans l'hypothèse d'une réduction du segment chromosomique porteur de *Bdv2*, il n'est pas exclu, étant donné certaines limites de la technique GISH qu'aucun signal n'ait été obtenu. Sur ces mêmes plantes prometteuses, le marqueur moléculaire de *Bdv2* n'est pas détecté.

A ce stade nous n'avions finalement aucun indice nous permettant de dire que le recombinant recherché était présent dans la population travaillée. Ceci nous a conduit à arrêter les travaux en 2005. Nous les avons repris en 2006 pour la raison suivante : même après 2 rétrocroisements par Soissons le matériel sélectionné en 2004 à l'aide du test de résistance à la JNO était très stérile indiquant la présence de chromatine d'*Agropyron intermedium*

En 2006, 16 descendances en rétrocroisement par Sunstar ont été évaluées. Aucune n'était homogène résistante à la JNO. Malgré le fait que le fonds génétique soit à 50 % Sunstar, toutes les plantes sélectionnées ont présenté un très fort niveau de stérilité.

► Conclusion

Nous n'avons pas atteint notre objectif qui est de produire des lignées fertiles et fixées pour *Pch1* et *Bdv2*. En 2007, les descendants par Orvantis seront évalués. Nous espérons que nous aurons une réponse définitive. Cependant malgré une réponse positive, il est encore possible que la fertilité ne sera pas restaurée car nos travaux antérieurs ont montré que l'introgression *Bdv2* induit une réduction de la fertilité dans la majorité des fonds génétiques français. Ce n'est pas le cas avec le cultivar Rendezvous. Nous avons introduit l'introgression *Bdv2* dans cette variété et la lignée isogénique produite est fertile. Donc si la stérilité est toujours présente dans le rétrocroisement par Orvantis, nous procéderons à un rétrocroisement par Rendezvous_{*Bdv2*} et la sélection portera uniquement sur la résistance au piétin-verse.

Références bibliographiques

- Anderson, J. M., Bucholtz, D. L., Greene, A. E., Francki, M. G., Gray, S. M., Sharma, H., Ohm, H. W., Perry, K. L.** 1998. Characterization of wheatgrass-derived barley yellow dwarf virus resistance in a wheat alien chromosome substitution line. *Phytopathology* 88, 851-855.
- Banks, P. M., Larkin, P. J., Bariana, H. S., Lagudah, E., Appels, R., Waterhouse, P. M., Brettell, R. I. S., Chen, X., Xu, H. J., Xin, Z. Y., Qian, Y. T., Zhou, X. M., Cheng, Z. M., Zhou, G. H.** (1995). The use of cell culture for sub-chromosomal introgressions of BYD virus resistance from *Thinopyrum intermedium* to wheat. *Genome* 38, 395-405.
- Barloy D, Étienne C, Lemoine J, Saint-Ouen Y, Jahier J, Banks P M, Trottet M,** 2003. Comparison of TAF46 and Zhong 5 resistances to barley yellow dwarf virus from *Thinopyrum intermedium* in wheat. *Euphytica* 129, 361-369.
- Burnett, P. A., Comeau, A., Qualset, C. O.** 1995. Host plant tolerance or resistance for control of barley yellow dwarf. In "*Barley yellow dwarf, 40 years of progress*" (C. J. d'Arcy & P. A. Burnett, ed.), pp. 321-344. APS Press, St. Paul, Mn.
- Chapman, N.H., Burt, C., Dong, H., Nicholson, P.** (2008) The development of PCR-based markers for the selection of eyespot resistance genes *Pch1* and *Pch2*. *Theor. Appl. Genet.* DOI 10.1007/s00122-008-0786-3.
- Comeau, A., Makkouk, K. M., Ahmad, F., and Saint-Pierre, C. A.** 1994. Bread wheat x *Agroticum* crosses as a source of immunity and resistance to the PAV strain of barley yellow dwarf luteovirus. *Agronomie* 14, 153-160.
- Huguet-Robert V., Dedryver F., Röder M.S., Korzun V., Abélard P., Tanguy A.M., Jaudeau B., Jahier J.** 2001. Isolation of a chromosomally engineered durum wheat line carrying the *Aegilops ventricosa Pch1* gene for resistance to eyespot. *Genome* 44:345-349.
- Larkin, P. J., Banks, P. M., Lagudah, E. S., Appels, R., Chen, X., Xin, Z., Ohm, H. W., and McIntosh, R. A.** (1995). Disomic *Thinopyrum intermedium* addition lines in wheat with barley yellow dwarf virus resistance and with rust resistances. *Genome* 38, 385-394.
- Law, C. N., Scott P. R., Worland A. J., and Hollins T. W.** (1975) The inheritance of resistance to eyespot (*Cercospora herpotrichoides*) in wheat. *Genetical Research* 25, 73-79
- Mena M., Orellana J., Lopez-Brana I., Garcia-Olmedo F., Delibes A.** 1993. Characterization of wheat/*Aegilops ventricosa* introgression and addition lines with respect to the Mv genome. *Theor. Appl. Genet.* 86:197-204.
- Muranty H., Jahier J., Tanguy A.M., Worland A.J., Law C.N.** 2002. Inheritance of resistance of wheat to eyespot at the adult stage. *Plant Breeding* 121, 531-538.
- Singh, R. P.** 1993. Genetic association of gene Bdv1 for tolerance to BYDV with genes *Lr34* and *Yr18* for adult plant resistance to rust in bread wheat. *Plant Dis.* 77, 1103-1106.