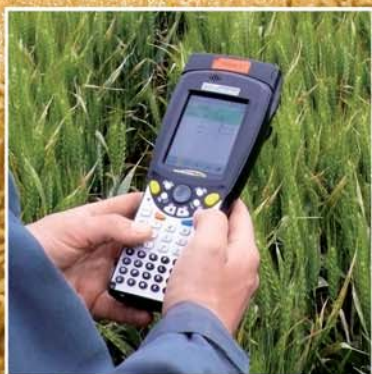


Synthèse des programmes de recherche FSOV



**Actes de
la rencontre
scientifique**

8 janvier 2015



*Fonds de Soutien
à l'Obtention Végétale*

Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale



Dans l'accord interprofessionnel relatif au renforcement de l'obtention végétale en blé tendre mis en place en 2001, le Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale (FSOV) a été défini comme un fonds destiné à financer des programmes de recherche collectifs sur le blé tendre, dont la finalité est la sélection de variétés adaptées à une agriculture durable plus respectueuse de l'environnement.

Et aujourd'hui encore, cet objectif demeure au cœur des préoccupations de la filière agricole, comme l'illustre, par exemple, le développement de l'AgroEcologie. C'est pourquoi, le FSOV soutient les projets d'amélioration variétale de blé tendre, permettant la création de variétés performantes, économes en intrants, adaptées à leur environnement et conduisant à une production de haute qualité technologique.

Je souhaite également rappeler que depuis le 1^{er} Juillet 2014, et l'entrée en application de l'extension de l'accord CVO Recherche à l'ensemble des céréales à paille, les missions du FSOV s'ouvrent également à ces nouvelles espèces, laissant entrevoir un appel à projets 2016 riche en nouveautés et porteur de promesses pour l'ensemble de la filière.

D'ici là, je vous invite d'ores-et-déjà à retrouver, en cette 4^{ème} Rencontre du FSOV, les résultats des programmes retenus lors de l'appel à propositions 2010 mais aussi à découvrir les 11 nouveaux programmes issus de l'appel à projets 2014 !



François JACQUES
Président du Comité d'engagement du FSOV



Section Céréales et Protéagineux
44 rue du Louvre - 75001 Paris
Tél. : 01 42 33 79 09 - E-mail : fsov@gnis.fr
www.fsov.org

SOMMAIRE



PROJETS TRANSVERSAUX

- Évaluation et exploitation de translocations Blé-Seigle dans le blé tendre..... page 2
- Validation de marqueurs liés à des gènes d'intérêt en vue de l'établissement d'une base de données pour la sélection assistée chez le blé tendre page 11



ADAPTATION AU MILIEU

- Identification des déterminismes génétiques permettant une élaboration optimale du rendement sous contraintes (*climatiques, azote et maladies*) page 19



AMÉLIORATION DE LA RÉSISTANCE AUX MALADIES & RAVAGEURS

- Interaction stimulateurs de défense des plantes / génotypes de blé tendre dans la lutte contre la septoriose page 26
- Développement d'un nouvel outil d'aide à la sélection de variétés de blé résistant à la septoriose page 33
- Étude et identification de facteurs de résistance à la cécidomyie chez le blé tendre page 38
- Évaluation de la résistance du blé tendre à la septoriose par génétique d'association page 42



AMÉLIORATION DE LA QUALITÉ SANITAIRE DES BLÉS TENDRES

- Étude des facteurs de résistance du blé tendre à la production des mycotoxines T2, HT2, DON et NIV par les fusarioses page 47
- Constitution d'une mycothèque des champignons pathogènes du blé tendre et mise au point d'outils permettant la caractérisation et la quantification de ces espèces page 53



VALORISATION DES INTRANTS ET DES RESSOURCES NATURELLES

- Variabilité génétique pour l'absorption d'azote post-floraison page 65

Evaluation et exploitation de translocations Blé-Seigle dans le blé tendre

Joseph JAHIER¹, Olivier CORITON¹, Denise DEFFAINS¹, Gérard BRANLARD², Annie FAYE², François Xavier OURY², Stephen SUNDERWIRTH³, Pascal GIRAUDAU³, Volker LEIN³, Sylvie DUTRIEZ³, Philippe LEREBOUR³, Jean-Michel DELHAYE³, Laure DUCHALAIS³

1 – INRA, UMR IGEPP, BP 35327, 35653 Le Rheu

2 – INRA, UMR GDEC, 5 chemin de Beaulieu, 63039 Clermont-Ferrand Cedex 2

3 – C.E.T.A.C (Centre d'Etudes Techniques pour l'Amélioration des Céréales), 7 rue Coq-Heron 75030 PARIS cedex 01

1. Introduction

Les blés appartiennent à la tribu des triticeées qui renferme plus de 300 espèces appartenant à 19 genres. La plupart d'entre elles peuvent être hybridées par le blé dans l'objectif d'introduire de nouveaux gènes et donc d'accroître la variabilité disponible pour le sélectionneur. L'objectif dans les tentatives d'introgressions est d'introduire dans le blé les gènes recherchés en évitant d'incorporer ceux ayant un effet délétère. C'est pour cette raison que tous les transferts réussis et effectivement exploités correspondent à des segments de chromosomes très courts. Des revues bibliographiques ont été faites (dont Jiang *et al.* 1993, Schneider *et al.* 2008). A notre connaissance, le seul exemple d'introgression qui déroge à la règle ci-dessus concerne l'exploitation du chromosome 1R. Ce dernier a été d'abord utilisé dans des variétés, sous forme de substitution 1R(1B). Cette dernière a rapidement été supplantée par la translocation 1BL.1RS et à moins grande échelle par la translocation 1AL.1RS.

Translocation 1BL-1RS

La translocation 1BL.1RS était présente dans près de 60% des blés cultivés en Chine dans les années 80- 90 (Jia G., com. pers.). Lukaszewski (1990) montre qu'en 1990, 38% du matériel testé dans 'International Winter Wheat Performance Nursery' (IWWPN) possède la translocation. En 2003, environ 50% du germplasm blé du CIMMYT est transloqué 1BL.1RS. En Europe, on ne dispose pas de statistiques précises sauf pour l'ex-RFA : par exemple en 1983, sur 48 variétés commerciales de ce pays, 18 étaient des transloquées 1BL.1RS. Il apparaît donc que la translocation 1BL.1RS a été très exploitée. De toutes les introgressions dans le blé, elle est indiscutablement celle qui a eu le plus grand succès.

En France, quelques variétés transloquées ont été inscrites au catalogue jusqu'en 1995 comme Clément (1974), Promentin (1983), Foison (1985), Damier (1995), Cyrano (1994). Comme des blés BPS sont recherchés en priorité, la translocation 1BL.1RS a disparu du paysage variétal français.

Les effets de la translocation sont les suivants :

1 - Résistance aux maladies

1RS porte les gènes de résistance *Sr31*, *Lr26*, *Yr9*, *Pm8*. Ces derniers ont été rapidement contournés.

2 - Rendement et composantes du rendement

La plupart des études dont Carver et Rayburn (1994), Moreno-Sevilla *et al.* (1995a) et Villareal *et al.* (1998) montrent un effet positif sur le rendement qui s'explique par une biomasse aérienne, une fertilité par épillet et un poids de 1000 grains supérieurs, et aussi une période de remplissage plus longue.

3 - Valeur technologique et boulangère

Les effets de la translocation 1BL.1RS sur la composition du grain et sa qualité technologique ont été bien décrits. D'une manière générale on observe une légère augmentation de la teneur en protéines (Carver et Rayburn 1995, Moreno-Sevilla *et al.* 1995b, McKendry *et al.* 1996). La dureté de l'albumen est parfois sensiblement diminuée et plusieurs auteurs ont rapporté une légère décroissance du rendement en mouture. L'élimination du bras court du chromosome 1B portant les locus *Glu-B3* (codant pour les sous-unités gluténines de faible poids moléculaire) et *Gli-B1* (codant pour des oméga -gliadines) au profit d'un fragment 1RS portant le locus *Gli-R1* codant des sécaldines n'apportant aucune liaison intermoléculaire a pour résultat un affaiblissement des propriétés rhéologiques de la pâte. On constate alors une moins bonne stabilité au pétrissage et une diminution de la force du gluten. Les oméga-sécaldines très hydrophiles, améliorent l'aptitude de la farine à retenir l'eau. Le bras court du chromosome 1R a aussi été associé à un accroissement du pouvoir collant de la pâte d'une part en raison de la présence des oméga-sécaldines mais aussi d'un accroissement de la quantité de pentosanes (constituants également très hydrophiles). Mais une sélection rigoureuse peut atténuer ces effets négatifs sur la qualité boulangère des blés (Carver et Rayburn 1995, Lee *et al.* 1995). Des travaux récents (Gobaa *et al.* 2007, 2008) ont montré que des lignées possédant cette translocation pouvaient être d'excellente qualité technologique.

Translocation 1AL-1RS

La seule translocation 1AL.1RS a été obtenue aux USA dans la descendance d'un croisement du triticale 'Gaucho' et un blé. La première lignée porteuse de la translocation obtenue en 1976 a été nommée 'Amigo' en 1995 (Sebesta *et al.* 1995). L'utilisation d' Amigo en sélection aux USA a abouti aux variétés comme 'TAM 107', 'TAM 200', 'Century' et 'Nekota'.

Les effets de la translocation 1AL.1RS présentent des différences avec ceux de 1BL.1RS :

1 - Résistance aux maladies

Amigo est résistante à *Eriophyes tulipae* ('greenbug') et porte les gènes de résistance *Pm17* et un gène de résistance à la rouille noire qui ne peut être distingué de *Sr31*.

2 - Rendement et composantes du rendement

Villareal *et al.* (1996) montrent que, quelque soit l'environnement, la translocation a un effet positif très marqué sur le rendement en grain, la biomasse aérienne, le poids de 1000 grains ainsi que sur la période de remplissage. Ehdaie *et al.* (2003) évaluent les performances agronomiques et le système racinaire de 'Pavon' (Cimmyt), Pavon 1AL.1RS et Pavon 1BL.1RS. Une corrélation positive est trouvée entre la biomasse racinaire et le rendement en grains. Les biomasses racinaires des génotypes

sont : Pavon 1AL.1RS > Pavon 1BL.1RS > Pavon. Le rendement élevé des variétés possédant 1RS pourrait être dû à des déterminants génétiques portés par le 1RS et conférant une biomasse racinaire supérieure qui améliore l'absorption d'eau et d'éléments minéraux du sol.

3 - Valeur technologique et boulangère

La translocation 1AL.1RS offre moins d'effets négatifs sur les caractéristiques technologiques de la pâte que la translocation 1BL.1RS (Graybosch *et al.* 1991, Espitia-Rangel *et al.* 1999). Ceci serait dû au fait que le bras court du chromosome 1A (absent chez les lignées transloquées) porte au locus Glu-A3 des gènes codant pour des sous-unités gluténines de faible poids moléculaires qui sont souvent peu influents sur les caractéristiques rhéologiques de la pâte. Leur remplacement par les gènes du locus *Gli-R1* a donc un impact moins visible que dans le cas de la translocation 1BL.1RS. La translocation 1AL.1RS a une incidence sur la teneur et la composition en pentosanes (Saulnier *et al.* 2007). La substitution 1R(1A) avait montré que la pâte pouvait être non collante et donner un volume du pain significativement supérieur à celui obtenu avec la substitution 1R(1B) (Amiour *et al.*, 2002.). La translocation 1AL.1RS a donc une incidence sur les caractéristiques technologiques qu'il convient de mieux connaître et exploiter.

► Objectifs de l'étude

En 1976, Bernard a créé des lignées d'addition blé-seigle. L'une d'elles (addition F) a le chromosome ajouté 1R (Bernard 1976). A partir de cette dernière, nous avons produit des substitutions 1R(1A), 1R(1B) et 1R(1D) dans différents fonds génétiques. L'évaluation de leurs valeurs technologiques a été réalisée et publiée (Amiour *et al.*, 2002.). Le résultat principal est que les lignées 1R(1A) ont une valeur boulangère, notamment au niveau du volume du pain, très supérieure à celles des lignées 1R(1B).

Suite à ce résultat, nous avons essayé de produire dans le fonds génétique Courtot les quatre lignées de translocation 1AS.1RL, 1AL.1RS, 1BL.1RS et 1BS.1RL. Comme 1AS.1RL n'a pu être produite avant le début de la présente étude, son obtention est un des objectifs du projet.

Nous n'avons pas essayé de produire les translocations 1DL.1RS et 1DS.1RL pour les deux raisons suivantes : 1) faute de temps et de moyens et 2) les données bibliographiques indiqueraient que ces deux translocations ne puissent avoir un futur prometteur dans l'amélioration du blé.

Les objectifs de l'étude sont les suivants :

- 1 - Décrire la variabilité agronomique et technologique des lignées isogéniques de Courtot ayant soit
 - le chromosome 1A ou 1B ou 1D substitué par le chromosome 1R du seigle
 - la translocation 1AL-1RS, 1BL-1RS ou 1BS-1RL
- 2 - Décrire l'influence de ces translocations au sein de descendances avec 4 cultivars récents, sur les caractéristiques agronomiques et de valeur d'utilisation. Plus particulièrement, étant donné que le bras court 1RS est le même dans les deux chromosomes transloqués 1AL.1RS et 1BL.1RS, nous serons en mesure, pour la première fois, de comparer ces deux translocations.

2. Matériel et méthodes

► Matériel végétal

- Les substitutions disomiques 1R(1A), 1R(1B) and 1R(1D) dans Courtot : Courtot 1R(1A), Courtot 1R(1B) et Courtot 1R(1D)

- Les lignées de translocation dans Courtot : Courtot 1AL-1RS ; Courtot 1BL-1RS ; Courtot 1BS-1RL. La lignée Courtot 1AS-1RL a été développée au cours du projet et n'a pu être évaluée comme les trois premières.

- Des lignées transloquées BC1F2 issues du rétrocroisement des trois premières translocations par 4 lignées/variétés : Caphorn, Koréli, CF 03287 et Skerzzo. Leur sélection a été terminée en année 2 du projet.

- Des lignées/variétés transloquées 1AL.1RS ou 1BL.1RS issues de la sélection

► Méthodes

- Techniques de cytogénétique : le dénombrement des chromosomes et l'analyse des méioses en métaphase I ont été faites suivant des techniques standard (Jahier et Tanguy 1992)

L'identification et le suivi des chromosomes transloqués ont été réalisés à l'aide de l'électrophorèse des protéines de réserve (Singh *et al.* 1991) et de la technique d'hybridation in situ GISH/FISH (Dumur *et al.* 2009)

- Evaluation au champ (rendement et caractères phénotypiques) : les géotypes ci-dessus ont été expérimentés selon deux types d'essais (fertilisation raisonnée et faibles intrants) en quatre lieux.

- La valeur technologique et la valeur boulangère. Les tests suivants ont été mis en œuvre à l'INRA de Clermont Fd : PMG, PS, teneur en protéines et dureté de l'albumen par NIRS, temps de Chute d'Hagberg, Viscosité des pentosanes (Grosjean *et al.* 1999). Le laboratoire LIVRAC (44115 HAUTE GOULAIN, France) réalisa la mesure des caractéristiques rhéologiques avec l'alvéographe Chopin et la panification.

3. Résultats et discussion

► Développement du matériel d'étude

a - Extraction de la translocation 1AS.1RL dans le fonds génétique Courtot

La F1 entre la lignée de substitution 1R (1A) et Courtot est double monosomique : les chromosomes 1R et 1A sont univalents à la métaphase 1 de la méiose. Dans une partie des cellules l'un et/ou l'autre subissent une cassure au niveau du centromère pour donner naissance à deux chromosomes télocentriques. Lors de la deuxième division, ces derniers peuvent fusionner (fusion centrique) (Friebe *et al.* 2005). C'est ainsi que des chromosomes transloqués 1AS.1RL et/ou 1AL.1RS peuvent être générés.

En F2, plusieurs géotypes sont obtenus. Ils ont un nombre de chromosomes allant de 40 à 43 dont un ou deux peuvent être télocentriques.

Le tri des plantes F2 se fait d'abord à l'aide de la technique d'électrophorèse SDS-PAGE. Les profils observés renseignent sur la présence/absence des bras des chromosomes 1A et 1R.

Les chromosomes des plantes retenues sont ensuite analysés à l'aide de l'hybridation in situ. D'abord une sonde d'ADN de seigle permet de visualiser la chromatine de seigle et donc de voir si un chromosome transloqué blé-seigle est présent. Puis deux sondes ciblant les ADN ribosomiques présents sur les bras 1AS, 1BS et 1RS sont appliquées. Elles permettent de savoir si le chromosome transloqué est bien le 1AS.1RL.

Enfin, le comportement méiotique en métaphase est analysé chez les plantes possédant 1AS.1RL afin de vérifier que les autres chromosomes ne présentent pas d'anomalie.

282 grains F2 Courtot x Cour 1R(1A) ont été analysés par électrophorèse. Quinze d'entre eux ont été retenus.

L'analyse des plantes par hybridation in situ et l'examen des méioses a permis de retenir 3 plantes avec le chromosome 1AS.1RL et possédant les caractéristiques suivantes :

- Plante 59 : 1AS.1RL + 1R, pas de 1A, 2n = 42 (figure 1)
- Plante 223 : 1AS.1RL + 1R, pas de 1A, 2n = 42
- Plante 261 : 1AS.1RL, pas de 1A, 2n = 41

Puis la sélection dans la descendance des plantes 59 et 261 a permis, en utilisant les mêmes techniques qu'en F2, d'identifier 8 plantes disomiques pour 1AS.1RL, à 2n=42 et avec une méiose régulière (21 bivalents)

La lignée Courtot 1AS.1RL n'a été obtenue qu'en année 3 et de ce fait n'a pu être évaluée.

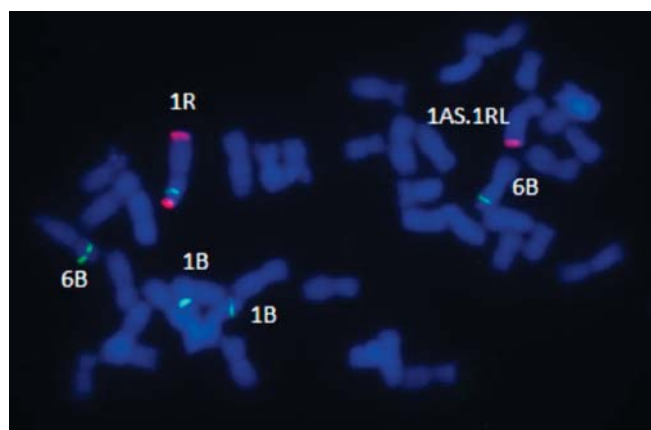


Figure 1 : Cellule de la plante 59 hybridée avec la sonde d'ADN de seigle (rouge) et la sonde 45S rDNA (vert). Cette plante possède le chromosome transloqué 1AS.1RL ainsi que le chromosome 1R.

b - Production de lignées transloquées BC1F2 dans les fonds génétiques

En 2008, les 3 lignées de translocations disponibles dans Courtot (1AL.1RS, 1BL.1RS et 1BS.1RL) ont été croisées par Caphorn, Koréli, CF03287 et Skerzzo. Des 12 croisements possibles, seul Koréli x Courtot 1AL.1RS n'a pas été obtenu.

Les 11 F1 ont été rétrocroisées en 2009.

En 2009-2010, des plantes hétérozygotes pour les translocations ont été sélectionnées dans les descendance BC1F1 à l'aide d'électrophorèse des protéines de réserve.

En 2010-2011 (année 1 du FSOV), les protéines de 800 demi-grains ont été analysées en SDS-Page. 56 d'entre eux sont apparus homozygotes pour une des translocations. De plus la majorité d'entre eux possèdent toutes ou la majeure partie des protéines de réserve des parents récurrents.

Pour différentes raisons (absence de germination, aneuploïdie, peu de grains récoltés), seules 48 plantes ont produit assez de grains pour envisager une multiplication de semences en 2011-2012.

La multiplication des semences a été médiocre pour certaines lignées si bien que 42 lignées ont été retenues pour une évaluation en année 3.

Nous avons projeté de sélectionner en année 1, pour chaque combinaison 'translocation x parent récurrent' en moyenne 10 plantes BC1F2 homozygotes pour la translocation concernée. Nous avons aussi prévu, à l'aide de marqueurs DArT, de ne retenir au sein des 10 plantes que les 5 plantes présentant le plus d'isogénicité avec le parent récurrent. Pour réaliser l'objectif il aurait fallu analyser en année 1 les protéines d'environ 2000 grains, ce qui était au-delà de nos possibilités.

Malgré tout, l'analyse DArT a été réalisée avec l'objectif moins ambitieux de vérifier que tout le matériel retenu correspondait effectivement à des BC1F2 et mettre en évidence des marqueurs spécifiques des bras 1RS et 1RL.

La moyenne des 51 pourcentages d'identité est égale à 75.08. Dans une population de plantes BC1, la proportion théorique du génome du parent récurrent est 75%. On peut donc considérer que le pourcentage d'identité calculé est une estimation tout à fait acceptable de la part du parent récurrent dans les lignées BC1F2.

La majorité des pourcentages d'identité sont compris entre 70 et 80% (écart-type = 4.65). Seuls six d'entre eux sont supérieurs à 80%, et trois sont inférieurs à 70%.

La même analyse a été faite pour le chromosome transloqué de chaque lignée BC1F2. On s'attend à obtenir des pourcentages d'identité nettement inférieur à 75%. C'est effectivement le cas sauf pour les deux lignées Skerzzo 1BS1RL n° 470 et 479 avec respectivement un pourcentage d'identité respectivement égal à 97.3 et 79.5%. Nous avons fait l'hypothèse que la translocation dans ces deux lignées concernerait le chromosome 1A.

Recherche de marqueurs DArT du chromosome 1R

Des 1865 sondes ADN, 385 peuvent s'hybrider sur les chromosomes du groupe d'homéologie 1. Au sein de ce groupe, 36 ont pour origine le seigle (code = rPt+chiffre) ou le triticale (code = tPt+chiffre). Ce sont des marqueurs potentiels de la chromatine seigle dans notre matériel. Au sein des lignées 1AL.1RS, 17 sont marqueurs du 1RS. Dans le cas des lignées 1BL.1RS, ce nombre est de 14 dont 12 sont communs aux deux séries de lignées. Il apparaît donc qu'on dispose de 12 marqueurs spécifiques du bras chromosomique 1RS (tableau 1).

La même analyse sur les lignées 1BS.1RL met en évidence 8 marqueurs spécifiques du bras chromosomique 1RL. Quatre d'entre eux sont déjà marqueurs du 1RS. L'hypothèse la plus plausible est que ces 4 marqueurs concernent le centromère. Les deux derniers marqueurs viennent du blé (code wPt). Ce résultat est surprenant mais peut être expliqué par le fait que les sondes d'ADN génomique blé viennent de lignées très différentes des parents récurrents de nos lignées transloquées.

Tableau 1 : Marqueurs des bras chromosomiques 1RS et RL dans les lignées BC1F2.

Marqueurs du 1RS		Marqueurs du 1RL
dans les lignées 1AL.1RS	dans les lignées 1BL.1RS	dans les lignées 1BS.1RL
tPt-1051 *	tPt-1051 *	tPt-1051 **
rPt-3642 *	rPt-3642 *	rPt-3642 **
rPt-2869 *	rPt-2869 *	rPt-2869 **
tPt-0136 *	tPt-0136 *	tPt-0136 **
tPt-2326 *	tPt-2326 *	
tPt-2240 *	tPt-2240 *	tPt-7918
rPt-6965 *	rPt-6965 *	
tPt-3696 *	tPt-3696 *	rPt-4523
tPt-8754 *	tPt-8754 *	
tPt-1586 *	tPt-1586 *	wPt-0441
tPt-2550 *	tPt-2550 *	
tPt-0734 *	tPt-0734 *	wPt-1726
rPt-6561	tPt-7918	
rPt-4523	rPt-0018	
rPt-0079		
tPt-4566		
tPt-2326		
tPt-3696		

* : communs aux lignées 1AL.1RS et 1BL.1RS

** : marqueurs communs au 1RS et au 1RL

Marqueurs du 1RS dans les lignées issues de sélection

Des 36 sondes de seigle données (par Triticarte) comme spécifiques du groupe d'homéologie 1, 20 s'hybrident avec les ADN des 10 lignées 1AL.1RS ou 1BL.1RS issues de sélection. Parmi elles, on retrouve les 12 marqueurs du 1RS des lignées de translocation précédentes. Il est donc raisonnable de penser que ces 12 marqueurs seront efficaces dans les cas où le 1RS aurait une origine différente.

► Stabilité des lignées de Courtot transloquées 1AL.1RS, 1BL.1RS et 1BS.1RL

50 plantes de chacune des trois lignées transloquées et de Courtot ont été cultivées au champ en année 1. En mai des prélèvements d'anthères sur 10 plantes par lignée ont été réalisés. À l'issue de l'observation des comportements méiotiques, 5 plantes par lignée dont la régularité de la méiose était incontestable (21 bivalents dans la majorité des cellules-mères du pollen, majorité de bivalents anneaux, pas de multivalent) ont été sélectionnées et récoltées.

En année 2, les grains des différentes plantes-mères ont été mis à germer en boîtes de pétri. Les méristèmes racinaires d'au moins 120 grains germés ont été prélevés soit $120 \times 5 = 600$ prélèvements minimum par lignée. Les grains prélevés ont ensuite été plantés dans des terrines qui ont été, environ 10 jours plus tard, transférés dans une chambre de vernalisation.

Les dénombrements chromosomiques ont été faits au cours des deux mois de vernalisation des jeunes plantes. Toutes les plantes n'ont pu être dénombrées en raison d'un index mitotique insuffisant pour certaines. Néanmoins le nombre de plantes dénombrées par ligne a été proche de 500 (nombre qu'il était prévu de réaliser) (tableau 2).

Les jeunes plantes aneuploïdes ont été repiquées après vernalisation dans un tunnel. Après quelques jours de croissance, des méristèmes foliaires ont été prélevés. Plus tard, au stade de la méiose des anthères ont été prélevées.

L'examen des méioses a été réalisé en premier. Elle a permis de confirmer et d'identifier sans ambiguïté les types d'aneuploïdies. Deux plantes qui avaient des nombres de chromosomes aberrants (entre 60 et 66 pour l'une et, 42 ou 84 pour l'autre) ont présenté une méiose d'euploïde. Elles présentaient donc de la mixoploïdie au niveau racinaire et il est vraisemblable que le compartiment diploïde est à l'origine des épis.

Tableau 2 : Résultats des dénombrements chromosomiques chez les lignées de translocation 1AL.1RS, 1BL.1RS et 1BS.1RL dans le fonds génétique Courtot.

	Plantes dénombrées	Plantes euploïdes	Plantes aneuploïdes	Fréquence d'aneuploïdes
1AL.1RS	461	448	13	2.8%
1BL.1RS	502	492	10	2%
1BS.1RL	507	496	11	2.2%
Courtot	475	463	12	2.8%

Les fréquences d'aneuploïdes observées, essentiellement des monosomiques ($2n=41$) et des trisomiques ($2n=43$) chez les trois lignées de translocation sont comprises entre 2% et 2.8%. Chez Courtot elle est de 2.5%. L'analyse statistique n'a pas montré de différence significative entre les génotypes. En conséquence, il apparaît que l'introduction dans Courtot des chromosomes transloqués n'induit pas une instabilité du nombre de chromosomes.

Comme la présence dans Courtot des chromosomes transloqués n'affecte pas la stabilité du nombre de

chromosomes, il est raisonnable de penser que l'aneuploïdie ne concerne ni plus ni moins les chromosomes transloqués que les 20 paires de chromosomes du blé. Nous avons, par la technique GISH (utilisation d'une sonde marquée d'ADN de seigle), pu analyser les chromosomes des méristèmes foliaires de 26 des 34 plantes aneuploïdes détectées dans les trois lignées de translocation. Toutes sauf une présentaient une paire de chromosomes transloqués.

En définitive, il apparaît que les translocations 1AL.1RS, 1BL.1RS et 1BS.1RL ne sont pas un facteur d'instabilité. C'est un résultat encourageant dans la mesure où l'une d'elles ou les trois devaient à l'avenir être exploitées en création variétale.

► Evaluation agronomique - Les lignées de substitution et de translocation dans Courtot

a : Résistance aux maladies

Courtot est assez sensible à très sensible aux rouilles jaune et brune, à la fusariose et à la septoriose. Les lignées de substitution ou translocation présentent toutes un niveau de sensibilité à ces quatre maladies comparable à Courtot. Donc ni le bras long 1RL ni le bras court 1RS ne portent des gènes de résistance efficaces dans le fonds génétique Courtot.

b : Rendement (Tableau 3)

Elles ont été évaluées en années 1 et 2 respectivement sur 2 et 5 lieux en mode conventionnel (C) et en mode Faibles intrants (Fi). Dans les deux situations, le dispositif était de types blocs randomisés à 2 répétitions.

En année 1, le matériel a été évalué à Rennes (35) (C et Fi) et Clermont (63). En année 2, l'expérimentation a été conduite à : Rennes (35), Clermont (63), Allones (28), Louville (28) et Froissy (60) en conventionnel et en faibles intrants

Tableau 3 : Productivité des lignées de substitution et de translocation dans Courtot.

	Année 1		Année 2	
	Conventionnel	Faibles intrants	Conventionnel	Faibles intrants
Courtot 1R(1A)	62.3	57.6	73.6	94.9
Courtot 1R(1B)	89.5	86.7	76.1	65.0
Courtot 1R(1D)	58.5	58.2	73.5	80.4
Courtot 1AL.1RS	96.5	92.7	104.9	122.7
Courtot 1BS.1RL	67.9	70.5	76.9	63.4
Courtot 1BL.1RS	100.2	102.1	110.5	127.0
Courtot	100	100	100	100
Courtot (qx / ha)	79.8	53.3	70.3	49.4

En conventionnel

- Les lignées de substitution : Courtot 1R(1A) et de Courtot 1R(1D) ont un rendement inférieur d'au moins 25% par rapport à Courtot. Le rendement de Courtot 1R(1B) est proche de celui de Courtot en année 1 mais il s'effondre en année 2 pour redevenir au niveau des deux autres substitutions.
- Les lignées de translocation : Courtot 1BS. 1RL a, comme les lignées de substitution un rendement très inférieur à celui de Courtot. Courtot 1AL.1RS et Courtot 1BL. 1RS ne se différencient pas de Courtot en année 1. Par contre elles sont plus productives que Courtot en année 2 mais seule Cour 1BL.1RS est significativement supérieure.

En faibles intrants

- Les rendements en Faibles intrants sont très faibles. Comme en conventionnel, les 3 lignées de substitution et Courtot 1BS.1RL sont très inférieures à Courtot. De nouveau, Courtot 1AL.1RS et Courtot 1BL.1RS sont proches (année 1) ou supérieures à Courtot (année 2). Comme les notations maladies n'ont pas montré d'effet positif des translocations, ce dernier résultat indiquerait que le bras court 1RS du seigle permettrait de contrecarrer une diminution des intrants azotés.

Conclusion : dans le fonds génétique Courtot, le chromosome 1R n'a un intérêt quant à la productivité que s'il est exploité sous forme de translocation 1BL.1RS.

Les lignées de translocation issues de la sélection

- 8 d'entre elles ont la translocation 1BL.1RS : Pamier (*Lantmannen SW Seed Hadmersleben*, 2008), LP1794-4-05, Humber (*KWS UK Limited* 2005), Célestin (*Serasem*, 2010), Nord.05090-46, Sollario (*Caussade Semences*, 2007), Chevron (*Saaten Union Recherches* 2008), Rialto (*Plant Breeding Institute*, 1993)
- 2 ont la translocation 1AL.1RS : SC1 et SC2 (Secobra).

Leurs rendements ont été évalués dans le même essai que les lignées de substitution et de translocation dans Courtot. Les 3 témoins ont été : Apache, Premio et Bermude. Les rendements moyens sont donnés au tableau 4.

En conventionnel, les rendements des 10 lignées vont de 83.9 à 103.8 qx pour Chevron. Six d'entre elles ont un rendement supérieur à la moyenne (95.2 qx) des trois témoins. Seule Chevron est significativement supérieure à cette dernière.

Il est important de noter que parmi les 4 lignées ayant un rendement supérieur à 100 qx, figurent les deux lignées SC1 et SC2 ayant la translocation 1AL.1RS issue de Amigo.

En Faibles intrants, le rendement moyen de l'essai est 71.7 contre 96.1 qx en conventionnel soit une baisse de rendement de 25.2%. Cette baisse de rendement va de 20.9% pour Premio à 32% chez Sollario. Tous les génotypes y compris les témoins sont affectés à un niveau équivalent malgré des sensibilités aux maladies différentes. Ceci est confirmé par un coefficient de corrélation de 0.92 entre les rendements en conventionnel et ceux en faibles intrants.

En conclusion, aucune des 10 lignées de translocation ne semble avoir d'aptitude particulière pour une culture Faibles intrants. De plus il est possible de produire des lignées transloquées 1BL.1RS (e.g. Chevron) ou 1AL.1RS (e.g. SC1) au moins aussi productives que les meilleures variétés non-transloquées actuelles. Notons que la lignée SC1 a été inscrite au catalogue en 2013 sous le nom de Memory.

Tableau 4 : rendements moyens (5 essais) des lignées transloquées issues de la sélection.

	Conventionnel		Faibles intrants	
	Rendement moyen/5 essais	% de T1 +T2+T3	Rendement moyen/5 essais	% de T1 +T2+T3
Pamier	92.2	96.8	65.5	89.2
LP1794-4-05	95.8	100.6	73.7	100.4
Humber	91.8	96.4	68.6	93.5
Célestin	98.8	103.7	73.6	100.3
Nord.05090-46	101.0	106.0	77.2	105.2
SC1	101.9	107.0	78.3	106.7
SC2	101.2	106.2	74.0	100.8
Sollario	83.9	88.1	57	77.7
Chevron	103.8	108.9	74.7	101.8
Rialto	93.4	98.1	69.7	95.0
Apache (T1)	91.7	96.3	69.6	94.8
Premio (T2)	102.3	107.5	80.9	110.2
Bermude (T3)	91.6	96.2	69.7	95.0

Les lignées transloquées BC1F4 dans 4 fonds génétiques

a - Résistance aux maladies

La plupart des lignées sont aussi ou plus sensibles que le parent récurrent vis-à-vis de la rouille jaune, la rouille brune, la fusariose et la septoriose. Seules les lignées de Caphorn transloquées apparaissent moins sensibles que Caphorn à la fusariose. Il apparaît évident que l'information génétique seigle, que ce soit le 1RS ou le 1RL, ne confère pas de la résistance.

b - Rendements (tableau 5)

b1 - La translocation 1AL.1RS

L'élément le plus important d'appréciation d'une lignée est la comparaison de son rendement avec celui du blé récurrent. L'impact de la translocation 1AL.1RS dépend du fonds génétique. Il apparaît clairement que les 4 lignées issues de Caphorn ont des rendements proches de Caphorn (91.8 à 98.7% de Caphorn). Par contre celles issues de CF03287 et Skerzzo sont très inférieures à leur parent récurrent. En effet les 7 lignées dans CF03287 font en moyenne 79.4% de CF03287 et les 3 lignées dans Skerzzo 79.39% de Skerzzo.

b2 - La translocation 1BL.1RS

L'ensemble des lignées 1BL.1RS présente des rendements faibles. La meilleure, Koréli 1BL.1RS n° 534 a un rendement de 89.15 qx soit 88.7% de Koréli. On a suffisamment de lignées dans les fonds Koréli, CF03287 et CF99102 pour conclure que la translocation a un impact négatif dans ces trois fonds génétiques. Par contre, on ne peut conclure sur le fonds Caphorn dans la mesure où une seule lignée BC1F2 a été évaluée.

b3 - La translocation 1BS.1RL

Le rendement moyen des lignées transloquées est de 67.7 qx alors que celle des blés récurrents est de 98.6 qx. La meilleure atteint 83.6 qx. Il est indiscutable que la translocation 1BS.1RL a un effet délétère sur le rendement. Le bras 1RL ne compense pas la perte de 1BL. Les résultats confirment la faiblesse du rendement de Courtot 1BS.1RL constatée plus haut.

Le tableau 5 est une synthèse des performances des trois types de translocations dans 4 fonds génétiques. Chaque lignée transloquée est inférieure à son parent récurrent et la moyenne des lignées dans chaque combinaison ne dépasse pas 85% sauf dans le cas des 4 lignées Caphorn 1AL.1RS. En effet ces dernières font 94.7% du rendement de Caphorn et la meilleure lignée 98.7% de Caphorn.

Les lignées de translocation possèdent en moyenne 75% du fonds génétique du parent récurrent (ceci a été confirmé plus haut par les marqueurs DART). Les 25% restant viennent de Courtot. L'influence moyenne de ces 25% sur le rendement n'a pu être appréciée. Ceci aurait nécessité qu'un nombre important de lignées non-transloquées identifiées lors de la recherche des lignées transloquées soient incorporées dans l'essai.

La combinaison 'Translocation x Fonds génétique' pour laquelle on a le plus de lignées évaluées est CF03287 1BL.1RS. Le rendement des 7 lignées va de 57.5 à 84.8% de celui de CF03287. L'écart très important entre ces extrêmes indiquerait que les 25% de part génétique de Courtot pourraient avoir un effet délétère sur le rendement significatif. C'est pour cette raison que nous allons rétrocroiser certaines lignées et isoler en BC2F2 des lignées transloquées et des lignées non transloquées qui seront ensuite évaluées au champ.

Tableau 5 : Productivité en mode conventionnel des différentes combinaisons 'Translocations × Fonds génétiques' exprimée en pourcentage du rendement du parent récurrent (%Rdt /récurrent).

		Fonds génétiques des translocations			
		Caphorn	Koréli	CF03287	CF99102
1AL.1RS	Nbre lignées	4		7	3
	%Rdt /récurrent	94.7		85.5	79.4
	max	98.7		92.2	82.4
	mini	91.7		77.9	74.9
1BL.1RS	Nbre lignées	1	3	7	4
	%Rdt /récurrent	82.1	78.8	73.4	85.2
	max		88.7	84.8	88.1
	mini		71	57.5	83.3
1BS.1RL	Nbre lignées	2	3	2	6
	%Rdt /récurrent	53.3	65.1	68.9	75.7
	max	55.2	77.6	71.8	83.6
	mini	51.5	55.1	66	60

Dans la modalité *Faibles intrants*, la fertilisation azotée a été réduite de 30%. La réduction de la fumure azotée n'a pas entraîné une réduction significative du rendement.

Le coefficient de corrélation entre les rendements (moyens sur les 4 lieux) des lignées transloquées dans les deux modalités est de 0,975. En conséquence, nous ne détaillons pas les rendements de la modalité 'Faibles intrants'

► Qualité technologique des lignées transloquées - Rappels préliminaires

Les participants au programme ont décidé de n'analyser les propriétés technologiques et la qualité boulangère que pour les essais conduits en faible intrant (sans troisième apport azoté). Ce choix avait notamment pour objectif de faire ressortir les lignées éventuellement aptes à exprimer une qualité technologique satisfaisante en condition d'apport azoté moindre.

Les échantillons prélevés sur les quatre parents et les deux témoins ont fait l'objet des mesures de teneur en protéines de dureté de PS et PMG. La comparaison des effets lieux sur ces 6 cultivars ainsi que les données de rendement et les observations en cours de végétation ont permis de retenir les lieux Clermont-Ferrand (63), Rennes (35), Maule (78) comme offrant une grande diversité environnementale de composition du grain et potentiellement de qualité. Nous donnons ci-dessous les principales caractéristiques de qualités technologiques et de valeur boulangère observées sur ces lignées expérimentées dans ces trois lieux.

a - La plupart des caractéristiques technologiques ont révélé une forte influence génétique

L'analyse de variance révèle que seules les mesures de PS et de Note de mie ne répondent pas à une influence génétique significative. Les 17 autres caractéristiques technologiques ont montré un effet très hautement significatif apporté par les différences entre les 41 lignées transloquées et leur parent récurrent. Cette influence génétique sera plus amplement développée ci-dessous. Notons enfin que le lieu d'expérimentation n'eut pas d'influence significative sur 5 caractéristiques : la dureté du grain (ce qui est attendu), le P et le P/L, le volume du pain et la note de pâte en panification. C'est dans l'expérimentation de Maule (78) où l'on relève les

valeurs moyennes les plus élevées pour le PS, la teneur en Protéines, le temps de chute d'Hagberg, l'Aspect du Pain la note de mie et la note finale. Les valeurs de viscosité des pentosanes et de la force sont les plus élevées à Clermont Fd.

b - Les translocations testées ont des influences très différentes sur les caractéristiques technologiques

Les translocations n'ont pas eu le même effet selon qu'elles portent sur le bras court du chromosome 1A ou 1B ou encore sur le bras long du 1B. Les valeurs moyennes de chacune des 12 principales caractéristiques technologiques, mesurées sur les 14, 15 et 12 lignées portant respectivement les translocations 1AL.1RS, 1BL.1RS et 1BS.1RL et des 6 lignées normales (non transloquées notée NT) cultivées en trois lieux, ont été comparées (Figure 2 ci-dessous). Les points suivants peuvent être soulignés :

b1 - Les 12 lignées 1BS.1RL et particulièrement celles avec Caphorn ont, (confirmant ce qui fut noté ci-dessus pour le rendement) un PMG et un PS nettement diminué. Ce déficit dans le remplissage du grain eut pour conséquence d'augmenter la teneur en protéines des lignées 1BS.1RL (15,3 %MS) contre 12,4 %MS pour les variétés NT. Leur plus grande teneur en protéines eut aussi pour conséquence d'accroître leur force, leur extensibilité et de réduire leur P/L (Figure 1A, B, C, G, I et J). Le volume du pain des lignées 1BS.1RL n'est cependant pas supérieur à celui des variétés NT et la note finale en panification reste significativement inférieure à celle des variétés NT (Figure 1 K et L).

b2 - La moyenne des 15 lignées 1BL.1RS est non significativement différente de celle des variétés NT pour plusieurs caractéristiques : PMG, PS, temps de chute d'Hagberg, Viscosité des pentosanes et la force W (Figure 1 A, B, D, E et G). Elles sont plus riches en protéines (14.4%MS vs 12.4%MS) ce qui leur confère une extensibilité L sensiblement supérieure (94.3 mm) contre 80.6 mm pour les variétés NT entraînant également une diminution de leur P/L (Figure 1 I et J). Ces lignées 1BL.1RS sont donc dépourvues des gliadines et surtout des sous-unités gluténines de faible poids moléculaires codées respectivement par les loci *Gli-B1* et *Glu-B3*. Ces protéines ont un rôle majeur sur la valeur boulangère et l'on confirme, une fois encore, que leur disparition impacte négativement le potentiel de rétention gazeuse de la pâte : en moyenne le volume du pain est réduit de 16% se situant à 1333 cm³ contre 1586 cm³ pour les variétés NT. La note finale en panification est donc significativement diminuée (196 contre 244), (Figure 2 K et L).

b3 - Les 14 lignées 1AL.1RS, bien que présentes dans 3 des 4 variétés utilisées, montrent un comportement intéressant sur les caractéristiques de qualité qu'il convient d'examiner. Les valeurs moyennes du PMG et PS de ces lignées ne sont pas significativement différentes de celles des NT. La moyenne des teneurs en protéines est légèrement supérieure 13.2 % MS contre 12.4 pour les NT, (Figure 2A, B et C). Mais la translocation 1AL.1RS eut aussi pour effet d'augmenter sensiblement la dureté (76,2 contre 67,8) et surtout la viscosité relative des pentosanes (2,04 contre 1,81). Cette augmentation attendue de la viscosité des pentosanes (Saulnier *et al.* 2007) et dans une moindre mesure de la dureté eut pour effet d'accroître la capacité d'hydratation de la farine. Le test d'alvéographe Chopin étant conduit à hydratation constante, il en résulta une sous hydratation de la pâte et du gluten et par conséquent une plus forte ténacité et une moindre extensibilité ; le P/L est donc très augmenté. (Figure 2 E, F, H, I et J). L'augmentation des

arabinoxylanes solubles dans l'eau (mesurée par la viscosité des pentosanes) est vraisemblablement aussi responsable du retard du temps de chute d'Hagberg, (Figure 2D).

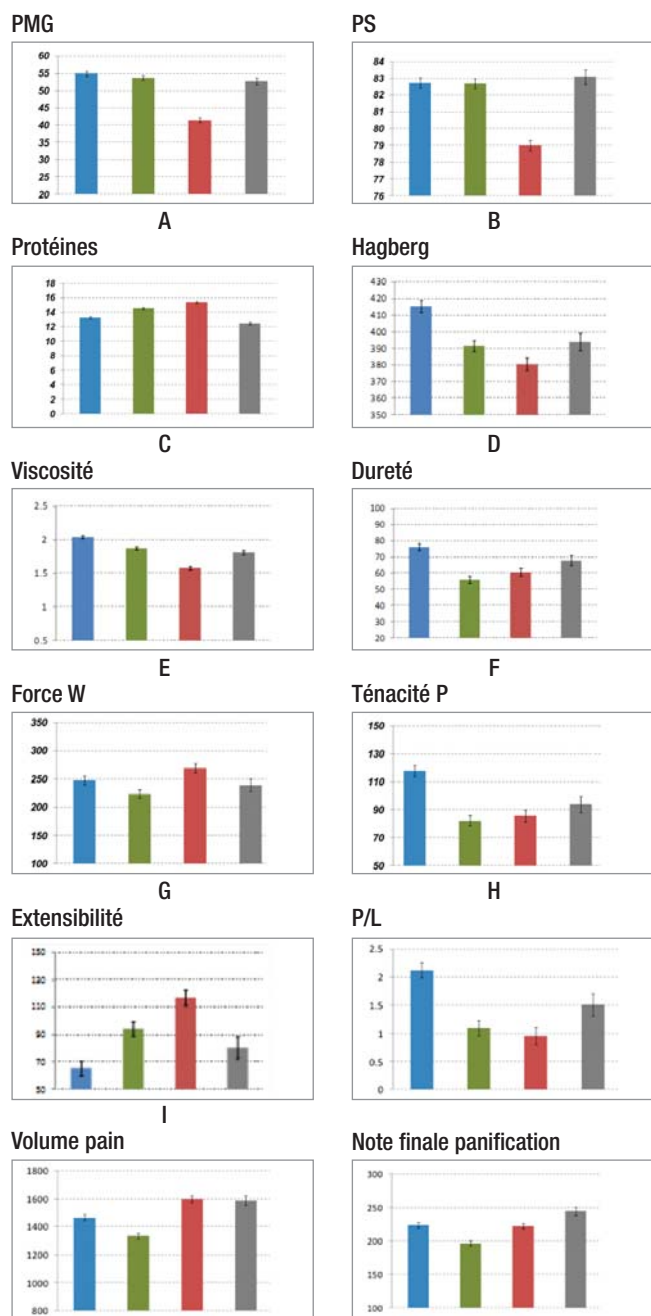


Figure 2 : Comparaison des valeurs moyennes ($\pm$ E.Type) des caractéristiques technologiques des lignées 1AL.1RS (bleu), 1BL.1RS (vert), 1BS.1RL (rouge) et non transloquées (gris) expérimentées en trois lieux en 2013.

Les lignées transloquées 1AL.1RS sont dépourvues des quelques oméga-gliadines codées par *Gli-A1* et de quelques sous-unités des gluténines FPM codées par *Glu-A3*. Les variations quantitatives causées par l'élimination de *Gli-A1* et *Glu-A3* ne sont pas aussi importantes que celles résultant de la disparition de *Gli-B1* et *Glu-B3* sur le bras court du Chr 1B. De plus les effets des allèles des sous-unités codées par *Glu-A3* sont généralement moins importants que ceux attribués à *Glu-B3*. La force peut ne pas en être affectée et c'est précisément ce qui est observé sur les valeurs moyennes de ces lignées (247×10^{-4} J pour 1AL.1RS contre 239×10^{-4} J pour NT, Figure 1G). Le volume moyen des pains est cependant sensiblement inférieur (de 8%) à celui des variétés NT (1485 cm^3 contre 1586 cm^3) ce qui diminue

un peu la note totale en panification (223 contre 244), Figure 1L.

b4 - Des lignées peuvent être avantageusement sélectionnées dans certaines descendance

Les comparaisons réalisées ci-dessus ont été poursuivies entre type de translocations au sein des descendance issues de chacune des quatre variétés parentales. Le tableau 6 ci-dessous présente pour 15 caractéristiques technologiques, la comparaison des moyennes entre les valeurs obtenues par chacun des parents et celles des lignées transloquées. Quelques observations peuvent être réalisées :

1 - Si l'on retient le volume du pain et la note finale en panification, les lignées 1BS.1RL sont généralement non significativement différentes du parent récurrent (sauf pour CF03287) en raison de leurs teneurs en protéines plus élevées, comme nous l'avons noté ci-dessus.

2 - Les lignées possédant la translocation 1AL.1RS montrent des aptitudes boulangères spécifiques du parent récurrent. Ainsi les 4 lignées issues de Caphorn ne sont pas significativement différentes de cette variété pour 14 des 15 caractéristiques technologiques. Les trois lignées réalisées avec Skerzzo ne sont pas significativement différentes de ce parent pour 11 des 15 caractéristiques technologiques alors que les 7 lignées 1AL.1RS issues de CF03287 semblent davantage se distinguer de ce parent avec 6 variables dont les valeurs sont significativement supérieures à celles de CF03287 (PMG, Protéines, dureté, viscosité des pentosanes, Hagberg et Ténacité de la pâte). La viscosité des pentosanes est supérieure à celle de la variété parentale pour les lignées 1AL.1RS de Caphorn et de CF03287

3 - Sur les trois notes attribuées en panification, les notes de pâte et de mie sont en général assez proches de celles du parent récurrent. Par contre la note d'aspect du pain semble avoir pénalisé ces descendance. Il est possible que le pain obtenu avec les translocations montre un aspect extérieur qui fut pénalisé car différent de celui couramment révélé.

Tableau 6 : Comparaison des valeurs moyennes de 15 caractéristiques technologiques des lignées transloquées et des variétés parentales expérimentées sur les trois lieux en 2013.

	PMG	PS	Proté	Dureté	Viscosité	Hagberg	W	P	L	P/L
APACHE	49.9 cde	82.4 defg	11.9 abc	48.6 abc	1.67 abc	394 bcde	186 abc	63.3 abc	101.6 cdef	0.64 abc
PREMIO	56.6 gh	81.9 de	11.9 abc	77.9 fgh	1.54 abc	387 abc	202 abc	100.0 cdef	51.6 abc	2.14 defg
CAPHORN	52.5 defg	82.7 efgh	12.3 abc	68.1 cdefg	1.98 efg	389 abcde	235 bcde	104.3 cdef	66.3 abc	1.80 cdef
CAPHORN 1AL1RS	53.4 efg	82.7 efg	12.3 abc	67.0 cdef	2.15 g	414 de	230 abc	118.5 fgh	56.0 abc	2.44 fg
CAPHORN 1BL1RS	55.7 fgh	82.8 efg	14.5 def	47.8 abc	1.62 abc	372 abc	219 abc	66.0 abc	111.0 defg	0.60 abc
CAPHORN 1BS1RL	37.2 abc	71.6 abc	17.1 h	56.4 bcde	1.56 abc	360 abc	354 fg	109.8 efg	98.6 cdef	1.17 abcde
CF03287	51.3 defg	83.0 efg	12.6 abc	64.3 bcde	1.74 bcde	386 abc	296 de	105.6 cdef	80.0 abc	1.54 bcde
CF03287 1AL1RS	57.4 h	82.4 e	13.6 cd	79.5 gh	1.94 e	414 e	271 de	128.7 gh	61.8 abc	2.32 fg
CF03287 1BL1RS	52.0 de	82.3 e	15.0 fgh	59.2 bcde	1.76 cd	392 bc	242 bc	83.0 bc	93.7 cde	0.95 abc
CF03287 1BS1RL	46.7 c	81.5 de	15.5 g	70.4 efg	1.52 abc	401 cde	297 e	89.6 bcde	107.5 defg	1.01 abc
KORELI	51.7 defg	84.5 g	12.3 abc	85.5 g	1.86 de	382.0 abc	240 abc	114.3 efg	58.6 abc	2.23 efg
KORELI 1BL1RS	59.8 g	83.3 gh	14.3 de	68.6 cdef	2.07 fgh	379 abc	212 abc	107.2 efg	58.4 abc	2.17 fg
KORELI 1BS1RL	42.5 bc	78.7 bc	14.6 efg	61.9 bcde	1.63 abc	379 abc	288 de	104.7 defg	79.5 abc	1.40 bcde
SKERZZO	53.9 defg	83.8 h	13.5 bcde	62.3 bcde	2.02 efg	424 e	253 bcde	75.0 abc	125.6 efg	0.65 abc
SKERZZO 1AL1RS	49.9 cde	83.3 fgh	13.7 cd	82.6 g	2.11 fgh	419 e	210 abc	86.0 bcde	92.6 bcde	0.99 abc
SKERZZO 1BL1RS	51.1 de	82.6 efg	13.9 cd	43.9 abc	1.95 e	403 cde	203 abc	66.5 abc	118.0 fg	0.59 abc
SKERZZO 1BS1RL	40.1 abc	80.4 cd	13.0 fgh	57.8 bcde	1.57 abc	379 abc	223 abc	67.9 abc	142.5 g	0.64 abc

	Planification				
	Volume	N. pâte	Aspect	N. mie	N. finale
APACHE	1511 defg	94 f	50 defg	100 abc	244 fgh
PREMIO	1474 cde	89 def	42 cdef	99 abc	230 defg
CAPHORN	1664 fgh	82 bcdef	67 gh	100 abc	249 fgh
CAPHORN 1AL1RS	1554 ef	93 f	49 fg	100 c	242 gh
CAPHORN 1BL1RS	1317 abc	71 abc	12.4 a	98 abc	181 ab
CAPHORN 1BS1RL	1726 h	88 def	47 defg	97 ab	233 efg
CF03287	1712 h	89 def	76 h	99 abc	265 h
CF03287 1AL1RS	1475 cdef	93 f	33 cd	99 bc	226 ef
CF03287 1BL1RS	1363 bc	80 bcd	18 ab	100 c	199 bc
CF03287 1BS1RL	1687 h	89 ef	35 cde	99 abc	224 defg
KORELI	1588 efgh	88 def	55 efgh	100 abc	244 fgh
KORELI 1BL1RS	1370 bcd	90 f	24 abc	97 a	212 cde
KORELI 1BS1RL	1671 gh	93 f	50 efg	98 abc	242 fgh
SKERZZO	1567 efgh	86 bcdef	45 defg	99 abc	230 defg
SKERZZO 1AL1RS	1281 ab	71 abc	12.6 a	97 ab	182 ab
SKERZZO 1BL1RS	1264 a	65 a	18 ab	97 a	181 a
SKERZZO 1BS1RL	1488 e	81 bcde	26 bc	99 c	208 cd

NB : pour une caractéristique donnée, les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (au seuil $\alpha < 0.05$)

La qualité des blés transloqués n'a été analysée que sur les essais produits sans le troisième apport azoté. Les résultats de rendement, en condition conventionnelle, ont montré qu'avec ce troisième apport les lignées transloquées étaient proches du parent récurrent. On peut donc raisonnablement escompter qu'en condition conventionnelle les données de qualité, observées ici en faible intrant, soient améliorées. L'étude réalisée nous montre que la translocation 1BS.1RL a fortement impacté le rendement et surtout la qualité technologique des 12 lignées ne possédant plus le bras long du chromosome 1B porteur du

locus *Glu-B1*. Les translocations sur les bras courts des chromosomes 1B et surtout 1A ont eu beaucoup moins d'incidences négatives sur les caractéristiques de remplissage du grain et de qualité. On note même un avantage associé à la translocation 1AL.1RS sur plusieurs caractéristiques notamment la force et la viscosité relative des pentosanes (les pentosanes solubles sont des fibres hypocholestérolémiantes). Enfin la présence de la translocation sur le bras long du 1A dans les descendances 1AS.1RL, devrait apporter une complémentarité due au glutélines de haut poids moléculaires du seigle. Cette complémentarité ne fut pas mise en évidence dans le cas des lignées 1BS.1RL en raison de la trop grande influence du locus *Glu-B1* sur les propriétés technologiques.

4. Conclusions

L'évaluation des trois translocations 1AL.1RS, 1BL.1RS et 1BS.1RL aboutit aux conclusions suivantes :

- Le chromosome 1R ne porte pas de gènes/QTL de résistance aux rouilles, à la fusariose et à la septoriose,
- Les rendements des lignées transloquées sont variables. Le remplacement du bras 1BL par 1RL dans la translocation 1BS.1RL aboutit à une baisse de rendement significative.

Les deux autres translocations sont plus performantes. D'abord dans le fonds génétique Courtot, 1BL.1RS apporte un gain de productivité et 1AL.1RS ne modifie pas le rendement.

Les translocations ont été introduites dans quatre fonds génétiques récents. Le matériel évalué était en BC1F4. De grosses différences ont été observées entre lignées d'une même descendance. Nous avons conclu qu'un rétrocroisement supplémentaire permettra de mieux préciser l'intérêt des translocations (travail en cours). Néanmoins nous avons montré qu'il y a une interaction significative 'fonds génétique x translocation' et que la translocation 1AL.1RS dans Caphorn est très prometteuse.

- Concernant la valeur technologique et la qualité boulangère, la translocation 1BL.1RS a un effet délétère. Par contre 1AL.1RS apparaît prometteuse, les lignées portant cette translocation étant très proches de leurs parents récurrents.

Le résultat principal que nous mettons en avant est que la translocation 1AL.1RS qui jusqu'à présent a été peu utilisée en France et en Europe présente un intérêt certain. Son évaluation doit être poursuivie, particulièrement par l'étude des lignées BC2 qui seront issues du croisement des lignées transloquées évaluées en BC1 et leurs parents récurrent.

Références bibliographiques

- Amiour N, Jahier J, Tanguy AM, Chiron H, Branlard G.** Effect of 1R(1A), 1R(1B) and 1R(1D) substitution on technological value of bread wheat. *Journal of Cereal Science*, 2002; 35: 149-160.
- Bernard M.** (1976). Etude des caractéristiques cytologiques, morphologiques et agronomiques de six lignées d'addition blé x seigle. *Ann. Amélior. Plantes* 26 : 67-91.
- Carver B.F., Rayburn A.L.** (1994). Comparison of related wheat stocks possessing 1B or 1RS.1BL chromosomes: agronomic performances. *Crop Science* 34: 1505-1510.
- Carver B.F., Rayburn A.L.** (1995). Comparison of related wheat stocks possessing 1B or T1BL.1RS chromosomes: grain and flour quality. *Crop Sci.* 35:1316-1321.
- Dumur J., Branlard G., Tanguy A.M., Dardevet M., Coriton O., Huteau V., Lemoine J., Jahier J.** (2009). Development of isohomoeoallelic lines within the bread wheat cv. Courtot for high molecular weight glutenin subunit: transfer of the Glu-D1 locus to chromosome 1A. *Theor. Appl. Genet.* 119: 471-481.
- Ehdaie B., Whitkus R.W., Waines J.G.** (2003). Root biomass, water-use efficiency, and performance of wheat-rye translocations of chromosomes 1 and 2 in Spring Bread Wheat 'Pavon'. *Crop Science* 43: 710-717.
- Espitia-Rangel E., Baezinger P.S., Shelton D.R., Graybosch R.A., Moreno-Sevilla B., Peterson C.J.** (1999). End-use quality performance and stability of 1A vs. 1AL.1RS genotypes derived from winter wheat 'Nekota'. *Crop Science*: 39: 649-654.
- Fedak G** (1985). Alien species as sources of physiological traits for wheat improvement. *Euphytica* 34:673-680
- Friebe B., Zhang P., Linc G., Gill B.S.** (2005). Robertsonian translocations in wheat arise by centric misdivision of univalents at anaphase I and rejoining of broken centromeres during interkinesis of meiosis II. *Cytogenet. Genome Res.* 109: 293-297.
- Gale MD, Miller TE** (1987). The introduction of alien genetic variation in wheat. In: Lupton FGH (ed) *Wheat breeding: its scientific basis*. Chapman and Hall, London, pp 173-210.
- Gobaa S., Bancel E., Kleijer G., Stamp P., Branlard G.** (2007). Effect of the 1BL.1RS translocation on the wheat endosperm, as revealed by proteomic analysis. *Proteomics* 7: 4349-4357.
- Gobaa S., Bancel E., Branlard G., Kleijer G., Stamp P.** (2008). Proteomic analysis of wheat recombinant inbred lines: variations in prolamin and dough rheology. *J. Cereal Sci*, 2008, 47, 610-619.
- Graybosch R.A., Peterson C.J., Worrall D., Shelton D., Lukaszewski A.** (1991). Comparative quality characteristics of 1BL/1RS and 1AL/1RS wheat-rye translocation lines. *Agro. Abstr., American Society of Agronomy, Madiso, Wisconsin*. P.96.
- Grosjean F., Saulnier L., Maupetit P., Beaux M.F., Flatres M.C., Magnin M., La Pavée P., Victoire C.,** (1999). Variability of wheat and other cereal water extract viscosity. 1- Improvements of measuring viscosity. *Journal of the science of Food and Agriculture*. 79: 116-122.
- Jahier J., Tanguy A.M.** (1992). Observation des chromosomes. In *Techniques de cytogénétique végétale*, Jahier J. (Ed.), 7-9 et 46-47.
- Jiang J., Friebe B., Gill B.S** (1993). Recent advances in alien gene transfer in wheat. *Euphytica* 73: 199-212.
- Lee J.H., Graybosch R.A., Peterson C.J.** (1995). Quality and biochemical effects of a 1BL/1RS wheat-rye translocation in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 90: 105-112.
- Lukaszewski A.J.** (1990). Frequency of 1RS.1AL and 1RS.1BL translocations in United States wheats. *Crop Science* 30: 1151-1153.
- McKendry A.L., Tague D.N., Finney P.L., Miskin K.E.** (1996). Effect of 1BL.1RS on milling and baking quality of soft red winter wheat. *Crop Science* 36: 848-851.
- Monneveux P., Reynolds M.P., Zaharieva M., Mujeeb-Kazi A.** (2003). Effect of T1BL.1RS chromosome translocation on bread wheat grain yield and physiological related traits in a warm environment. *Cereal Res. Com.* 31: 371-378.
- Moreno-Sevilla B., Baezinger P.S., Peterson C.J., Graybosch R.A., McVey D.V.** (1995a). The 1BL/1RS translocation: agronomic performance of F3-derived lines from a winter wheat cross. *Crop Science* 35: 1051-1055.
- Moreno-Sevilla B., Baezinger P.S., Shelton D.R., Graybosch R.A., Peterson C.J.,** (1995b). Agronomic performance and end-use quality of 1B vs. 1BL/1RS genotypes derived from winter wheat 'Rawhide'. *Crop Science* 35: 1607-1612.
- Saulnier, L., Sado, P.-E., Branlard, G., Charmet, G., Guillon, F.,** (2007). Wheat arabinoxylans: Exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. *J Cereal Sci, The Contribution of Cereals to a Healthy Diet*, 46, 261-281.
- Sebesta E.E., Wood E.A., Porter D.R., Webster J.A., Smith E.L.** (1995). Registration of Amigo wheat germplasm resistant to greenbug. *Crop Science* 35: 293.
- Schneider A., Molnar I., Molnar-Lang M** (2008). Utilisation of Aegilops (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica* 163: 1-19.
- Sharma HC, Gill BS** (1983). Current status of wide hybridization in wheat. *Euphytica* 32:17-31
- Singh N.K., Shepherd K.W., Cornish G.B.** (1991). A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin *Journal of Cereal Science* 14, 203-208.
- Villareal R.L., del Toro E., Rajaram S., Mujeeb-Kazi A.** (1996). The effect of chromosome 1AL/1RS translocation on agronomic performance of 85 F2-derived F6 lines from three *Triticum aestivum* L. crosses. *Euphytica* 89: 363-369.
- Villareal R.L., Banuelos O., Mujeeb-Kazi A., Rajaram S.** (1998). Agronomic performance of chromosomes 1B and T1BL.1RS near-isolines in the spring wheat Seri M82. *Euphytica* 103:195-202.
- Zeller F.J.** (1973). 1B/1R wheat-rye substitutions and translocations. P. 209-221. In *Sears E.R and Sears L.M.S. (ed.) Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp., Eds : Columbia, Missouri*, 6-11 August 1973. *Missouri Agric. Exp. Stn., Columbia*.
- Zeller F.J., Hsam S.L.K.** (1984). Broadening the genetic variability of cultivated wheat by utilizing rye chromatin. P. 161-173. In *S. Sakamoto (ed.), Proc. 6th Int. Wheat Genet. Symp., Kyoto, Japan*, 28 nov.-3 Dec. 1983. *Plant Germplasm Int., Kyoto University, Kyoto, Japan*

Validation de marqueurs liés à des gènes d'intérêt en vue de l'établissement d'une base de données pour la sélection assistée chez le blé tendre.

Marion RANOUX¹, Claire NEDELLEC², Emmanuelle CARIOU-PHAM³, Robert BOSSY², Claude de VALLAVIEILLE- POPE⁴, Marc LECONTE⁴, Dialekti VALSAMOU², Delphine HOURCADE³, Laurent GUERREIRO^{3,5}, Pierre SOURDILLE^{1*}

1 – INRA – UMR 1095 GDEC (Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales) 5, Chemin de Beaulieu, 63039 Clermont-Ferrand cedex

2 – INRA – UR 1077 MIG (Mathématique, Informatique et Génome), Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas

3 – Arvalis Institut du Végétal 3, rue Joseph et Marie Hackin, 75116 Paris

4 – INRA – UR BIOGER-CPP (Biologie et Gestion des Risques en Agriculture - Champignons Pathogènes des Plantes), BP01, 78850 Thiverval Grignon

5 – Adresse actuelle : RAGT - Rue Emile Singla, Site de Bourran – BP 3336, 12033 Rodez Cedex 09

* **Coordinateur** : Pierre SOURDILLE, pierre.sourdille@clermont.inra.fr, Tél. : 04 73 62 44 37

1. Introduction

L'amélioration génétique du blé tendre (*Triticum aestivum* L.) est devenue une préoccupation majeure afin de pourvoir à la consommation mondiale qui ne cesse d'augmenter (environ 2% par an). Cependant, si les rendements ont régulièrement progressé ces dernières années, ils commencent à stagner alors qu'*a contrario*, ceux du maïs continuent de progresser avec régularité.

Si cette différence entre blé et maïs s'explique en grande partie par des conditions climatiques plus favorables à la culture du maïs (en particulier la hausse des températures ; Brisson *et al.* 2010), elle est due également à des changements radicaux de méthodes de sélection chez cette espèce. En particulier, lors des 20 dernières années, des efforts colossaux ont été entrepris au niveau des études génétiques et génomiques des caractères d'intérêt agronomique conduisant à l'identification de nombreuses liaisons entre marqueurs moléculaires et gènes impliqués dans l'expression de caractères d'intérêt aboutissant parfois au clonage de ceux-ci. Récemment, l'obtention de la séquence complète du génome du maïs (Schnable *et al.* 2009) a même contribué à amplifier le phénomène en augmentant à la fois le nombre de marqueurs disponibles (plusieurs dizaines de milliers de SNP disponibles) ainsi que le nombre de gènes clonés.

Chez le blé tendre, les efforts portés sur la génomique ont été beaucoup plus limités et tardifs en particulier du fait de la complexité du génome (polyploïde ($2n=6x=42$), grande taille (17 Gb) et fort pourcentage en séquences répétées (85%) ; Feuillet *et al.* 2012). Cependant, le retard a été partiellement rattrapé lors des 10 dernières années et même si la séquence complète du génome n'est pas encore achevée, des travaux dans ce sens sont largement initiés en particulier au niveau du chromosome 3B qui vient d'être entièrement séquencé et annoté (Choulet *et al.* 2014) et des différents bras de chromosomes (IWGSC 2014). Les travaux visant à identifier des liaisons entre marqueurs et gènes d'intérêt ont été nombreux et la bibliographie à ce sujet est particulièrement riche (pour revue voir Neumann *et al.* 2011). Cependant, il existe peu de ressources regroupant toute cette information sous forme structurée (sites internet⁽¹⁾ MASWheat et CerealDB) et celle-ci est très dispersée dans de nombreuses revues rendant son exploitation pour la sélection particulièrement laborieuse. De plus, les résultats décrits dans ces articles sont parfois difficiles à reproduire ou n'ont été observés que pour des cultivars (voire des espèces) éloignés du matériel élite utilisé couramment dans

les schémas de sélection européens. Enfin, la littérature sur le sujet des marqueurs liés à des gènes d'intérêt chez le blé est extrêmement vaste (plusieurs milliers d'articles) et extraire l'information pertinente est un travail laborieux et de longue haleine qui mérite d'être automatisé au moins partiellement.

L'objectif du projet était donc d'élaborer une base de données interrogeable aisément et répertoriant l'ensemble des informations disponibles dans la bibliographie décrivant l'existence d'une liaison entre un (ou plusieurs) marqueur(s) et des gènes d'intérêt agronomique chez le blé tendre (résistances aux maladies, gènes de développement, gènes impliqués dans la qualité boulangère, résistance aux stress abiotiques, etc.). Pour ce faire, nous avons développé une procédure automatisée d'analyse bibliographique. Les marqueurs ont ensuite été expertisés, c'est-à-dire que les conditions d'utilisation ont été mises au point, et validées sur du matériel de référence. Les marqueurs donnant les meilleurs résultats et pouvant être exploités dans des schémas de sélection ont été testés sur un panel élite étendu (335 variétés commerciales actuelles et 47 en cours de sélection) afin que leur pertinence puisse être mesurée. Finalement, une collection d'une soixantaine de variétés a été phénotypée pour les gènes de résistance aux rouilles jaune (*Yr*) et brune (*Lr*) ou d'autres maladies (septoriose, fusariose, oïdium). Une analyse d'association avec les marqueurs supposés liés à différents gènes impliqués dans les résistances a ainsi permis la validation de certains d'entre eux.

(1) - Toutes les adresses URL des sites sont données dans la section « Références ».

2. Matériel et méthodes

► Matériel végétal

Pour le test des marqueurs moléculaires, le matériel végétal analysé est constitué de deux panels : (1) le panel de référence contient différentes lignées connues comme portant les allèles intéressants de gènes d'intérêt, d'après la bibliographie. Cinq graines de chaque lignée ont été collectées auprès du centre de ressources biologiques (CRB) de Clermont-Ferrand ou auprès des auteurs des publications ; (2) le panel élite uniquement génotypé avec les marqueurs moléculaires validés, est constitué de 335 variétés (Annexe 1) actuellement cultivées et de 47 lignées en cours de sélection.

Dans les deux cas, l'ADN est extrait à partir d'un mélange de feuilles issues de trois plantes selon un protocole utilisant le bisulfite de sodium en vigueur au laboratoire.

► Analyse automatisée de la littérature

La méthode automatique d'extraction d'information utilise une analyse profonde du texte et l'apprentissage automatique de la chaîne AlvisNLP (Nedellec *et al.* 2009). L'apprentissage automatique supervisé s'applique à des exemples annotés par 13 experts du domaine, principalement des sélectionneurs de semences et les deux auteurs de l'article, biologistes du GDEC. Le corpus annoté est composé de 72 articles sélectionnés pour leur intérêt et leur représentativité et principalement publiés par le journal *Theoretical and Applied Genetics* (Springer). Ce journal a été choisi car il mentionne un grand nombre de marqueurs et il est accessible en ligne. L'importance de la source d'information (articles) est essentielle et par exemple, l'éditeur Springer permet un tri efficace des articles. Chaque document est annoté deux fois, en double aveugle. Les annotateurs utilisent l'éditeur d'annotation AlvisAE auquel ils ont été formés (Papazian *et al.* 2012). Le document de consignes fourni aux annotateurs décrit le modèle, définit les entités et relations et donne de nombreux exemples (Nédellec *et al.* 2013).

► Développement et validation des marqueurs

Certains sites internet proposent déjà quelques marqueurs utilisables en sélection (46 dans MASWheat). Ceux-ci ont été validés en priorité car ils sont déjà régulièrement exploités et ont servi à évaluer l'efficacité des méthodes d'extraction d'information. Les recherches bibliographiques ont été orientées autour de quatre grandes thématiques : (1) résistances aux stress biotiques (maladies (rouilles, oïdium, septoriose, fusariose...) et ravageurs (nématodes, cécidomyie, mouche de Hess...)) ; (2) résistances aux stress abiotiques (sécheresse, température, salinité, verse...) ; (3) développement des plantes (hauteur, photopériode, précocité, vernalisation, floraison, tallage, caractéristiques de l'épi...) ; (4) qualité boulangère (rhéologie de la pâte, dureté du grain, taux de protéines, qualité de l'amidon...). Des gènes peuvent être associés à chaque thématique, et des données de liaison avec des marqueurs moléculaires existent pour certains d'entre eux. L'information initiale sur ces gènes a été enrichie en particulier avec le marqueur le plus proche, ses conditions de révélation et une liste de variétés de référence possédant les allèles favorables. Les marqueurs facilement automatisables (SSR, SNP, STS) ont été sélectionnés en priorité. Pour chaque marqueur lié à un gène d'intérêt, les amorces permettant son amplification ont été récupérées de même que le protocole permettant sa révélation. Dans le cas où il s'agissait d'un marqueur révélé par hybridation (RFLP, EST), les séquences correspondantes ont été recherchées dans les bases de données afin de dériver des amorces utilisables en PCR. Ces amorces ont été utilisées pour amplifier des fragments chez les lignées de références et des lignées témoins (Chinese Spring, Renan, Courtot). Les produits d'amplification ont été séquencés afin d'identifier des mutations (SNP) permettant un génotypage des lignées de référence. Lorsque les séquences n'étaient pas disponibles ou si le marqueur était localisé relativement loin du gène (>10cM), des marqueurs plus proches automatisables ont été recherchés dans les bases de données internationales de marqueurs (GrainGenes). Dans tous les cas, les marqueurs ont été testés dans les conditions initiales sur le panel de référence dérivé de la bibliographie. Un marqueur a été considéré comme validé lorsque les profils observés correspondaient à ceux décrits dans

la littérature. Dans le cas où les marqueurs utilisés n'étaient pas ceux issus de la bibliographie, un marqueur a été considéré comme validé s'il présente un profil permettant de différencier des lignées possédant le gène considéré, de celles ne l'ayant pas. Au final, la base de données a été incrémentée des données de validation : amorces, conditions de révélation, variétés de référence, profils (allèles).

► Phénotypage des résistances

Des données de phénotypage pour les différents caractères ont été collectées afin de confirmer la pertinence des marqueurs validés précédemment. Dans un premier temps, chaque partenaire a évalué une collection de 30 variétés (15 variétés commerciales proposées par ARVALIS extraites du panel élite (Annexe 1) et 15 issues du matériel propre à chaque sélectionneur). De façon à optimiser et maximiser le nombre de caractères évalués, ceux-ci ont été répartis au début du projet de telle manière qu'ils soient relevés chez au minimum deux partenaires différents pour la robustesse des données.

Deux types d'essais ont été conduits : des essais en conditions contrôlées sur la rouille jaune sur une soixantaine de lignées au stade plantule en collaboration avec l'INRA de Grignon et des essais en plein champs sur la campagne 2012-2013.

Pour les essais en conditions contrôlées sur la rouille jaune, les graines d'une soixantaine de variétés ont été fournies à l'INRA de Grignon par les sélectionneurs partenaires du projet. Les tests ont été réalisés à l'aide de 12 races de *Puccinia striiformis* permettant de révéler la présence de 10 gènes *Yr* s'exprimant au stade plantule. Le postulat sur les gènes *Yr* présents dans les différentes variétés est présenté dans l'Annexe 2. Dans l'Annexe 3, nous avons rajouté les gènes de résistance *Yr* dont l'absence ne peut être certifiée du fait de l'absence en France d'isolats virulents de *P. striiformis* correspondants. Certaines variétés sont résistantes à toutes les races et il n'est pas possible de connaître les gènes impliqués. Beaucoup de variétés possèdent un gène majeur, mais leur niveau de résistance au stade adulte suggère qu'elles possèdent d'autres gènes ne s'exprimant que lors de stades tardifs sans qu'il soit possible de déterminer lequel au vu des résultats des tests.

Pour les essais en plein champ, les tests ont été réalisés à l'aide d'inoculum de rouilles jaune et brune et de septoriose fournis par INRA de Grignon. Pour la fusariose et la mosaïque, la contamination a été conduite naturellement respectivement sur des précédents favorables (maïs) ou dans des parcelles connues pour être infestées.

Les semences des variétés à planter ont été collectées puis redistribuées par Arvalis auprès des sélectionneurs partenaires du projet.

► Etude d'association

L'ensemble des données de génotypage et de phénotypage sur tous les critères suivis au cours du projet et obtenus par les partenaires a finalement été centralisé afin de mener des études d'association. L'analyse d'association n'a pas été faite sur tout le génome, mais seulement sur les marqueurs validés afin d'évaluer la force de la liaison entre les marqueurs et les gènes considérés ainsi que la fréquence des gènes d'intérêt au sein du matériel élite français et européen.

L'analyse d'association a été conduite en croisant simplement les données de phénotypage avec celles de génotypage et en analysant la différence des moyennes au marqueur. Des *box plots* par marqueur et par phénotype ont été réalisés systématiquement.

3. Résultats et discussion

► Analyse automatisée

Le moteur de recherche sémantique AlvisIR a été développé sur une base bibliographique pertinente de 3170 articles. Il utilise comme index de recherche les résultats de prédiction de gènes, de marqueurs, de méthodes et de variétés à partir de nomenclatures définies initialement. Les phénotypes et caractères sont prédits en utilisant l'ontologie *WheatPhenotype* de 624 concepts et synonymes, développée pour le projet. Pour l'entraînement des modules d'apprentissage et afin d'améliorer les prédictions, nous avons utilisé comme exemples les annotations manuelles des articles. Elles contiennent 1551 relations binaires et ternaires entre 5848 entités comme par exemple des relations marqueur/allèle, allèle/taille, variété/gène... Certaines relations sont moins représentées comme par exemple la relation variété/allèle dans la mesure où ce genre d'information est rare dans les articles et figure en général dans les matériels supplémentaires présentés sous forme de tableaux difficiles à exploiter. En ce qui concerne la reconnaissance automatique des entités, deux cas sont possibles : (1) des entités « figées » (gènes, allèles...) qui varient marginalement. Ce cas est le plus favorable et seuls subsistent quelques problèmes d'ambiguïté traités par une analyse du contexte (par exemple des noms de variétés proches ou identiques à d'autres noms usuels comme Brigadier, Oratorio, Racine...). La méthode développée obtient un taux élevé de réussite de 60% selon la métrique de F-mesure utilisée en extraction d'information ; (2) des entités terminologiques (caractères par exemple) qui montrent une très grande diversité et constituent un cinquième des entités. L'essentiel de l'activité du groupe est dirigé vers cette partie et une première version d'une méthode en cours de développement (ToMap (Ratkovic *et al.* 2011)) a été appliquée

sur un corpus spécifique avec une précision encourageante de 90%.

► Validation des marqueurs

Initialement, une liste de 107 gènes d'intérêt couvrant quatre thématiques (résistances aux stress biotiques et abiotiques, développement de la plante et qualité boulangère) avait été établie : 10 pour le développement de la plante, 80 pour les stress biotiques, 5 pour les stress abiotiques et 12 pour la qualité boulangère. Pour ces 107 gènes, une information de liaison avec des marqueurs était disponible sur le site internet MASWheat pour 70 d'entre eux. Pour les autres une recherche bibliographique a permis d'identifier les marqueurs les plus proches. Pour chaque gène, entre un et six marqueurs sont décrits dans la littérature ou sur le site. Dix-neuf gènes supplémentaires ont été relevés dans la littérature conduisant à un total de 126 gènes évalués. Pour ces 126 gènes, 298 marqueurs ont été testés sur le panel de référence de 16 lignées et 235 ont donné un résultat satisfaisant (qualité d'amplification optimale) ce qui représente au moins un marqueur efficace pour 75 des 126 gènes. Par exemple, le gène *VRN-A1* possède un profil complexe avec 10 allèles (cinq allèles hiver et cinq printemps) distribués sur toute la longueur du gène. Il y a cinq allèles différents dans son promoteur (3 allèles hiver et deux allèles printemps), trois allèles dans l'intron 1 (1 hiver et deux printemps) et deux allèles dans l'exon 7 (1 hiver et 1 printemps). Au total, sept marqueurs SNP ont pu être validés pour permettre d'identifier les différents allèles printemps ou hiver présents dans les variétés testées.

A titre d'exemple, le marqueur 86 (Figure 1) permet de distinguer efficacement l'un des deux allèles printemps du promoteur. En revanche, aucun marqueur pertinent n'a pu être trouvé pour les 51 autres gènes.

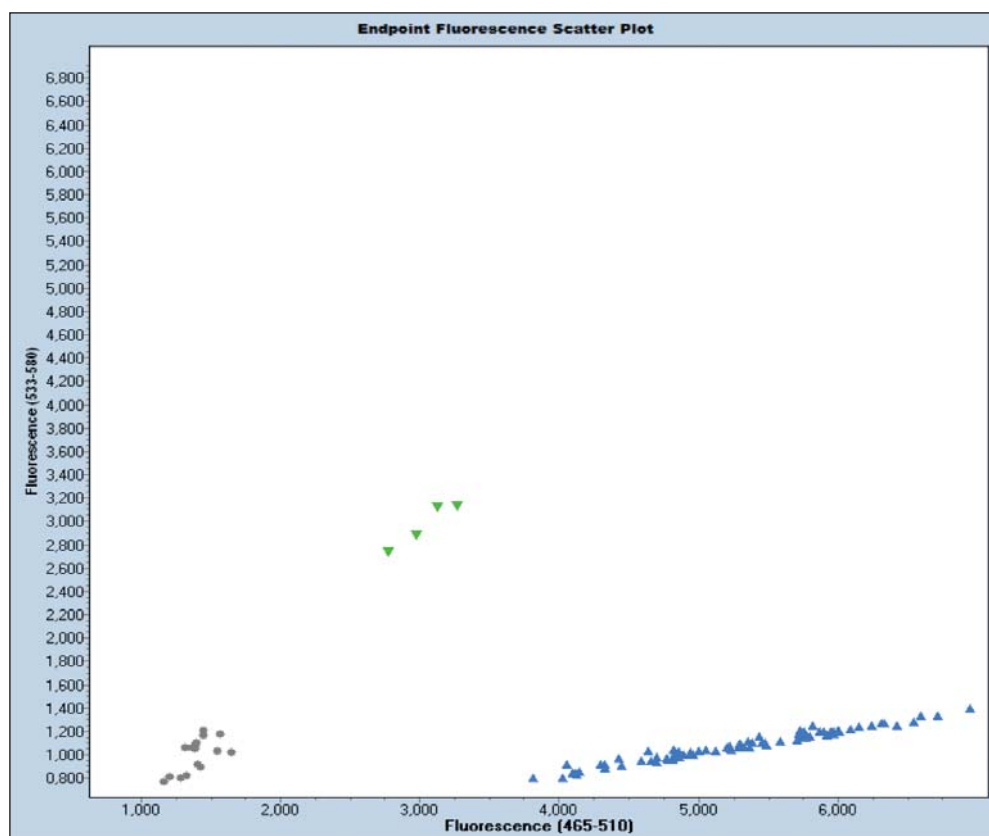


Figure 1 : Exemple de l'évaluation du marqueur KASPar 86 lié à un allèle printemps de l'intron 1 du gène de vernalisation *VRN-A1* sur un panel de lignées témoins. Les triangles verts figurent les lignées avec l'allèle printemps, les bleus l'allèle hiver et en gris les témoins négatifs (eau).

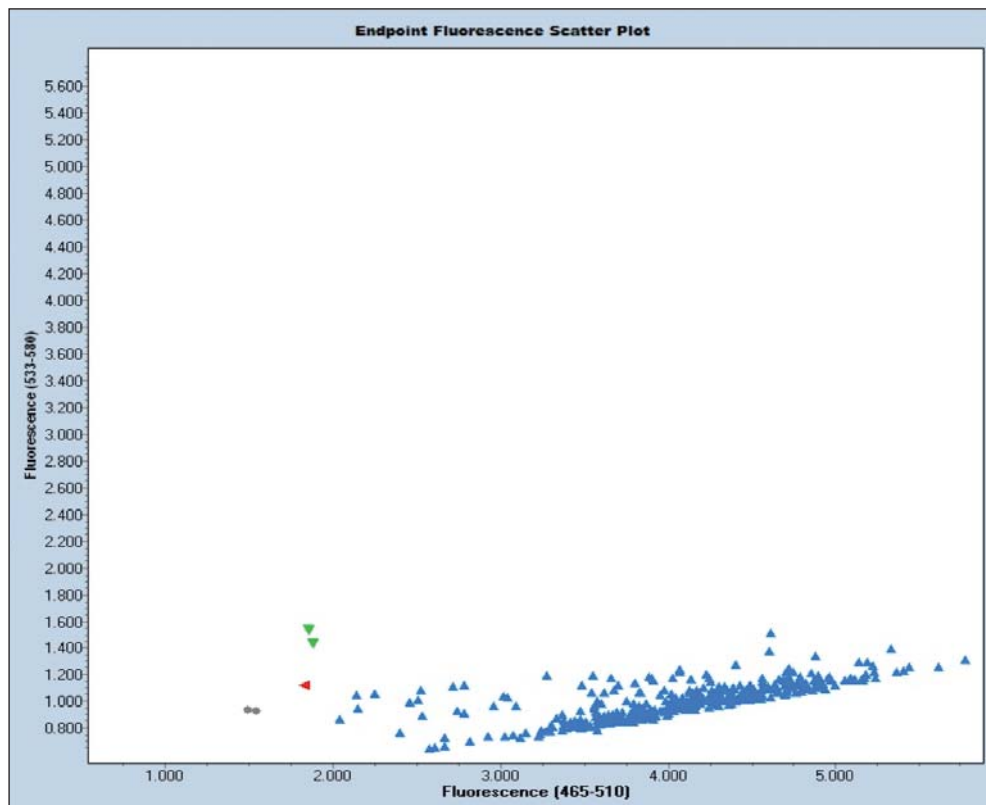


Figure 2 : Exemple de l'évaluation du marqueur KASPar 86 lié à un allèle printemps de l'intron 1 du gène de vernalisation VRN-A1 sur un panel de 382 lignées élités cultivées ou en cours de sélection. Les triangles verts figurent les lignées avec l'allèle printemps, les bleus l'allèle hiver, en rouge une lignée avec un allèle original inconnu et en gris les témoins négatifs (eau).

Pour 125 de ces 235 marqueurs, des essais haut-débit (KASPar) ont été développés ce qui représente un total de 75 gènes. Pour tous ceux-ci, le ou les marqueurs les plus pertinents ont été choisis et 64 d'entre eux ont été testés sur le panel élit (382 variétés élités cultivées actuellement ou en cours de sélection). A titre d'exemple, la Figure 2 montre le résultat du test avec le marqueur KASPar 86 précédent lié au gène *VRN-A1*. Le résultat montre que seulement deux variétés possèdent cet allèle dans le panel testé et seulement une possède un allèle original inconnu. Pour ce gène *VRN-A1*, l'analyse complète des sept marqueurs KASPar disponibles permet de conclure que le panel est composé de 368 lignées de type hiver et sept lignées de type printemps. Il n'est pas possible de conclure pour sept lignées qui possèdent des allèles originaux non encore classés.

► Analyse d'association

Afin d'estimer la corrélation entre la présence d'allèles particuliers aux locus marqueurs et d'allèles favorables pour les gènes d'intérêt suivis, des essais sur différentes maladies (rouilles brune et jaune, septoriose, oïdium, fusariose) ont été réalisés en 2013. Ceux-ci sont relativement hétérogènes dans la mesure où des effets peuvent être masqués par l'attaque d'autres pathogènes ou par des infestations par des souches naturelles. Soixante marqueurs validés sur les témoins et liés à différents gènes de résistance ont été testés sur un panel de 57 variétés commerciales phénotypées aux stades plantule et adulte. La faible taille de ce panel fait qu'une majorité (49/60) des marqueurs est monomorphe sur les variétés. Néanmoins, certains résultats sont intéressants. Par exemple, les marqueurs SCOAB, WMC44 et WMC170 sont associés à une résistance accrue aux rouilles brune et jaune. Ainsi, pour le microsatellite WMC170, 18 des 19 variétés pour lesquelles la présence du gène de résistance Yr32 est suspectée, possèdent l'allèle à 208 paires de bases à ce locus ce qui confirme la liaison de ce marqueur avec ce gène. De même, pour le gène de résistance

à la fusariose *FHB3* (Figure 3), l'allèle 3 du microsatellite GWM639 est systématiquement associé à une résistance améliorée et 10 des 57 variétés testées possèdent l'allèle favorable au locus.

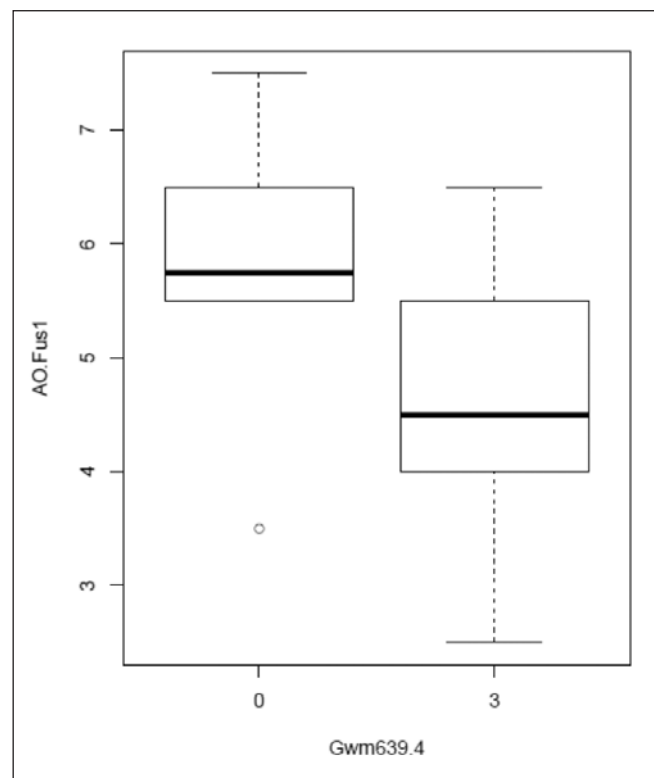


Figure 3 : Exemple de l'évaluation du marqueur microsatellite GWM639 lié à un allèle de résistance à la fusariose au gène *FHB3*. Dans ce box plot, les variétés qui ont l'allèle 3 montrent une résistance au pathogène plus élevée.

4. Conclusions

L'analyse automatisée d'articles va devenir un outil incontournable dans la mesure où le nombre de revues s'est multiplié ces dernières années et que les outils de génomique ont gagné en puissance de telle sorte qu'il est devenu aisé de générer de grandes masses de données de génotypage sur des collections ou des populations en ségrégation à un moindre coût. De ce point de vue, les outils développés dans le cadre de ce projet ont montré leur efficacité et leurs limites. Les résultats peuvent encore être améliorés en particulier pour le rappel des caractères et phénotypes qui est un problème difficile à résoudre. Pour cela, l'idéal serait de revoir et d'améliorer les annotations manuelles réalisées dans ~280 zones de texte de 55 articles. Il sera sûrement nécessaire de compléter et augmenter les annotations déjà faites de façon à perfectionner encore les détections automatiques. En termes d'amélioration de l'outil d'analyse, il reste à compléter les résultats d'annotation

et les résultats expérimentaux présents dans la base de données WheatPhenotypeDB par la description des protocoles pour qu'ils puissent être interprétés efficacement. Celle-ci est d'ores et déjà accessible aux sélectionneurs partenaires. Elle contient une information relative à plus de 120 gènes d'intérêt avec une information validée et pertinente pour 89 gènes. Les différents projets de développement de puces de SNP (Wang *et al.* 2014 ; CerealDB ; BreedWheat (E. Paux communication personnelle)) vont contribuer à augmenter encore le nombre de liaisons. En particulier, cela devrait permettre d'étoffer le panel des lignées phénotypées et confirmer certains résultats que nous n'avons pas pu valider dans la mesure où notre panel de 57 variétés était trop faible et toutes les lignées étaient monomorphes pour une majorité des marqueurs que nous avons évalués. Nous pourrions ainsi espérer identifier des allèles causaux aux locus d'intérêt. Cette base devra donc poursuivre une veille active afin d'enrichir régulièrement son contenu et rester un outil attractif et pertinent pour les sélectionneurs.

Références bibliographiques

Brisson N., Gate P., Gouache D., Charmet G., Oury F.X., Huard F. (2010). Why are wheat yields stagnating in Europe? A comprehensive data analysis for France. *Field Crops Research* 119: 201-212

CerealDB : URL

<http://www.cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/CerealsDB/indexN EW.php>

CRB de Clermont-Ferrand : URL

<https://www6.clermont.inra.fr/umr1095/Equipes/Infrastructures-experimentales/Centre-de-Ressources-Biologiques>

Choulet F, Alberti A, Theil S, Glover N, Barbe V et al. (2014). Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. *Science* 345 DOI: 10.1126/science.1249721

Feuillet C., Stein N., Rossini L., Praud S., Mayer K., Schulman A., Eversole K., Appels R. (2009). Integrating cereal genomics to support innovation in the Triticeae. *Functional & Integrative Genomics* 12: 573-583

GrainGenes : URL <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>

IWGSC (The International Wheat Genome Sequencing Consortium) (2014). A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science* 345: DOI: 10.1126/science.1251788

MASWheat : URL <http://maswheat.ucdavis.edu/>

Nédellec C., Nazarenko A., Bossy R. (2009). "Information Extraction" in *Ontology Handbook*, S. Staab, R. Studer (eds.), Springer Verlag, Berlin (DEU): Springer Science - Business Media Deutschland GmbH (International Handbooks on Information Systems), 2nd edition revised 663-686

Nédellec C., Bossy R., Ranoux M., Valsamou D., Sourdille P. (2013). Consignes d'annotation d'articles sur la sélection du blé par marqueurs génétiques. *Projet FSOV Sam Blé*. avril 2013.

Neumann K., Kobiljski B., Denčić S., Varshney R.K., Börner A. (2011). Genome-wide association mapping: a case study in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Breeding* 27: 37-58

Papazian F., Bossy R., Nédellec C. (2012). AlvisAE: a collaborative Web text annotation editor for knowledge acquisition. *Proc 6th Linguistic Annotation Workshop (The LAW VI)* 149-52.

Ratkovic Z., Golik W., Warnier P. (2012). Event extraction of bacteria biotopes: a knowledge-intensive NLP-based approach". *BMC Bioinformatics* 2012, 13(Suppl 11):S8, 26.

Schnable P.S., Ware D., Fulton R.S., Stein J.C., Wei F.S et al. (2009). The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326: DOI: 10.1126/science.1178534

Wang S., Wong D., Forrest K., Allen A., Chao S. et al. (2014). Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90,000 single nucleotide polymorphism array. *Plant Biotechnol J.* 12: 787-796

WheatPhenotypeDB : URL

<http://genome.jouy.inra.fr/~rbossy/cgi-bin/FSOV/SAM.cgi>

Annexe 1 : Liste du panel élite (335 variétés).

ACCOR	ACCROC	ACIENDA	ACIENTO	ACOUSTIC	ADAGIO	ADEQUAT
ADHOC	AEROBIC	AFRICA	AGRESTIS	AGUILA	ALCAZAR	ALCEDO
ALCHEMY	ALDRIC	ALEZAN	ALFA	ALIGATOR	ALIGRE	ALIXAN
ALIZEO	ALLEZ-Y	ALLISTER	ALTAMIRA	ALTEO	ALTIGO	ALTRIA
AMADOR	AMBELLO	AMBITION	AMERIGO	AMUNDSEN	ANDALOU	ANDINO
ANTONIUS	APACHE	APRILIO	ARACK	ARAMIS	ARDELOR	AREZZO
ARISTOTE	ARKEOS	ARLEQUIN	AS-DE-COEUR	ASANO	ASTRAKAN	ASTUCE
ATHLON	ATTITUDE	ATTLASS	AUBUSSON	AUDI	AUTAN	AVALON
AVANTAGE	AXIMACK	AZIMUT	AZTEC	AZZERTI	AZZURO	BAGATELLE 7
BAGOU	BAGUETTE 10	BAGUETTE 11	BALANCE	BALTHAZAR	BALTIMOR	BANDERA
BAROK	BAROUEUR	BASTIDE	BATTANT	BERMUDE	BISCAY	BOBINO
BOISSEAU	BOKARO	BOLOGNA	BOREGAR	BOSTON	BOTTICELLI	BRANDO
BRIGADIER	BROMPTON	BUENNO	CADENZA	CALISTO	CAMP REMY	CAMPARI
CAMPERO	CAPHORN	CAPNOR	CAPO	CARNAVAL	CARRE	CATALAN
CELESTIN	CENTENAIRE	CEZANNE	CHARGER	CHEVALIER	CHINESE-SPRING	CIGALO
CLAIRE	COMODOR	CONTREFOR	CORDIALE	CORVUS	COURTOT	CRACKLIN
CROISADE	CROUSTY	DENMAN	DIALOG	DIEGO	DINOSOR	DUXFORD
EINSTEIN	EMERALD	ENESCO	ENORM	EPHOROS	EPIDOC	EQUILIBRE
ESPERIA	ESTICA	ETECHO	EUCLIDE	EVEIL	EXELCIOR	EXOTIC
EXPERT	EXSEPT	FARANDOLE	FARINELLI	FIorenZO	FIORETTO	FLAIR
FLAMENKO	FLUOR	FOLIO	FOLKLOR	FORBAN	FOURMI	FRELON
GALACTIC	GALAXIE	GALOPAIN	GANDHI	GARANTUS	GARCIA	GATSBY
GAUGAIN	GLASGOW	GONCOURT	GRAINDOR	GRAVITAS	GRETHEL	GRISBY
GUADALUPE	GULLIVER	HAMAC	HATTRICK	HAUSSMANN	HEKTO	HEREWARD
HERMANN	HOURLA	HUMBER	HYBERY	HYPERION	HYSORE	HYSUN
HYXO	ILLICO	INCISIF	INGENIO	INOUI	INSPIRATION	INSTINCT
INTACT	INTENSE	INTERET	IRIDIUM	ISENGRAIN	ISIDOR	ISTABRAQ
JOSSELIN	JULIUS	KALANGO	KALYSTAR	KARILLON	KORELI	KUMBERRI
LANCELOT	LEAR	LIMES	LORD	MALACCA	MANAGER	MARCELIN
MATTIS	MAXWELL	MAXYL	MEISTER	MELKIOR	MENDEL	MENESTREL
MERCATO	MESSAGE	MESSIDOR	METEOR	MINOTOR	MIROIR	MULAN
MUSIK	NIRVANA	NOGAL	NOGENT	NUAGE	NUCLEO	OAKLEY
OCTET	CEIPE	OPATA	ORATORIO	ORDEAL	ORNICAR	ORQUAL
ORVANTIS	OXEBO	PACTOLE	PAINDOR	PAJERO	PAKITO	PALADAIN
PALEDOR	PARADOR	PAROLI	PEPIDOR	PERFECTOR	PERICLES	PHARE
PIERROT	PIKO	PIRENEO	PLAYER	PLETHORE	POTENT	PREFERENCE
PREMIO	PRESTIDOR	PREVERT	PROLOG	PULSAR	PYTAGOR	QUALITY
QUEBON	RACINE	RAGLAN	RAISON	RAZZANO	RECITAL	RENAN
RESSOR	RIALTO	RICHEPAIN	RITMO	ROBIGUS	RODRIGO	ROSARIO
ROYSSAC	RUNAL	RUSTIC	SAINT-EX	SAMURAI	SANKARA	SANTIAGO
SATURNUS	SAVANNAH	SCENARIO	SCIPION	SCOR	SCORPION-25	SEBASTO
SELEKT	SEQUOIA	SEYRAC	SHANGO	SIRTAKI	SOGOOD	SOISSONS
SOKAL	SOKRATES	SOLEHIO	SOLLARIO	SOLSTICE	SOLUTION	SOPHYTRA
SORRIAL	SPARK	SPONSOR	STIGG	SUMO	SWEET	SWINGGY
TABASCO	TAMARO	TAPIDOR	TERRON	TIAGO	TILBURI	TIMBER
TIMING	TOISONDOR	TOREADOR	TORKA	TRAPEZ	TREMIE	TROCADERO
TULIP	TUXEDO	USKI	VALODOR	VERLAINE	VICTO	VISCOUNT
VIVANT	VOLONTAIRE	W7984	WARRIOR			

Annexe 2 : Liste des variétés utilisées pour l'analyse en conditions contrôlées des gènes de résistance à la rouille jaune. Année : année de diffusion de la variété. Hypothèse gènes (Yr) : postulat sur les gènes de résistance au stade plantule déduits d'après les types d'infection observés après inoculation par 12 pathotypes de *Puccinia striiformis*. Lorsque la variété est résistante à tous les pathotypes, elle est indiquée Résistant. Marqueur : marqueur trouvé le plus proche des gènes considérés (ordre des marqueurs conservé avec l'ordre des gènes de la colonne précédente) d'après la littérature. ? : pas de marqueur identifié comme lié au(x) gène(s).

Variété	Année	Hypothèse gènes (Yr)	Marqueur	Variété	Année	Hypothèse gènes (Yr)	Marqueur
ACCROC	10	7	GWM526	FARINELLI	11	7	GWM526
ACOUSTIC	11	7	GWM526	FIGARO	12	7	GWM526
ADHOC	11	1	STM673	FLAMENKO	11	7	GWM526
ALIGATOR	10	17	Ventriup-LN2	FLUOR	11	Résistant	?
ALIXAN	5	32	WMC170	FOLKLOR	11	32	WMC170
ALIZEO	11	6 et 32	WMC76 et WMC170	GONCOURT	9	6 et 17	WMC76 et Ventriup-LN2
ALLEZ-Y	11	3, 25 ou/et Sd	WMC356, GDM33 ou/et ?	GRAINDOR	6	7 et (9 ou 17)	GWM526 et (GWM582 ou Ventriup-LN2)
ALTAMIRA	9	17	Ventriup-LN2	HYBERY	11	1	STM673
ALTEO	11	Résistant	?	HYSTAR	8	7 et (17, 32)	GWM526 et (Ventriup-LN2, WMC170)
ALTIGO	7	17	Ventriup-LN2	HYSUN	4	2 et (3 ou Sd)	WMC364 et (WMC356 ou ?)
AMBELLO	11	17	Ventriup-LN2	KARILLON	11	2	WMC364
APACHE	98	7 et 17	GWM526 et Ventriup-LN2	KORELI	6	17	Ventriup-LN2
AREZZO	8	17	Ventriup-LN2	MATTIS	11	17	Ventriup-LN2
ARKEOS	11	6 et 32	WMC76 et WMC170	MIROIR	11	7	GWM526
AUBUSSON	2	17	Ventriup-LN2	MUSIK	11	7	GWM526
AZZERTI	10	17	Ventriup-LN2	ORVANTIS	0	17	Ventriup-LN2
BAROK	9	17	Ventriup-LN2	PAKITO	11	Résistant	?
BERMUDE	7	17 et 6	Ventriup-LN2 et WMC76	PALEDOR	5	2 et (3 ou Sd)	WMC364 et (WMC356 ou ?)
BOISSEAU	7	Résistant	?	PREMIO	7	7	GWM526
BOREGAR	8	32	WMC170	RACINE	11	6 et 17	WMC76 et Ventriup-LN2
CAPHORN	1	6 et 17	WMC76 et Ventriup-LN2	SAINT EX	11	Résistant	?
CARRE	11	32	WMC170	SCENARIO	11	17	Ventriup-LN2
CHEVRON	9	6 et 17	WMC76 et Ventriup-LN2	SCOR	9	32	WMC170
COMPIL	10	17	Ventriup-LN2	SELEKT	7	6	WMC76
CONTREFOR	11	17	Ventriup-LN2	SOISSONS	88	2	WMC364
CROISADE	11	7	GWM526	SOKAL	11	Résistant	?
DINOSOR	5	17 ?	Ventriup-LN2	SWEET	11	6 et 17	WMC76 et Ventriup-LN2
EPHOROS	4	3, 25 et Sd	WMC356, GDM33 et ?	TRAPEZ	9	32	WMC170
EUCLIDE	7	32	WMC170	TULIP	11	32	WMC170
EXPERT	8	6	WMC76				

Annexe 3 : Liste des variétés utilisées pour l'analyse en conditions contrôlées des gènes de résistance à la rouille jaune.

Année : année de diffusion de la variété. Hypothèse gènes (Yr) : postulat des gènes de résistance Yr dont l'absence ne peut être avérée d'après les types d'infection observés pour 12 pathotypes. Lorsque la variété est résistante à tous les pathotypes, elle est indiquée Résistant.).

Variété	Année	Hypothèse gènes (Yr)	Variété	Année	Hypothèse gènes (Yr)
ACCROC	10	7 et (2, 3 ou 25)	FARINELLI	11	7 et (1, 2, 3, 4, 6, 9, 17, 32 ou 25)
ACOUSTIC	11	7 et (2, 3, 4 ou 25)	FIGARO	12	7 et (2, 3, 4 ou 25)
ADHOC	11	1 et (2, 3 ou 25)	FLAMENKO	11	7 et (2, 3 ou 25)
ALIGATOR	10	17 et (1, 2, 3, 4, 9 ou 25)	FLUOR	11	Résistant
ALIXAN	5	32 et (1, 2, 3, 4, 9, 17 ou 25)	FOLKLOR	11	32 et (1, 2, 3, 4, 9, 17 ou 25)
ALIZEO	11	(6 et 32) et (1, 2, 3, 4, 9, 17 ou 25)	GONCOURT	9	(6 et 17) et (1, 2, 3, 4, 9 ou 25)
ALLEZ-Y	11	2 et 3 et 25	GRAINDOR	6	7 et (1, 2, 3, 4, 6, 9, 17, 32 ou 25)
ALTAMIRA	9	17 et (1, 2, 3, 9 ou 25)	HYBERY	11	1 et (2, 3 ou 25)
ALTEO	11	Résistant	HYSTAR	8	7 et (1, 2, 3, 4, 6, 9, 17, 32 ou 25)
ALTIGO	7	17 et (1, 2, 3, 9 ou 25)	HYSUN	4	2 et 3 et 25
AMBELLO	11	17 et (1, 2, 3, 4, 9 ou 25)	KARILLON	11	2 ou sensible
APACHE	98	(7 et 17) et (1, 2, 3 ou 25)	KORELI	6	17 et (1, 2, 3, 9 ou 25)
AREZZO	8	17 et (1, 2, 3, 4, 9 ou 25)	MATTIS	11	17 et (1, 2, 3, 4, 9 ou 25)
ARKEOS	11	(6 et 32) et (1, 2, 3, 4, 9, 17 ou 25)	MIROIR	11	7 et (2, 3 ou 25)
AUBUSSON	2	17 et (1, 2, 3, 4, 9 ou 25)	MUSIK	11	7 et (2, 3 ou 25)
AZZERTI	10	17 et (1, 2, 3, 4, 9 ou 25)	ORVANTIS	0	17 et (1, 2, 3, 4, 9 ou 25)
BAROK	9	17 et (1, 2, 3, 4, 9 ou 25)	PAKITO	11	Résistant
BERMUDE	7	(6 et 17) et (1, 2, 3, 4, 9 ou 25)	PALEDOR	5	2 et 3 et 25
BOISSEAU	7	Résistant	PREMIO	7	7 et (1, 2, 3, 4, 6, 9, 17, 32 ou 25)
BOREGAR	8	32 et (1, 2, 3, 4, 9, 17 ou 25)	RACINE	11	(6 et 17) et (1, 2, 3, 4, 9 ou 25)
CAPHORN	1	(6 et 17) et (1, 2, 3, 4, 9 ou 25)	SAINT EX	11	Résistant
CARRE	11	32 et (1, 2, 3, 4, 9, 17 ou 25)	SCENARIO	11	17 et (1, 2, 3, 4, 9 ou 25)
CHEVRON	9	(6 et 17) et (1, 2, 3, 4, 9 ou 25)	SCOR	9	32 et (1, 2, 3, 4, 9, 17 ou 25)
COMPIL	10	17 et (1, 2, 3, 4, 9 ou 25)	SELEKT	7	6 et (1, 2, 3 ou 25)
CONTREFOR	11	17 et (1, 2, 3, 4, 9 ou 25)	SOISSONS	88	2 et (3 ou 25)
CROISADE	11	7 et (1, 2, 3, 4, 6, 9, 17, 32 ou 25)	SOKAL	11	Résistant
DINOSOR	5	17 et (1, 2, 3, 4, 9 ou 25)	SWEET	11	(6 et 17) et (1, 2, 3, 4, 9 ou 25)
EPHOROS	4	2 et 3 et 25	TRAPEZ	9	32 et (1, 2, 3 ou 25)
EUCLIDE	7	32 et (1, 2, 3, 4, 9, 17 ou 25)	TULIP	11	32 et (1, 2, 3, 4, 9, 17 ou 25)
EXPERT	8	6 et (2, 3 ou 25)			

Identification des déterminismes génétiques permettant une élaboration optimale du rendement sous contraintes (climatique, azote et maladies)

Christophe MICHELET^{*1}, Laure DUCHALAIS¹, Bruno CLAUSTRES¹, Delphine HOURCADE², Katia Beauchêne², Stéphane Jezequel², Xavier LACAZE², Olivier ROBERT³, Ellen GOUEMAND³, Denis BEGHIN³

1 – RAGT 2n SAS Rue Emile SINGLA, Site de Bourran – B.P. 3336 – 12033 RODEZ Cedex 9

2 – ARVALIS- Institut de Végétal 3 rue Joseph et Marie Hackin, 75116 PARIS

3 – BIOPLANTE, Bioplande Florimond Desprez, BP41, 59242 CAPPELLE EN PEVELE

* Coordinateur : Christophe MICHELET, cmichelet@ragt.fr

1. Introduction

L'amélioration de la productivité restera toujours un objectif essentiel de la création et de la sélection variétale. Cependant depuis plusieurs années la forte volatilité des cours des matières premières agricoles, la hausse des prix des intrants (notamment les engrais), la prise en compte des contraintes environnementales dans les pratiques agricoles et l'évolution des conditions climatiques impactent significativement le revenu des exploitations. C'est pourquoi le progrès génétique pour le rendement doit s'accompagner d'une stratégie de sélection qui intègre tous ces facteurs avec pour principal objectif la sélection de variétés de blé adaptées à des situations de contraintes multiples (température, disponibilité en eau, nutrition azotée, pression parasitaire, etc...).

Depuis plusieurs années, le développement des outils de marquage moléculaire a permis de mieux connaître le déterminisme génétique de certains caractères agronomiques et de facteurs de résistances aux maladies et ainsi d'intégrer progressivement l'utilisation de la sélection assistée par marqueurs dans les programmes de sélection pour le développement de variétés de blé tendre présentant des gènes d'intérêt pour l'agriculteur.

Dans un premier temps, des marqueurs moléculaires ont été développés avec succès sur un nombre important de caractères à héritabilité simple comme la résistance aux maladies (gènes de résistance majeur à la rouille brune *Lr*, à la rouille jaune *Yr*, à *Septoria tritici* *Stb* ou au piétin verse *Pch1*), aux virus (gène *Sbm1* de résistance à la mosaïque du blé) et aux insectes (gène *Sm1* de résistance à la cécidomyie orange du blé), certains éléments qualitatifs majeurs (le locus *Ha* contrôlant la dureté du grain), et des composantes contrôlant la hauteur de la plante (gènes de nanisme *Rht-B1*, *Rht-D1*) ou le cycle de développement de la plante (gène de vernalisation *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*). Ces marqueurs sont désormais utilisés dans de nombreux programmes de sélection de par le monde (Landjeva *et al.* 2007, <http://maswheat.ucdavis.edu>).

Pour des caractères plus complexes comme le rendement, des approches statistiques particulières doivent être appliquées pour détecter des composantes génétiques à effet quantitatif (QTL, Quantitative Trait Loci) tout en tenant compte des interactions QTLs x Environnement ainsi que des interactions entre QTLs. Du fait de la ségrégation de nombreuses composantes génétiques au sein d'une population de lignées recombinantes, l'identification de liaisons étroites entre les marqueurs et le ou les QTLs d'intérêt est parfois difficile. Cela nécessite le recours à d'autres stratégies comme la production de lignées quasi iso-géniques obtenues par rétrocroisement du QTL d'intérêt pour affiner le positionnement des marqueurs vis-

à-vis de celui-ci tout en limitant les effets du fonds génétique. Par ailleurs, ce type de structure génétique (population de lignées recombinantes) permet uniquement de générer des informations sur la valeur des allèles issues des 2 lignées parentales qu'il faut ensuite valider au sein d'un panel de matériel génétique plus diversifié. D'autre part, la nécessité de développer spécifiquement une population recombinante issue de technologies HD (haplo-diploïdisation) ou SSD (Single Seed Descent) en ségrégation pour le caractère d'intérêt constitue également une contrainte forte de coût et de temps lorsque ce type d'études est initié. Ces difficultés ont pu limiter le développement de marqueurs associés à ces QTLs en comparaison des marqueurs associés à des gènes majeurs.

Pourtant, des QTLs liés au rendement et aux composantes de rendement ont été rapportés dans de nombreuses études (Quarrie *et al.* 2005, Sun *et al.* 2009; Li *et al.* 2007, Kuchel *et al.* 2007a) et certaines ont été réalisées pour étudier des interactions entre l'élaboration du rendement et l'environnement, en particulier sous des conditions de stress abiotiques (Quarrie *et al.* 2006, Kuchel *et al.* 2007b, Snape *et al.* 2007, Kirigwi *et al.* 2007).

Une autre approche pour la détection de QTLs se développe actuellement : il s'agit des études par génétique d'association qui permettent d'associer des données génotypiques provenant de matériel génétique diversifié issu des programmes de sélection à des données phénotypiques normalement mesurées durant le processus de sélection comme le rendement. L'un des avantages de cette méthode est l'accès à une variabilité allélique plus forte au travers d'un groupe de matériel d'origine génétique diversifiée. Grâce à des méthodes statistiques appropriées, il est alors possible de déterminer l'effet de différents allèles associés à un QTL donné.

L'application de la génétique d'association demande un nombre important de marqueurs pour obtenir une couverture génétique dense et de ce fait nécessite l'accès à des techniques de génotypage à haut débit.

La nature allohexaploïde du génome du blé a limité le développement de marqueurs SNPs à partir de la voie conventionnelle des ESTs (Expressed Sequence Tag) et a compliqué l'analyse génétique du fait des produits d'amplification homéologues (Barker and Edwards, 2009). Malgré ces inconvénients, des progrès ont été réalisés sur l'optimisation de la voie ESTs pour l'obtention des marqueurs SNPs (<http://wheat.pw.usda.gov/SNP/new/index.shtml>) et de la validation de la plateforme Illumina Golden Gate Assay sur le blé (Akhunov *et al.* 2009). Le développement de marqueurs COS (Conserved Orthologous Set) (Quraishi, 2009) et ISBP (Insertion Site Based Polymorphism) (Paux *et al.* 2008) ainsi que l'exploitation d'une prochaine génération de marqueurs SNPs

spécifiques des génomes A, B et D du blé (http://www.cerealsdb.uk.net/search_reads.htm) contribueront considérablement au développement de cette approche QTL par génétique d'association. L'objectif de ce projet était d'appliquer ces approches nouvelles de génétiques d'association pour l'identification de facteurs génétiques liés au rendement chez le blé tendre et en particulier sous contraintes hydrique, azote et maladies.

2. Matériel et méthodes

► 2.1 - Matériel végétal

Un panel de 206 variétés et lignées a été défini par les 3 partenaires du projet.

Ce matériel végétal se compose du « panel de lignées élites françaises » travaillé par ARVALIS (148 variétés) ainsi que d'un échantillon complémentaire de 58 variétés et lignées en cours de sélection apporté par R2n et BIOPLANTE.

► 2.2 - Phénotypage du matériel végétal

Evaluation phénotypique au champ du panel commun en condition de stress hydrique

Cette évaluation a été conduite sur 2 années (2011 et 2012) sur le site ARVALIS de Gréoux (04) identifié comme particulièrement intéressant pour mener des études sur le comportement variétal face au stress hydrique et thermique. Le sol est de type sablo-argilo limoneux. Ce panel de variétés a été testé sous 2 conditions : non irriguée (SEC) et irriguée (IRR).

En 2011, uniquement 155 variétés ont pu être testées sous la condition irriguée. Cinq irrigations ont été réalisées entre les stades apparition de la dernière feuille (Z37) et grain laiteux (Z75) pour un total de 175 mm d'eau pour la modalité Irriguée. Aucun apport d'eau n'a été effectué pour la modalité SEC.

En 2012, uniquement 131 variétés ont pu être évaluées. Quatre irrigations ont été réalisées entre les stades épi 1 cm (Z30) et grain laiteux-pâteux (Z80) pour un total de 130 mm d'eau pour la modalité IRR. Un apport de 30 mm a été réalisé pour la modalité SEC afin de favoriser un bon établissement du nombre d'épis/m². Le stress hydrique est donc plutôt appliqué pendant la phase du remplissage du grain.

Le programme d'irrigation 2012 est assez différent de celui de 2011 par la quantité (- 40mm en 2012), par la fréquence (4 en 2012 au lieu de 5 en 2011) et par les dates d'apport (80% des apports entre fin montaison à fin épiaison en 2011 contre 80% des apports réalisés entre début épiaison à la fin du remplissage du grain en 2012).

Evaluation phénotypique au champ du panel commun en condition de stress azoté et de faible pression maladies

Le panel de 206 variétés a été évalué sur 2 sites en 2011 (un site R2n à Louville la Chenard = LLC (28-Eure et Loir) et un site Bioplane à Prémèsques = PRE (59-Nord)) et sur 2 sites également en 2012 (un site R2n à Louville la Chenard = LLC (28-Eure et Loir) et un site Bioplane à Cappelles = CAP (59-Nord)).

Sur chaque site, 2 modalités différentes ont été appliquées :

- **Une Modalité N+F+** correspondant à une conduite à l'optimum technique pour la fertilisation azotée et pour la protection fongicide.
- **Une Modalité N-F-** correspondant à une conduite avec limitation des intrants (azote et fongicide).

Deux répétitions ont été réalisées par essai et par modalité.

Le tableau ci-dessous présente les 2 itinéraires techniques culturaux appliqués sur les 4 sites d'expérimentation en 2011 et 2012 :

Site	Année	Modalité	Précédent	Date de semis	Azote (dose totale)	Fertilisation azotée et protection fongicide
Louville	2011	N+F+	Colza	22/10/2010	200	2 fongicides foliaires (dose 100%) + 2 fongicides anti-fusariose de l'épi (dose 100%)
Louville	2011	N-F-	Colza	22/10/2010	120	2 fongicides foliaires (dose 50%) + 2 fongicides anti-fusariose de l'épi (dose 100%)
Prémèsques	2011	N+F+	Pomme de terre	26/10/2010	170	2 fongicides foliaires (dose 100%) + 2 fongicides anti-fusariose de l'épi (dose 100%)
Prémèsques	2011	N-F-	Pomme de terre	26/10/2010	120	Pas d'application de fongicides foliaires et anti-fusariose = essais non traités
Louville	2012	N+F+	Colza	18/10/2011	150	2 fongicides foliaires (dose 100%) + 2 fongicides anti-fusariose de l'épi (dose 100%)
Louville	2012	N-F-	Colza	18/10/2011	50	2 fongicides foliaires (dose 50%) + 2 fongicides anti-fusariose de l'épi (dose 100%)
Cappelles	2012	N+F+	Mais ensilage	28/10/2011	230	2 fongicides foliaires (dose 100%) + 1 fongicide anti-fusariose de l'épi (dose 100%) + régulateur
Cappelles	2012	N-F-	Mais ensilage	28/10/2011	130	2 fongicides foliaires (dose 50%) + 1 fongicide anti-fusariose de l'épi (dose 100%)

La modalité N- avait pour objectif de créer une situation de carence azotée pendant la phase de montaison du blé. Le tableau ci-dessous résume les applications d'azote (kg/ha) sur les 4 sites en 2011 et 2012 :

Site	Année	Modalité	Reliquat sortie hiver	Apport N1	Apport N2	Apport N3	Dose totale
Louville	2011	N+F+	25	50	90	60	200
Louville	2011	N-F-	25	0	60	60	120
Prémèsques	2011	N+F+	62	40	80	50	170
Prémèsques	2011	N-F-	62	0	70	50	120
Louville	2012	N+F+	80	50	60	40	150
Louville	2012	N-F-	80	0	0	50	50
Cappelles	2012	N+F+	25	50	130	50	230
Cappelles	2012	N-F-	25	0	80	50	130

Notations et mesures réalisées sur les essais

Les notations et mesures réalisées sur les essais figurent dans le tableau ci-dessous :

(V) 1 rep	Notation partielle - données manquantes Notation sur 1 répétition	2011								2012							
		LLC N+F+	LLC N-F-	PRE N+F+	PRE N-F-	GRE IRR	GRE SEC	LLC N+F+	LLC N-F-	CAP N+F+	CAP N-F-	GRE IRR	GRE SEC	LLC N+F+	LLC N-F-	CAP N+F+	CAP N-F-
CODE VARIABLE	NOTATION																
D_Z30	Date de semis	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
D_Z35	Date de semis Z35	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
D_Z55_0	Date de semis Z55_0	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
D_Z75	Date de récolte	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
INFO	Informations générales	N	N	N	N	Y	Y	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
INFO	Informations générales	N	N	N	N	Y	Y	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
SA	Surface	Y	Y	Y	Y	(Y)	(Y)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
TSR	Temps de semis	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
SPS	Temps de semis	N	N	N	N	Y	Y	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
FSPS	Temps de semis	N	N	N	N	Y	Y	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
GR15	Temps de semis	Y	Y	Y	Y	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
GNBP_C1	Temps de semis	N	N	N	N	(Y)	(Y)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
GNBP_C2	Temps de semis	Y	Y	Y	Y	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
GPA_C1	Temps de semis	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
GPA_C2	Temps de semis	Y	Y	Y	Y	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
GPS_C1	Temps de semis	Y	Y	Y	Y	(Y)	(Y)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
GPS_C2	Temps de semis	Y	Y	Y	Y	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
THW_P1	Temps de semis	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
THW_P2	Temps de semis	Y	Y	Y	Y	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
THW_P3	Temps de semis	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
GY	Temps de semis	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
GR1	Temps de semis	N	N	N	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
GR2	Temps de semis	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
GR3	Temps de semis	Y	Y	Y	Y	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
GR4	Temps de semis	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
GR5	Temps de semis	Y	Y	Y	Y	1 rep	1 rep	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
GR6	Temps de semis	Y	Y	Y	Y	1 rep	1 rep	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

► 2.3 - Génotypage du matériel végétal

Différentes plateformes de génotypage ont permis de génotyper l'ensemble du panel étudié.

Nous avons ainsi pu le génotyper avec :

- 1572 marqueurs DArT (Triticarte Pty Ltd)
- 439 marqueurs SSR
- 1 734 SNPs issus du projet Digital
- 35 867 SNP issus de la puce 90K (Illumina)
- 104 727 SNP provenant de la puce TaBW420 développée dans le cadre du projet Breedwheat.

Pour les marqueurs SSR et SNP, le génotypage a été effectué par la plateforme Gentyane basée à l'INRA GDEC.

► 2.4 - Analyse des données

Ajustement des données de phénotypage

Un modèle mixte linéaire a été utilisé pour estimer les effets terrains et pouvoir calculer des moyennes ajustées. Le sous-bloc de précocité et le génotype ont été définis comme fixes et les répétitions ont été définies comme aléatoires dans ce modèle. Les lieux et les modalités ont été traités de façon indépendante.

Analyses d'association

Les marqueurs ayant une Minimum Allele Frequency (MAF) inférieure à 5% ainsi que les marqueurs présentant plus de 20% de données manquantes ou hétérozygotes ont été supprimés des analyses de génétique d'association afin d'éviter les liaisons marqueur/caractère non significatives ou erronées.

Un modèle mixte linéaire (MLM) introduisant une matrice structure et une matrice d'apparentement a été utilisé grâce au package EMMA pour calculer les associations marqueurs – caractères. La date d'épiaison moyenne a également été introduite en co-variable pour les caractères présentant une forte interaction avec la précocité.

Analyses des interactions génotype x environnement

Données phénotypiques

Une base de données a été constituée par la mise en commun des différents partenaires du projet de données phénotypiques historiques correspondant à 789 environnements au total et une trentaine de variétés inscrites au catalogue français était présente par environnement. Au total 13 197 données individuelles (lieu x année x variété) ont été mises à la disposition d'Arvalis pour l'analyse des interactions QTL x Environnement. Les données ont été acquises entre 2005 et 2010 et concernent uniquement le rendement. La caractérisation environnementale a consisté à calculer pour chaque combinaison lieu x année x variété des indicateurs de stress dérivés des données météorologiques. Les données de base météorologiques utilisées sont issues des stations météorologiques les plus proches possibles des lieux d'essais et correspondent au réseau interne Arvalis de références météorologiques. Les moyennes de ces données brutes journalières (ETP caractérisant l'évapotranspiration, Températures maximales, Températures minimales, Températures moyennes, Rayonnement Global, Précipitations) ont permis de dériver des indicateurs de stress pour des intervalles phénologiques recalculés à partir de l'interface Panoramix (outil modélisateur interne à Arvalis qui permet de recalculer les stades phénologiques d'un cycle de blé tendre à partir des données météorologiques et de sols pour toutes les combinaisons lieu x année x variété considérées). Une fois les stades phénologiques déterminés, nous avons pu pour chacun calculer des indices de stress tels que la somme des températures maximales supérieures à 25°C entre épiaison et grain laiteux. Au total 120 covariables de nature différente ont été calculées pour chaque combinaison lieu x année x variété. Ces informations appelées « covariables environnementales » sont analysées en parallèle avec les données génotypiques et phénotypiques.

Données génotypiques

Les données de génotypage de la puce 90K sont utilisées. Seulement 23 462 marqueurs ont été retenus après filtres sur les données manquantes (taux de données manquantes supérieur à 10%) et sur la MAF (inférieure à 5% des données). Après l'application de ces filtres, les données génotypiques, phénotypiques et de covariables environnementales pouvaient être analysées en régression factorielle.

Le modèle d'analyse est un modèle linéaire de la forme suivante :

$$Y_{ij} = \mu + cov_{kj} + mk_{mi} + cov_{kj}.mk_{mi} + K + \varepsilon_{ij}$$

Dans cette équation, i correspond au génotype, j à l'environnement considéré, μ à l'intercept ou moyenne générale, cov_{kj} à l'effet principal de la covariable environnementale k qui explique une partie des effets principaux environnement, mk_{mi} correspond au marqueur m caractéristique du génotype i , $cov_{kj}.mk_{mi}$ correspond au terme d'interaction entre la covariable k et le marqueur m .

Ce modèle permet de tester s'il existe des pentes de régression différentes selon les allèles au marqueur considéré vis-à-vis de la covariable environnementale. Si les pentes sont significativement différentes alors la p -value associée au terme décrit ci-dessus devient significative. Enfin, K correspond à la matrice de kinship dérivée de l'apparentement calculé sur la base des marqueurs moléculaires et ε_{ij} à la résiduelle du modèle. En effet, il n'y avait pas de répétition d'un génotype dans un environnement donné. On peut donc tester l'interaction $cov_{kj}.mk_{mi}$ mais les effets d'interaction génotype x environnement sont confondus avec la résiduelle ce qui pose souci pour la représentation des effets des allèles aux marqueurs.

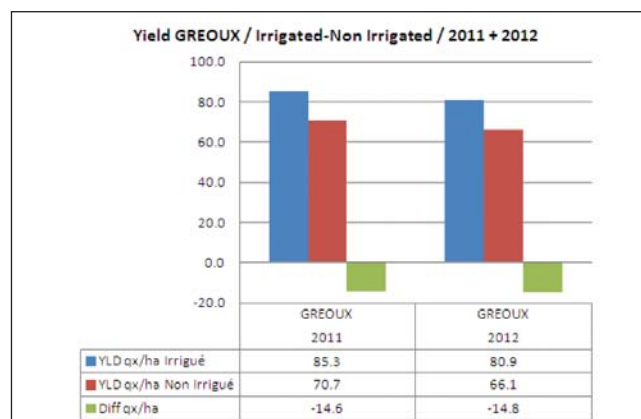
Les analyses ont donc été menées sous ASREML (Gilmour *et al.*, 2009). Le seul effet aléatoire déclaré étant l'effet de la Kinship, tous les autres effets ont été considérés comme fixes.

3. Résultats et discussion

► 3.1 - Evaluation phénotypique du matériel végétal

Résultats des expérimentations IRR / SEC 2011 et 2012 à Gréoux

La figure ci-dessous montre les résultats de rendement obtenu en 2011 et 2012 sur les 2 modalités IRR et SEC. Les rendements moyens obtenus sont très similaires entre les 2 années avec des différentiels d'environ 14 qx/ha malgré des modalités d'irrigations assez différentes entre 2011 et 2012.



Les 2 tableaux ci-dessous montre les facteurs explicatifs de la variation de rendement entre les 2 modalités.

GREOUX 2011					GREOUX 2012				
	Sec	Irrigué	Diff			Sec	Irrigué	Diff	
Heading time	132	132	0	ns	Heading time	67	69	-2	ns
Senescence date	172	172	0	ns	Plant height	67	69	-2	ns
Plant height	71	78	-7	***	Nb Ear/m²	479	523	-44	**
Biomasse Flo	21.8	22.3	-0.5	*	Nb Spikelet/Ear	18.0	18.0	-0.1	ns
N Flowering time	1.6	1.5	0.1	**	Nb aborted spikelet/Ear	2.4	2.4	0.1	ns
Nb Ear/m²	495	497	-2	ns	Nb fertile spikelet/Ear	15.5	15.7	-0.2	ns
Nb Spikelet/Ear	21.4	20.8	0.6	**	Nb Grain/spikelet	2.7	2.7	0.0	ns
Nb aborted spikelet/Ear	3.4	3.3	0.1	ns	Nb Grain/m²	42	41	0.4	ns
Nb fertile spikelet/Ear	18.0	17.4	0.5	**	Nb Grain/m³	19735	21350	-1615	***
Nb Grain/spikelet	2.3	2.5	-0.3	***	TKW	33.8	38.2	-4.4	***
Nb Grain/Ear	40	44	-4	***	Grain dry matter	6.2	7.8	-1.6	***
Nb Grain/m³	19651	21930	-2279	***	Straw dry matter	6.8	8.1	-1.3	***
TKW	36.0	39.2	-3.2	***	Total dry matter	13.0	15.9	-2.9	***
Yield qx/ha	70.7	85.3	-14.6	***	Harvest Index	0.47	0.49	-0.02	ns
Sp.Weight	73.9	74.3	-0.4	ns	Yield qx/ha	66.1	80.9	-14.8	***
Protein content	12.9	10.4	2.5	***	Sp.Weight	76.8	81.2	-4.4	***
					Protein content	14.5	12.9	1.6	***

En 2011, l'écart de rendement s'expliquerait par une diminution du PMG et du nombre de grains/m² suite à une réduction du nombre de grains/épi sans que le nombre d'épis/m² soit pénalisé.

En 2012, une diminution du PMG et du nombre de grains/m² serait aussi responsable de l'écart de rendement Irrigué/Sec. Mais par rapport à 2011, la composante « nombre d'épis/m² » expliquerait en grande partie la réduction du nombre de grains/m² en conservant un nombre de grains/épi stable entre les 2 modalités. On observe également une diminution des teneurs en matières sèches des pailles et du grain entre les 2 modalités en 2012.

Le stress hydrique appliqué en 2011 et 2012 n'affecte donc pas de la même manière l'élaboration de la composante de rendement « nombre de grains/m² ». Le PMG est cependant la composante qui a été systématiquement pénalisée par le stress hydrique.

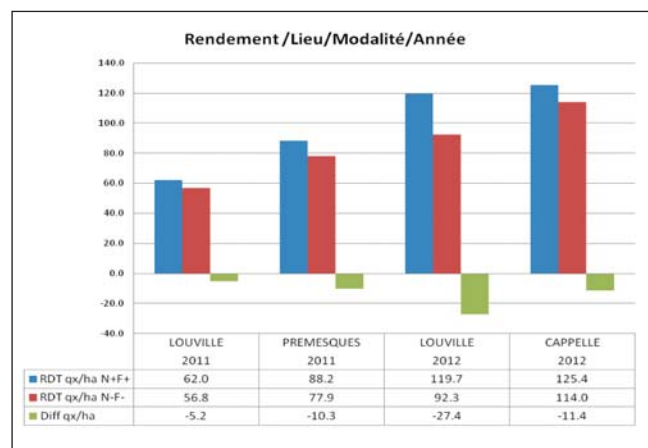
Les corrélations pour le rendement entre les 2 modalités IRR et SEC et les 2 années d'expérimentations sont très faibles :

	SEC_11GRE	IRR_11GRE	SEC_12GRE	IRR_12GRE
SEC_11GRE	1			
IRR_11GRE	0.29197323	1		
SEC_12GRE	0.00886654	0.02357345	1	
IRR_12GRE	0.26286327	0.36964312	0.41187742	1

Ces résultats confirment donc que les stress hydriques appliqués en 2011 et en 2012 n'ont pas affecté le rendement de la même façon.

Résultats des expérimentations 2011 et 2012 en conditions N+F+ et N-F-

La figure ci-dessous présente les résultats rendement obtenus sur les 4 sites en 2011 et 2012 (modalités N+F+ et N-F-).



Essai Louville 2011 : Le rendement moyen N+F+ est égal à 62 qx/ha vs 56.8 qx/ha pour la modalité N-F-. L'écart de rendement entre les 2 modalités est de 5,2 qx/ha pour une réduction de 80u d'azote. Par rapport à une année normale, le potentiel de rendement a été fortement affecté par les conditions sèches du printemps qui ont pénalisé l'absorption de l'azote pendant la phase de montaison expliquant le faible différentiel de rendement N+F-/N-F-.

Essai Prémèsques 2011 : Le rendement moyen N+F+ est égal à 88.2 qx/ha vs 77.9 qx/ha pour la modalité N-F-. L'écart de rendement est de 10.4 qx/ha pour une réduction de 50u d'azote. Le potentiel de rendement N+F+ sur le site de Prémèsques est nettement supérieur à celui de Louville (+26 qx/ha) ce qui dénoterait des conditions d'absorption de l'azote beaucoup plus favorables. L'écart de rendement N+F+/N-F- est

2 fois plus important à Prémèsques (-10.4 qx/ha) qu'à Louville (-5.2 qx/ha). Sur ces 2 sites, la pression des maladies foliaires (septoriose, rouille jaune et rouille brune) était quasi-nulle dans les essais N-F- à cause des conditions particulièrement défavorables du printemps (absence significative de pluies).

Essai Louville 2012 : Le rendement moyen N+F+ est égal à 119.7 qx/ha vs 92,3 qx/ha pour la modalité N-F- soit un écart de rendement de 27.4 qx/ha pour une réduction de 100u d'azote. Ce potentiel de rendement élevé est à relier aux conditions très favorables pour la mise en place des composantes Nb grains/m² et PMG. A noter que malgré une pression maladie très forte, un programme allégé en N-F- a permis de protéger l'essai de manière très satisfaisante (pas d'observation de maladies) et que par conséquent l'écart de rendement observé entre les 2 modalités peut être principalement attribué à la réduction de la fertilisation azotée.

Essai Cappel 2012 : Le rendement moyen N+F+ est égal à 125,4 qx/ha vs 114 qx/ha en N-F-, soit une différence de 11,4 qx/ha pour une réduction de 100u d'azote. Comme à Louville, des conditions très favorables ont permis l'expression d'un potentiel élevé. Il a été observé la présence de septoriose, de rouille jaune et de rouille brune en N-F-. Par conséquent, l'écart de rendement entre les 2 modalités pourra s'expliquer plus par une interaction entre carence azotée x maladies foliaires.

Les 2 sites de Louville et Cappel se différencient surtout au niveau du rendement obtenu sous la modalité N-F- avec un plus fort différentiel à Louville (-27 qx/ha vs -11 qx/ha) qui peut s'expliquer par l'absence du 2^{ème} apport d'azote (décision d'impasse suite au reliquat élevé de 80u mais qui n'a certainement pas pu être valorisé à 100%).

Le tableau suivant montre les facteurs explicatifs des écarts de rendement obtenus entre les modalités N+F+ et N-F- en 2011 et 2012 :

	LOUVILLE 2011				PREMESQUES 2011				LOUVILLE 2012				CAPPELLE 2012			
	N+F+	N-F-	Diff	Proba	N+F+	N-F-	Diff	Proba	N+F+	N-F-	Diff	Proba	N+F+	N-F-	Diff	Proba
Heading time	131	132	-1	*	133	133	0	ns	142	141	1	ns	140	140	0	ns
Plant height	69	68	2	**	85	85	0	ns	95	90	5	**	86	82	4	**
Yield qx/ha	62.0	56.8	5.2	***	88.2	77.9	10.3	***	119.7	92.3	27.4	***	125.4	114.0	11.4	***
Nb Ear/ha	328	317	11	**	354	342	12	**	402	401	1	ns	428	406	12	**
Nb Spikelet/Ear	16.1	15.6	0.5	*	19.2	18.6	0.6	**	16.9	17.6	-0.7	**	17.1	17.0	0.1	ns
Nb Grain/Spikelet	2.3	2.4	0.0	*	2.3	2.3	0.0	ns	2.6	2.5	0.2	*	3.0	3.4	-0.4	**
Nb Grain/Ear	45	38	7	***	47	43	4	**	44.4	43.5	0.9	ns	52	57	-5	**
Nb Grain/m ²	14024	11725	2699	***	16332	14482	1850	***	20167	20503	-366	***	32080	27366	4722	***
TGW	43.2	48.6	-5.4	***	54.3	54.2	0.1	ns	46.2	45.5	0.7	*	39.4	41.9	-2.5	**
Sp Weight	77.6	77.6	0.1	ns	77.4	76.1	1.3	**	75.5	75.5	0.0	ns	77.6	77.4	0.2	ns
Protein content	11.7	11.4	0.3	***	12.7	11.4	1.3	***					12.3	11.2	1.1	***

En 2011, l'écart de rendement sur les 2 sites s'explique par une diminution du nombre de grains/m² suite à une réduction combinée du nombre d'épis/m² x nombre de grains/épi. Cependant, le PMG demeure constant entre les 2 modalités à Prémèsques à l'inverse de ce qui est observé sur le site de Louville (augmentation du PMG en N-F- suite à la réduction du nombre de grains/m²).

En 2012, le nombre de grains/m² est la composante qui explique principalement la différence de rendement entre les 2 modalités au travers d'une forte diminution du nombre d'épis/m².

Sur 2 ans, le nombre de grains/m² semble la composante la plus affectée par le stress azoté qui selon les années s'expliquerait plus par une réduction du nombre de grains/épi (2011) ou par une diminution du nombre d'épis/m² (2012). Le PMG interviendrait très peu dans l'explication de l'écart de rendement entre les 2 modalités.

Nous observons également une teneur en protéines beaucoup plus faible sous la modalité N-F- et un effet peu marqué de la diminution de la fertilisation azotée sur le poids spécifique.

Les tableaux suivants montrent les analyses de corrélation entre les 2 années pour chaque modalité. Les corrélations de Pearson sont effectuées sur les moyennes des 2 sites de chaque année. Les corrélations sont très bonnes entre les 2 années pour les 2 modalités concernant l'épiaison et la hauteur qui sont des caractères très héréditaires, mais également pour le nombre d'épis/m² et le nombre de grains/m². Des corrélations plus faibles mais supérieures à 0.50 sont observées pour le rendement, le nombre d'épis/m² et le nombre de grains/épis ce qui indique une plus forte interaction avec l'environnement.

Annual correlation	MEAN 2011/2012	
	2011 = LLC+PRE	
	2012 = LLC +CAP	
	N+F+	N-F-
Grain Yield	0.52	0.64
Nb Ear/m ²	0.55	0.42
Nb Spikelet/Ear	0.83	0.84
Nb Grain/spikelet		
Nb Grain/Ear	0.58	0.49
Nb Grain/m ²	0.73	0.72
TKW	0.70	0.78
Heading time	0.97	0.97
Plant height	0.83	0.86
Sp.Weight	0.44	0.51
Protein content		

Les corrélations pour le rendement entre les 2 modalités N-F- et N+F+ sont très élevées pour une même année et sont relativement correctes entre les 2 années de phénotypage.

	N-F-_11MOY	N+F+_11MOY	N-F-_12MOY	N+F+_12MOY
N-F-_11MOY	1			
N+F+_11MOY	0.813232116	1		
N-F-_12MOY	0.644920392	0.630389246	1	
N+F+_12MOY	0.507890767	0.516805663	0.757251801	1

► 3.2 - Description génétique du panel

Les différents batches de génotypage ont permis de couvrir de façon homogène le génome. Le nombre de marqueurs par chromosome varie entre 5 534 (4D) et 16 186 (2B). La moyenne est de 10 860 marqueurs et le génome D reste cependant le moins bien représenté.

Une analyse de la diversité génétique à l'aide d'une ACP sur la matrice de Kinship générée avec les marqueurs SNP de la TaBW420 permet de distinguer 4 groupes. La même conclusion aurait été faite sur la base des 439 SSRs, à la différence que les groupes sont plus resserrés.

Le Déséquilibre de liaison (DL) a été calculé avec le package LDHeatMap sous R pour chaque paire de marqueur et par chromosome. L'équation de décroissance du DL de Hill & Weir a été « fittée » sur la courbe et la distance à partir de laquelle le DL décroît en dessous de 0,2 a été déterminée pour chaque chromosome.

chromosome	1A	1B	1D	2A	2B	2D	3A	3B	3D	4A	4B	4D	5A	5B	5D	6A	6B	6D	7A	7B	7D
LD decay < 0.2	0.8	0.2	2.7	0.5	0.8	2.0	0.9	0.2	1.2	1.6	1.1	3.9	0.5	2.6	1.5	0.7	0.4	2.5	0.4	0.7	3.5

Les distances varient entre 0.2 et 3.9 cM indiquant une structure du panel faiblement marquée. Cette information nous permet également de diminuer les intervalles de confiance des pics d'association mis en évidence.

► 3.3 - Analyses QTL

Une multitude de QTLs a été détectée dans l'ensemble des environnements testés. Une large partie d'entre eux est

environnement spécifique, c'est-à-dire que leur effet sur le rendement n'est significatif que dans un seul lieu et pour une seule année d'expérimentation. Leur effet est donc trop dépendant de l'environnement pour être utilisé en Sélection Assistée par Marqueur (SAM). Nous nous sommes donc focalisés sur l'identification de QTLs qui se sont exprimés pour les 2 années de phénotypage et les 2 modalités testées pour chacun des stress étudié.

Résultats des expérimentations IRR/SEC 2011 et 2012 à Gréoux

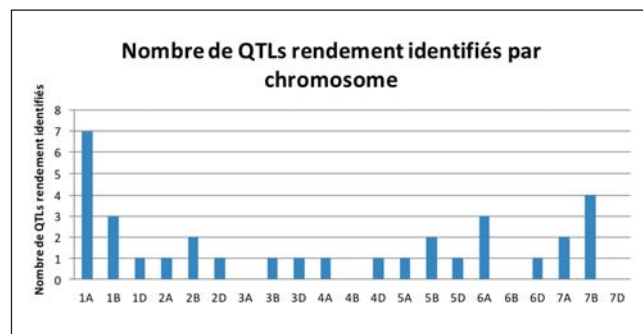
Aucun QTL de rendement n'a pu être identifié pour les 4 environnements testés. Ces résultats peuvent s'expliquer par les très faibles coefficients de corrélation obtenus entre les 4 environnements testés.

Un seul QTL localisé sur le 5B a pu être identifié pour la modalité SEC pour les 2 années de phénotypage. Il a apporté un gain sur le rendement de +8.3% en 2011 et un gain de +2.4% en 2012. Il n'est lié à aucun autre caractère et présente donc un intérêt pour une utilisation en SAM à condition d'être en présence d'un stress hydrique puisqu'il ne s'exprime pas pour la modalité irriguée.

Résultats des expérimentations 2011 et 2012 en conditions N+F+ et N-F-

Trente trois QTLs ont été identifiés comme significativement liés au rendement dans l'ensemble des environnements testés pour les 2 conditions N+F+ et N-F-. Ce grand nombre de QTLs communs aux 2 modalités et aux 2 années testées se justifie par les coefficients de corrélations élevés que nous avons eus entre environnements. En moyenne sur les 4 environnements testés, ils permettent d'obtenir un gain sur le rendement variant de +2.7% à +10% entre l'haplotype négatif et l'haplotype positif en fonction du QTL.

Les 33 QTLs rendement identifiés se distribuent sur l'ensemble des 3 génomes comme le montre la figure ci-dessous :



Sept QTLs ont donc pu être identifiés sur le chromosome 1A, 1 sur le 2A, 1 sur le 4A, 1 sur le 5A, 3 sur le 6A, 2 sur le 7A, 3 sur le 1B, 2 sur le 2B, 1 sur le 3B, 2 sur le 5B, 4 sur le 7B, 1 sur le 1D, 1 sur le 2D, 1 sur le 3D, 1 sur le 4D, 1 sur le 5D et 1 sur le 6D. Aucune relation entre le nombre de QTLs identifiés et la saturation en marqueurs des différents chromosomes n'a pu être identifiée.

Les différents haplotypes de ces 33 QTLs sont suffisamment représentés dans l'ensemble du panel étudié à part pour 4 d'entre eux ayant une MAF inférieure à 10%. Pour ces derniers, leurs effets restent donc à valider dans un panel de lignées ou de variétés beaucoup plus large.

Plusieurs associations entre ces QTLs et d'autres caractères ont pu être mises en évidence.

Parmi ces QTLs, 13 sont également liés à la précocité. Bien que nous ayons introduit l'épiaison en co-variable dans nos analyses

quand nous avons une forte corrélation entre épiaison et rendement, plus d'1/3 des QTLs identifiés présente quand même un impact sur la précocité. L'effet de l'haplotype positif pour le rendement engendre une tardification du matériel variant de 1,5 à 2,5 jours. Ceci peut s'expliquer par le fait que les lieux d'essais se trouvaient au Nord de la Loire et que de ce fait, le matériel précoce était moins adapté que le matériel tardif.

Parmi ces 33 QTLs, 12 sont également liés au poids spécifique. Onze sont liés de façon négative et induisent une diminution du PS allant de -0.34 à -0.74 point de PS et 1 seul QTL est lié de façon positive induisant un gain de PS de +0.49 point pour une augmentation moyenne de 4.5% sur le rendement. Ce QTL présente donc un avantage considérable par rapport aux autres pour une utilisation en SAM.

Parmi ces 33 QTLs, 9 sont également liés au PMG. Ces 9 QTLs sont liés à une augmentation du PMG variant de +1,05g à +2,03g. Plus d'un quart des QTLs rendement sont donc liés à une augmentation du PMG. Le PMG semble donc être une composante importante à travailler si nous voulons améliorer le potentiel rendement de nos variétés.

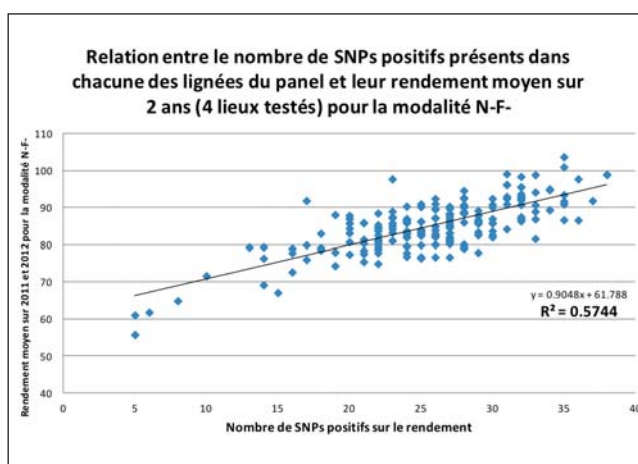
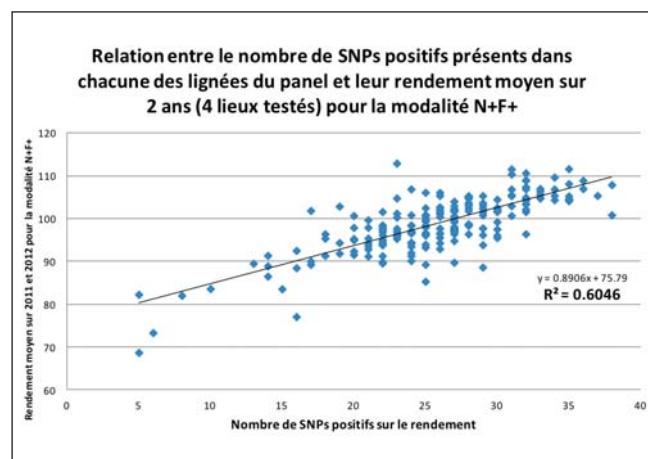
Parmi ces 33 QTLs, 22 sont également liés à la teneur en protéines. Tous ces QTLs sont liés négativement à la teneur en protéines, induisant une baisse variant de -0.13 à -0.74. Deux tiers des QTLs rendement identifiés sont donc liés à une diminution de la teneur en protéines. Une fois encore, il s'avère donc difficile de casser la relation négative entre élaboration du rendement et élaboration de la teneur en protéines. Les QTLs rendement n'ayant pas d'effet sur la teneur en protéines sont donc ceux à privilégier mais ce sont malheureusement ceux qui ont les effets les moins importants sur le rendement.

Parmi ces 33 QTLs, 2 sont également liés à la hauteur et engendrent une légère augmentation de la taille des plantes allant de + 4.0 à + 6.5 cm.

Il est donc extrêmement difficile de trouver un QTL rendement qui n'ait pas d'effet négatif sur un autre caractère. Les QTLs à effet les plus importants sur le rendement sont souvent liés à d'autres caractères de façon négative. Trouver les QTLs à utiliser en SAM s'avère donc comme étant assez complexe.

Finalement, nous avons donc regardé la distribution du rendement en fonction du nombre de SNPs liés de façon positive au rendement présents dans chacune des lignées pour la modalité N+F+ et pour la modalité N-F-.

Grâce aux deux graphiques suivant, nous pouvons donc constater que le rendement augmente de façon linéaire avec le nombre de SNPs positifs présents.



Pour la modalité N+F+, nous obtenons un coefficient de détermination de 0,60 pour la droite de régression linéaire et nous avons une corrélation de 0.78 entre le rendement moyen sur les 4 environnements testés et le nombre de SNPs positifs dans les différentes lignées.

Pour la modalité N-F-, nous obtenons un coefficient de détermination de 0,57 pour la droite de régression linéaire et nous avons une corrélation de 0.76 entre le rendement moyen sur les 4 environnements testés et le nombre de SNPs positifs dans les différentes lignées.

Nous captions donc avec ces 33 QTLs identifiés une partie très importante de la variabilité génétique du rendement quelle que soit la modalité testée sous une contrainte azotée et nous pourrions davantage nous rapprocher de la valeur moyenne du rendement en construisant un modèle prédictif prenant en compte les effets de chacun de ces 33 QTLs identifiés.

► 3.4 - Analyses des interactions génotype x Environnement

Trois QTL principaux ont été identifiés, un sur le chromosome 4A et deux sur le chromosome 4B, tous les trois en interactions avec les températures échaudantes au cours du remplissage du grain ainsi qu'en interaction avec le stress froid de début de cycle. Les p-values associées au test d'interaction entre les marqueurs et les covariables sont inférieures à 10⁻⁷. Pour chaque QTL, un des deux allèles a un effet positif sur le rendement et présente une pente soit croissante soit décroissante vis-à-vis des températures échaudantes. L'autre allèle étant souvent considéré comme ayant un effet nul. Ces QTLs sont donc des gènes en interaction avec l'environnement et peuvent être des gènes centraux dans les voies métaboliques déterminant les caractères principaux comme la précocité et le rendement. L'analyse des interactions QTL x Environnement a donc révélée des QTLs qui n'étaient pas identifiés par ailleurs dans le projet. L'analyse des interactions QTL x Environnement apporte donc une information complémentaire par rapport aux approches traditionnelles de génétique d'association.

4. Conclusions

Ce projet a donc permis d'identifier 37 QTLs de rendement. Trente quatre QTLs ont pu être identifiés grâce au phénotypage réalisé dans le cadre du projet. Parmi ces QTLs, un a été identifié sur le chromosome 5B et ne s'exprime qu'en condition de stress hydrique alors que trente trois QTLs ont pu être identifiés dans la totalité des environnements testés pour les modalités N+F+ et N-F-. La majorité de ces QTLs sont

également liés à d'autres caractères (précocité, PS, PMG, teneur en protéines, hauteur...) ce qui complexifie leur utilisation en SAM qui doit donc se faire avec précaution.

Trois autres QTLs rendement ont pu être identifiés grâce à une base de données phénotypiques constituée par la mise en commun des différents partenaires du projet de données historiques. Grâce à une analyse des interactions Génotype x Environnement, ces QTLs se sont montrés comme étant en étroite interaction avec les températures échaudantes au cours

du remplissage du grain et des températures froides en début de cycle.

En vue du nombre important de QTLs rendement identifiés, de leur impact sur d'autres caractères, de leur interaction avec l'environnement et du nombre croissant de marqueurs moléculaires disponibles, l'utilisation de la sélection génomique pourrait donc être une solution pour améliorer la productivité de nos variétés.

Références bibliographiques

Akhunov E., Nicolet E., Dvorak J. (2009) Single nucleotide polymorphism genotyping in polyploid wheat with the Illumina GoldenGate assay. TAG 119:507-519.

Gilmour A.R., Gogel B.J., Cullis B.R., Thompson R. (2009) ASReml User Guide Release 3.0 VSN International Ltd, Hemel Hempstead, HP1 1ES, UK, www.vsnl.co.uk.

Kirigwi F.M., Van Girkel M., Brown-Guerida G., Gill B.S., Paulsen G.M., Fritz A.K. (2007) Markers associated with a QTL for grain yield in wheat under drought. Mol. Breeding 20: 401-413.

Kuchel H., Williams K.J., Langridge P., Eagles H.A., Jefferies S.P. (2007a) Genetic dissection of grain yield in bread wheat. I. QTL analysis. Theor Appl Genet 115: 1029-1041.

Kuchel H., Williams K.J., Langridge P. et al. (2007b) Genetic dissection of grain yield in bread wheat. II. QTL by environment interaction. Theor Appl Genet 115: 1015-1027.

Li S.S., Jia J.Z., Wei X.Y., Zhang X.C., Li L.Z., Chen H.M., Fan Y.D., Sun H.Y., Zhao X.H., Lei T.D., Xu Y.F., Jiang F.S., Wang H.G., Li L.H. (2007) A intervarietal genetic map and QTL analysis for yield traits in wheat. Mol Breed 20:167-178.

Paux E., Sourdille P., Salse J., Saintenac C., Choulet F., Leroy P., Korol A., Michalak M., Kianian S., Spielmeier W., Lagudah E., Somers D., Kilian A., Alaux M., Vautrin S., Bergès H., Eversole K., Appels R., Safar J., Simkova H., Dolezel J., Bernard M., Feuillet C. (2008). Science: 322: 101-104.

Quarrie S.A., Steed A., Calestani C., Semikhodskii A., Lebreton C., Chinoy C., Steele N., Pljevljakusic D., Waterman E., Weyen J., Schondelmaier J., Habash D.Z., Farmer P., Saker L., Clarkson D.T., Abugalieva A., Yessimbekova M., Turuspekov Y., Abugalieva S., Tuberosa R., Sanguineti M.C., Hollington P.A., Aragues R., Royo A., Dodig D. (2005) A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring x SQ1 and its use to compare QTLs for grain yield across a range of environments. Theor Appl Genet 110:865-880.

Quarrie S.A., Pekic Quarrie S., Radosevic R., Rancic D., Kaminska A., Barnes J.D., Leverington M., Ceoloni C., Dodig D. (2006) Dissecting a wheat QTL for yield present in a range of environments: from QTL to candidate genes. Journal of Experimental Botany 57:2627-2637.

Quraishi U.M., Abrouk M., Bolot S., Pont C., Throude M., Guilhot N., Confolent C., Prud S., Murigneux A., Charmet G., Salse J. (2009) Genomics in cereals: from genome-wide conserved orthologous set (COS) sequences to candidate genes for trait dissection. Funct. Integr. Genomics 9: 473-484.

Snape J.W., Foulkes M.J., Simmonds J., Leverington M., Fish L.J., Wang Y., Ciavarrella M. (2007) Dissecting gene x environmental effects on wheat yields via QTL and physiological analysis. Euphytica 154:401-408.

Sun X.Y., Wu K., Zhao Y., Kong F.M., Han G.Z., Jiang H.M., Huang X.J., Li R.J., Wang H.G., Li S.S. (2009) QTL analysis of kernel shape and weight using recombinant inbred lines in wheat. Euphytica 165:615-624.

Interaction entre stimulateurs de défense des plantes et génotypes de blé tendre dans la lutte contre la septoriose

Claude MAUMENE^{1*}, Ali SIAH², Marie-Éva ORS³, Gilles COULEAUD¹, Béatrice RANDOUX³, Pierre RIGOLLE⁵, Sameh SELIM⁴, Patrice HALAMA², Philippe REIGNAULT³

1 – ARVALIS - Institut du Végétal - Station expérimentale, 91720 BOIGNEVILLE

2 – ISA Lille - 48 Bd Vauban, 59046 LILLE Cedex

3 – ULCO - CS 80699, 62228 CALAIS cedex

4 – Lasalle-Beauvais - 19 rue Pierre Waguet, BP 30313, 60026 BEAUVAIS Cedex

5 – GIE CLUB 5 - 83 avenue de la Grande Armée, 75782 Paris Cedex 16

* **Coordinateur** : Claude MAUMENE, c.maumene@arvalisinstitutduvegetal.fr

1. Introduction

La septoriose causée par *Mycosphaerella graminicola* (anamorphe : *Zymoseptoria tritici*) est l'une des maladies les plus fréquentes et les plus nuisibles sur les cultures de blé. La lutte contre cette maladie repose essentiellement sur l'utilisation des fongicides et des ressources variétales. Bien que la résistance variétale réduise de façon significative la pression parasitaire au champ, la lutte chimique reste aujourd'hui le moyen le plus utilisé pour contrôler cette maladie. Le contexte environnemental actuel vise à réduire l'utilisation des produits phytosanitaires en agriculture (Ecophyto 2018, Agricultures: produisons autrement, ...). Dans un objectif de plus grande durabilité de l'agriculture, la recherche de nouvelles stratégies de lutte contre les maladies des plantes est fortement encouragée. L'utilisation des stimulateurs de défense des plantes (SDP) est une solution pouvant se substituer partiellement à la lutte chimique tout en permettant d'assurer une rentabilité optimale de la culture. Le mode d'action de ces produits diffère de celui des pesticides conventionnels car ils n'agissent pas directement sur le bio-agresseur, mais ils induisent son inhibition via la stimulation des réactions de défense de la plante. Dans ce contexte, le présent projet vise à étudier l'interaction SDP-cultivar sur le pathosystème blé-septoriose. Après un criblage initial de quatorze SDP, l'efficacité et le mode d'action contre la septoriose de trois d'entre eux ont été étudiés sur trois génotypes de blé tendre présentant des niveaux de résistance différents à la septoriose.

2. Matériel et méthodes

► Cultivars et SDP utilisés et conditions d'application

Trois cultivars de blé tendre sont utilisés : Alixan (sensible), Premio (moyennement sensible) et Altigo (résistant). Les travaux ont été conduits en conditions contrôlées (armoires de croissance), semi-contrôlées (serre) et de terrain (champ). Les inoculations artificielles en conditions contrôlées et semi-contrôlées ont été effectuées avec une souche française de *M. graminicola* (T01193) choisie après un criblage de huit souches sur les trois cultivars.

Au total, quatorze SDP ont été évalués sur les trois cultivars de blé, en conditions de laboratoire, pour leur niveau de protection vis-à-vis de la septoriose. Pour des raisons de confidentialité, les noms des produits ont été codés de FSOV1 à FSOV12 (Tableau 1). Tous les produits ont été fournis par des sociétés privées et sont majoritairement en cours de développement. Le criblage initial a été réalisé au laboratoire avec deux doses utilisées : une dose « forte » D1 (appliquée à la concentration d'une bouillie de 150 L/ha préparée sur la base de la dose/ha

préconisée au champ) et une dose « faible » D4 (ajustée pour appliquer au laboratoire une quantité par feuille se rapprochant de la quantité de substance active reçue par feuille au champ dans le cadre d'un traitement à la dose/ha préconisée). Une dose intermédiaire, D2 (=D1+D4/2), a été utilisée lors des travaux ultérieurs pour quatre SDP sélectionnés (FSOV2, FSOV7, FSOV8 et FSOV10). Les SDP retenus pour l'étude du mode d'action (FSOV2, FSOV7, FSOV10) ont été testés avec D3 (=D2+D4/2), une autre dose intermédiaire entre D2 et D4.

Pour les essais au champ, les SDP ont été appliqués à la dose préconisée par les fournisseurs dans les conditions du terrain (Tableau 1).

Tableau 1. SDP utilisés dans cette étude

Produit	Nom commercial ou principe actif	Dose préconisée
FSOV1	Acibenzolar-S-Methyl (Bion®)	0,06 Kg/ha
FSOV2	Nutri-phite® Excel	3 L/ha
FSOV2Bis	LBG01F34®/Etonan®	2 L/ha
FSOV3	SDP de synthèse	1 L/ha
FSOV3Bis	SDP de synthèse	1 L/ha
FSOV4	Iodus® 2 Céréales	0,5 L/ha
FSOV6	SDP de synthèse	1 L/ha
FSOV7	Extrait de <i>Trichoderma harzanium</i>	5 L/ha
FSOV8	Extrait de microorganismes	6,75 L/ha
FSOV8Bis	Extrait de microorganismes	3,75 L/ha
FSOV9	Acides organiques	3 L/ha
FSOV10	Chitosan	15 L/ha
FSOV11	Extrait de fenugrec	1,5 kg/ha
FSOV12	Polysaccharides issus d'algues vertes	5 L/ha

Les essais au champ ont été réalisés sur trois années (2011, 2012 et 2013) avec les trois cultivars. Le choix des produits pour chaque année est basé sur les résultats du criblage réalisé en serre. Sept produits ont été testés en 2011 (FSOV1, FSOV2, FSOV6, FSOV7, FSOV8, FSOV 8Bis et FSOV10), dix produits ou combinaisons de produits en 2012 (FSOV2, FSOV2Bis, FSOV7, FSOV8, FSOV8Bis, FSOV9, FSOV10, FSOV12, FSOV4+FSOV2 et FSOV4+FSOV10) et six produits ou combinaisons de produits en 2013 (FSOV2, FSOV2Bis, FSOV7, FSOV8, FSOV10 et FSOV4+FSOV2Bis). En complément, les produits FSOV7 (en 2011) et FSOV2Bis (en 2012 et 2013) ont été testés sur une trentaine de cultivars, afin de tester leurs interactions avec un plus grand nombre de génotypes de blé. Les essais ont été réalisés chaque année en répétition sur les sites de Florimond Desprez (Cappelle-en-Pévèle), Limagrain (Verneuil l'Etang), RAGT (Prémesques) et Syngenta (Orgerus). Pour chaque essai, le SDP a été appliqué seul ou en association à un programme fongicide intensif ou extensif.

► Essais de protection des SDP

Le niveau de protection conféré par les SDP en conditions de laboratoire a été évalué sur des plantes de blé au stade quatrième feuille sortante selon le protocole décrit par Siah *et al.* (2010a). Les traitements ont été réalisés à l'aide d'un pulvérisateur manuel à 48h avant inoculation avec la souche T01193. Trois pots de douze plantes (36 plantes) ont été utilisés pour chaque modalité. L'efficacité des produits sur les symptômes (% de surface foliaire avec nécroses ou chloroses) et la sporulation (densité des pycnides) a été mesurée sur la troisième feuille à 21 jours post-inoculation (jpi).

Les tests de protection au champ ont été réalisés dans la station expérimentale de Boigneville, sur des micro-parcelles de 21 m² (2m x 10,5m) organisées en bloc de Fischer en 2011 et 2012 et en Split-Plot en 2013. L'intensité de la maladie a été estimée sur 60 plantes/modalité toutes les une ou deux semaines en mesurant le % de surface foliaire malade sur les feuilles F1 (drapeau), F2 et F3. Le rendement (q/ha) a également été mesuré pour chaque modalité. Afin de mieux cerner l'apport protectif des SDP, trois modalités de référence à base de fongicides conventionnels ont été incluses dans les essais : une référence haute (une pleine dose⁽¹⁾ de Cherokee® (1,6 L/ha) en T1 et une pleine dose de Viverda® (1 L/ha) en T2), une référence intermédiaire (une pleine dose de Cherokee® en T1 et une demi-dose de Viverda® en T2) et enfin une référence basse (une demi-dose de Cherokee® en T1 et une demi-dose de Viverda® en T2). T1 correspond au stade Z32-37 pour les années 2011 et 2012 et Z37 pour l'année 2013. T2 correspond au stade Z45-55 pour l'année 2012 et Z40 pour l'année 2013. Pour les modalités SDP, les produits ont été appliqués seuls en T0 (stade Z30) et en association avec Cherokee® demi-dose en T1 suivi d'une application de Bell® à demi-dose en T2. Lors de l'année 2012, la dose de Cherokee® a été ajustée à 1,4 L/ha et la dose de Viverda® a été conservée à 1 L/ha. En 2011, seule une dose de 1,6 L/ha de Cherokee® a été appliquée. Le T2 a été supprimé compte tenu de la faible pression de septoriose due à la sécheresse de printemps.

(1) - Dans un souci de simplification nous avons qualifié de dose pleine, la dose la plus souvent utilisée en pratique. Elle est généralement inférieure à la dose d'autorisation de mise en marché. La demi-dose correspond ici à la moitié de cette dose pleine.

► Caractérisation du mode d'action des SDP

Effet biocide in vitro

L'éventuel effet biocide direct des SDP sur le champignon a été évalué *in vitro* selon les protocoles rapportés par Siah *et al.* (2010b). L'effet sur la germination des spores a été réalisé sur des boîtes de Petri. L'effet sur la croissance mycélienne a été déterminé sur des microplaques de 96 puits. Cinq concentrations sont utilisées pour chaque produit, obtenues par dilutions successives de 3 fois à partir de la concentration C1,

Effet sur le processus infectieux du champignon

L'effet *in planta* des SDP sur la germination des spores, la pénétration des feuilles et la colonisation du mésophylle a été estimé à 1, 5 et 21 jours post-inoculation (jpi), respectivement, avec les méthodes décrites par Siah *et al.* (2010a). Trois segments foliaires issus de pots différents sont utilisés pour chaque modalité. Cent événements cytologiques sont comptés au microscope sur chaque segment pour déterminer les pourcentages de spores germées, de tubes germinatifs donnant lieu à un événement de pénétration (stomatique et direct), de cavités sous-stomatiques colonisées et de cavités sous-stomatiques colonisées avec pycnides.

Effet sur les CWDE du champignon

L'effet des SDP sur les enzymes de dégradation des parois cellulaires (CWDE) produites *in planta* par le champignon (xylanases, glucanases et protéases) a été évalué à 1, 5, 11, 17 et 21 jpi. Les dosages ont été effectués selon les techniques décrites par Siah *et al.* (2010a) pour l'activité xylanase, Douaiher *et al.* (2007) pour l'activité glucanase et Hellweg (2003) pour l'activité protéase. Une biomasse de 2,5 g de feuilles a été utilisée pour chaque modalité.

Induction des activités PO et PAL du blé

L'induction des activités peroxydase (PO) et phénylalanine ammonia-lyase (PAL) par les SDP a été quantifiée sur les trois cultivars à 12, 24, 48, 60 et 72 heures après traitement (hat) selon les méthodes de Mitchell *et al.* (1994) pour la PO et Reglinski *et al.* (1994) pour la PAL.

Trois feuilles issues de pots différents sont utilisées pour chaque modalité.

Induction des gènes de défense du blé

Neuf gènes de défense ont été suivis à 12, 24, 48, 60 et 72 heures post-inoculation (hpi) pour leur niveau d'expression après application des SDP : *pr1* (pathogenesis related protein1), *chit2* (chitinase 2), *gluc* (β -1,3-glucanase), *lox* (lipoxygénase), *aos* (allene oxide synthase), *pal* (phénylalanine ammonia lyase), *chs* (chalcone synthase), *pox2* (peroxydase 2) et *oxo* (oxalate oxydase). Les codes d'accès GenBank pour ces gènes sont HQ848391, AB029935, DQ090946, U32428, AY196004, AY005474, AY286097, X85228 et AJ556991, respectivement. Les gènes de référence utilisés sont *tub6* (β -tubuline 6) et *gapdh* (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) dont les codes d'accès GenBank sont U76897 et AF251217. Six feuilles issues de pots différents sont utilisées pour chaque modalité.

Analyses des données

L'ensemble des expérimentations réalisées au laboratoire a été répété au minimum deux fois dans le temps. Les résultats sont exprimés en calculant la moyenne entre ces répétitions. Deux modalités témoins sont incluses dans les essais : une modalité témoin non traitée inoculée (nTi) utilisée pour les tests de protection, les colorations cytologiques et pour les tests CWDE et une modalité témoin non traitée non inoculée (nTnI) utilisée pour les tests CWDE et d'induction des enzymes et gènes de défense.

L'effet biocide direct *in vitro* des SDP a été déterminé en calculant la concentration inhibant 50 % de la germination des spores ou de la croissance mycélienne (CI₅₀). Les notations phénotypiques au champ ont été synthétisées pour chaque modalité en calculant la moyenne des AUDPC (*area under disease progress curve*) pour les feuilles F1, F2 et F3. La comparaison des différentes modalités pour l'ensemble des paramètres a été réalisée avec le test ANOVA de Tukey à $P = 0,05$ avec le logiciel Xlstat, sauf pour les niveaux de sporulation qui ont été comparés avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis à $P = 0,05$. L'analyse des modalités au champ a été effectuée avec le test ANOVA de Tukey à l'aide du logiciel R.

La corrélation entre les différents paramètres étudiés au laboratoire a été déterminée avec le test de corrélation de Spearman à l'aide de Xlstat.

3. Résultats et discussion

► Efficacité de protection des SDP en conditions de laboratoire

Le comportement des trois cultivars vis-à-vis de la souche T01193 en conditions non traitées a été conforme à leurs

niveaux de résistance rapportés précédemment par Arvalis-Institut du Végétal (Figure 1). Altigo se distingue de Premio et Alixan par ses faibles niveaux de symptômes, alors que Premio se différencie d'Alixan par son faible niveau de sporulation.

Aucun SDP n'a montré une efficacité significative avec la dose D4. En revanche, sur les quatorze SDP criblés avec la dose D1 sur les trois cultivars, en conditions contrôlées et semi-contrôlées, six ont montré des efficacités de protection significatives sur la septoriose (FSOV2, FSOV7, FSOV8, FSOV8Bis, FSOV9 et FSOV10). Cette efficacité a été observée à la fois sur les symptômes et la sporulation et sur les trois cultivars. FSOV2, FSOV7, FSOV8, FSOV8Bis, FSOV9 et FSOV10 ont réduit respectivement les symptômes de 58, 96, 50, 39, 100 et 70 % sur Alixan, de 78, 96, 78, 13, 100 et 88 % sur Premio et de 69, 97, 80, 71, 100 et 44 % sur Altigo. Les analyses statistiques ont révélé la présence d'interactions SDP-cultivar significatives pour certains produits, comme FSOV2, FSOV8 et FSOV8Bis (*résultats non présentés*). Bien qu'il ait été le plus efficace, FSOV9 a présenté une forte phytotoxicité qui se manifestait par un raccourcissement de la taille des plantes. Un test supplémentaire de ce produit avec une demi-dose de D1 a permis de supprimer cet effet phytotoxique tout en gardant une bonne efficacité sur la maladie (-72 % sur Alixan, -81 % sur Premio et -82 % sur Altigo). Toutefois, FSOV9 a également présenté *in vitro* un effet biocide direct très élevé, avec des CI_{50} de 0,003 mL/L (D1/6666) et 0,009 mL/L (D1/2222) pour la germination des spores et la croissance mycélienne, respectivement. Ce produit a ainsi été écarté pour la suite des travaux pour cette raison.

Pour les autres produits, FSOV8 et FSOV8Bis n'ont montré aucun effet biocide direct, alors que FSOV7, FSOV2 et FSOV10 ont présenté avec la dose D1 des effets très faibles, faibles et élevés, respectivement (*résultats non présentés*).

Afin de vérifier l'effet dose sur l'efficacité des SDP, les produits FSOV2, FSOV7, FSOV8 et FSOV10 ont été criblés ultérieurement avec trois doses (D1, D2 et D3) sur les trois cultivars, avec l'utilisation d'une référence fongicide conventionnelle (Opus®). Les résultats ont mis en évidence un effet dose pour les quatre produits ainsi que pour le fongicide utilisé (Tableau 2). La dose D1 a été la plus efficace sur les trois cultivars, alors que la dose D3 a été la moins efficace. La dose D2 a présenté des efficacités intermédiaires sur les trois cultivars. Le produit FSOV8 a présenté des niveaux d'efficacité avec D1 moins importantes que lors des essais préliminaires. Cela pourrait-être dû au lot ou à la stabilité biochimique du produit, dans la mesure où ce produit est d'origine naturelle.

Tableau 2. Pourcentage de réduction des symptômes en serre sur les trois cultivars après traitement avec le fongicide Opus®, FSOV2, FSOV7, FSOV8 et FSOV10 à D1, D2 et D3.

	Alixan			Premio			Altigo		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3
Opus®	99	93	7	99	86	13	99	99	20
FSOV2	79	63	2	73	67	9	15	38	10
FSOV7	96	94	8	96	93	34	97	95	25
FSOV8	0	18	0	27	3	12	39	14	0
FSOV10	70	20	0	88	40	6	44	38	12

► Efficacité de protection des SDP au champ

En 2011, la pression septoriose a été faible à l'échelle nationale, due à la très faible pluviométrie de cette année. Peu de différences ont ainsi pu être mises en évidence entre les différentes modalités testées. Seul FSOV10, sur la variété Alixan,

a induit une efficacité supérieure à celle de la référence basse et équivalente à celle de la référence haute (*résultats non présentés*). Des symptômes de phytotoxicité (taches nécrotiques) ont été observés avec FSOV10 sur Alixan, et surtout Altigo. Par ailleurs, le produit FSOV7 testé sur d'autres génotypes de blé n'a montré aucune efficacité (*résultats non présentés*).

En 2012, la pression de la maladie a été significative sur les trois variétés.

En considérant l'ensemble des variétés, en particulier l'AUDPC sur l'étage foliaire F2, mais également le rendement, seule la combinaison FSOV2+FSOV4 appliquée en association avec les fongicides s'est régulièrement distinguée statistiquement de la référence basse (*résultats non présentés*).

Si l'on considère exclusivement l'AUDPC sur la F2, aucun des autres produits testés ne s'est statistiquement différencié de la référence basse.

En revanche, FSOV2, FSOV7, FSOV8Bis et FSOV10+FSOV4, appliqués également en association avec les fongicides, ont présenté des niveaux de rendement statistiquement supérieurs à la référence basse sur la variété Alixan uniquement.

FSOV2Bis, FSOV4 et FSOV9, appliqués seuls (sans être associés à un traitement conventionnel), n'ont produit aucune efficacité. Pour l'année 2012, le dispositif expérimental mis en place n'était pas adapté pour tester statistiquement l'interaction génotype-SDP.

Pour les essais réalisés en 2012 avec FSOV2Bis sur un plus grand nombre de cultivars, aucune interaction SDP-cultivar significative n'a été obtenue. Seules des différences entre les conduites culturales extensive et intensive ont été détectées (*résultats non présentés*).

En 2013, la pression septoriose a été significative et a permis d'évaluer l'efficacité des SDP sur chacune des variétés et de tester l'interaction SDP-variété. Les données AUDPC pour les trois dernières feuilles, mais également date par date pour chacune des feuilles, ont été traitées en Split-Plot.

Les résultats ont mis en évidence des effets variété et traitement significatifs pour la plupart des variables analysées (Tableau 3). L'interaction est principalement significative sur F1 (AUDPC et notation du 04 et du 09 juillet) sur F2 (notation du 04 juillet) et sur F3 (notation du 10 juin).

Tableau 3. Niveaux de signification statistique des effets variété, traitement SDP et de leur interaction sur le contrôle de la septoriose. ***, **, * : significatif à $P = 0,001$, $0,01$ et $0,05$, respectivement. - : non significatif.

	Effet variété	Effet traitement	Effet variété x traitement
AUDPC F1	***	***	***
AUDPC F2	**	***	-
AUDPC F3	**	***	-
F1 09 juillet	***	***	***
F1 04 juillet	***	***	**
F1 25 juin	**	*	-
F2 09 juillet	**	***	-
F2 04 juillet	**	***	*
F2 25 juin	*	***	-
F2 10 juin	*	***	-
F3 25 juin	-	*	-
F3 10 juin	**	**	*
F3 28 mai	-	-	-

Pour mieux apprécier la structure des interactions, les taux de réduction de l'AUDPC de chaque SDP par rapport à la référence basse et par rapport à la référence intermédiaire ont été calculés pour chaque variété et pour étage foliaire (Tableaux 4 et 5).

Tableau 4. Variation de l'AUDPC sur les différents étages foliaires et du rendement (Rdt) en % par rapport à la référence basse (en gras et grisé les réductions significatives à $P = 0,05$ et en gras les augmentations significatives à $P = 0,05$).

		FSOV2	FSOV2Bis	FSOV7	FSOV8	FSOV10	FSOV2Bis + FSOV4
Alixan	F1	-11	+8	-2	+2	-30	+44
	F2	-10	-3	+2	+5	-31	+18
	F3	-25	-28	-17	+4	-34	-8
	Rdt	+1,5	+1,1	-0,8	+0,9	+2,0	-1,1
Premio	F1	-25	-22	-9	-2	-36	+67
	F2	-23	-12	-36	-8	-39	-8
	F3	0	+1	-23	-5	-25	-9
	Rdt	+1,9	+1,5	+1,2	-0,1	+0,8	+0,6
Altigo	F1	-47	-34	-49	-34	-71	-4
	F2	-27	-28	-35	-18	-46	-16
	F3	-21	-18	-24	-20	-34	-15
	Rdt	+1,0	+1,7	+1,8	+1,6	+2,3	+0,5

Tableau 5. Variation de l'AUDPC sur les différents étages foliaires et du rendement (Rdt) en % par rapport à la référence intermédiaire (en gras et grisé les réductions significatives à $P = 0,05$ et en gras les augmentations significatives à $P = 0,05$).

		FSOV2	FSOV2Bis	FSOV7	FSOV8	FSOV10	FSOV2Bis + FSOV4
Alixan	F1	+23	+49	+36	+41	-3	+101
	F2	+9	+17	+23	+26	-18	+42
	F3	-15	-18	-6	+18	-22	+4
	Rdt	+1,3	+0,8	-1,1	+0,6	+1,7	-1,4
Premio	F1	+91	+97	+131	+149	+63	+331
	F2	+21	+32	+8	+36	+5	+36
	F3	+17	+19	-10	+11	-12	+7
	Rdt	+0,1	-0,2	-0,6	-1,9	-1,0	-1,1
Altigo	F1	+33	+65	+29	+67	-27	+143
	F2	+5	+4	-5	+19	-21	+22
	F3	-12	-8	-16	-11	-26	-6
	Rdt	-0,5	+0,3	+0,3	+0,2	+0,9	-0,9

Dans l'ensemble, la variété Altigo a présenté la plus forte réponse aux SDP, suivie d'Alixan puis Premio (Tableau 4). Pour ce qui est des produits, FSOV10 a été le plus régulier sur l'efficacité par rapport à la référence basse, particulièrement sur Altigo et Alixan (Tableau 4). Son efficacité n'est généralement pas significativement différente de la référence intermédiaire (Tableau 5). L'association FSOV2Bis + FSOV4 n'a présenté aucune efficacité significative sur les trois cultivars (Tableaux 4 et 5).

Les efficacités de FSOV2, FSOV2Bis, FSOV7 et FSOV8 semblent pour une part variété-dépendantes (Tableau 4). Sur l'étage foliaire F1, ces quatre produits apportent une protection significative par rapport à la référence basse uniquement sur Altigo (Tableau 4). Ce résultat indique la présence, dans les conditions du champ, d'interactions SDP-cultivar entre ces produits et les variétés utilisées. Aucun effet marqué des SDP sur le rendement n'a été constaté. Pour les quatre expérimentations de 2013 réalisées avec

FSOV2Bis sur un plus grand nombre de cultivars, la pression de maladie a été particulièrement faible et/ou tardive. La protection fongicide appliquée au T2 avec Viverda® 1 L/ha semble avoir « lissé » les effets potentiels de la protection SDP appliquée au T0 et en association au T1.

Caractérisation des interactions SDP-cultivar dans les conditions de la serre

Après les travaux de criblage, trois SDP (FSOV2, FSOV7 et FSOV10) sont sélectionnés et étudiés pour leur interaction avec les trois cultivars et pour leurs modes d'action. Ces travaux de caractérisation sont réalisés avec la dose D3. FSOV7 a significativement réduit l'intensité de la maladie (symptômes et sporulation) sur les trois cultivars, alors que FSOV2 l'a réduit sur seulement Alixan et Altigo et FSOV10 sur seulement Premio et Altigo (Figure 1). Ces résultats confirment la présence d'interactions SDP-cultivar significatives vis-à-vis de la septoriose entre certains SDP et génotypes de blé tendre étudiés. Les trois produits présentent globalement une même tendance d'effets sur les symptômes et la sporulation (Figure 1).

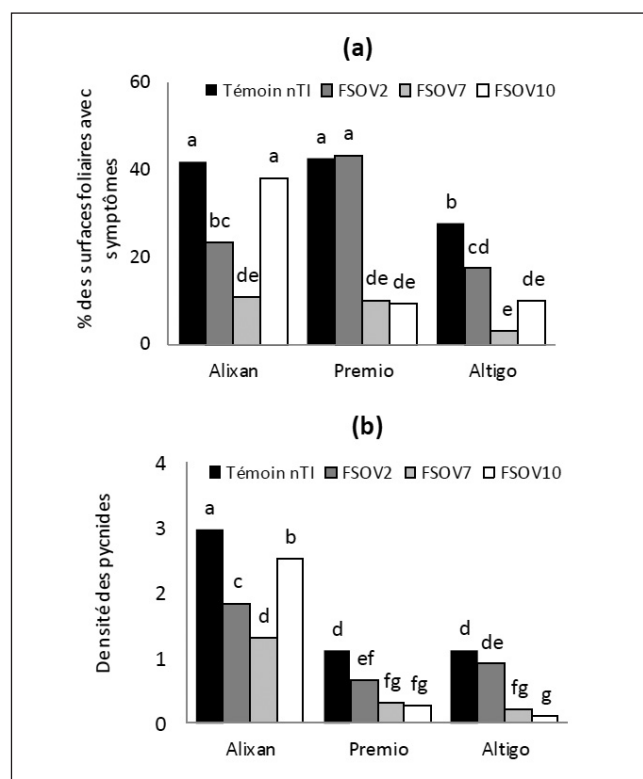


Figure 1. Efficacité de protection en serre de FSOV2, FSOV7 et FSOV10 sur les symptômes (a) et la sporulation (b) à 21 jpi sur les trois cultivars. Les moyennes taguées avec une lettre commune ne sont pas significativement différentes avec le test de Tukey à $P = 0.05$.

► L'efficacité de protection est liée à la colonisation, mais pas à la germination et la pénétration

L'effet des SDP sur le processus infectieux du champignon a été évalué sur les trois cultivars. Aucun produit n'a montré d'effet direct sur la germination des spores, à l'exception de FSOV10 qui a légèrement réduit le taux de spores germées sur Premio et Altigo (Tableau 6). Ce résultat corrobore l'effet biocide direct partiel décelé *in vitro* pour ce produit. Aucune corrélation entre la germination des spores et l'efficacité de protection n'a été détectée (Tableau 7).

La pénétration des feuilles par le champignon a également été influencée par les produits. Le taux de pénétration a

significativement été diminué par FSOV2 et FSOV7 sur Alixan et par FSOV10 sur Premio (Tableau 6). Globalement, le taux de pénétration ne semble pas être corrélé avec les efficacités de protection (Tableau 7).

Un effet marqué sur la colonisation a été observé sur les trois cultivars pour au moins un des produits (Tableau 6).

Cet effet est en liaison avec les taux de protection obtenus avec les SDP. Les niveaux de protection les plus élevés correspondent dans l'ensemble aux niveaux de colonisation les plus faibles (Figure 1, Tableau 6). L'analyse de corrélation a confirmé cette tendance et a montré une forte association entre le taux de colonisation et l'efficacité de protection (Tableau 7).

Tableau 6. Effet de FSOV2, FSOV7 et FSOV10 sur le processus infectieux du champignon sur les trois cultivars. Les moyennes d'une même colonne taguées avec une lettre commune se sont pas significativement différentes avec le test de Tukey à $P = 0.05$.

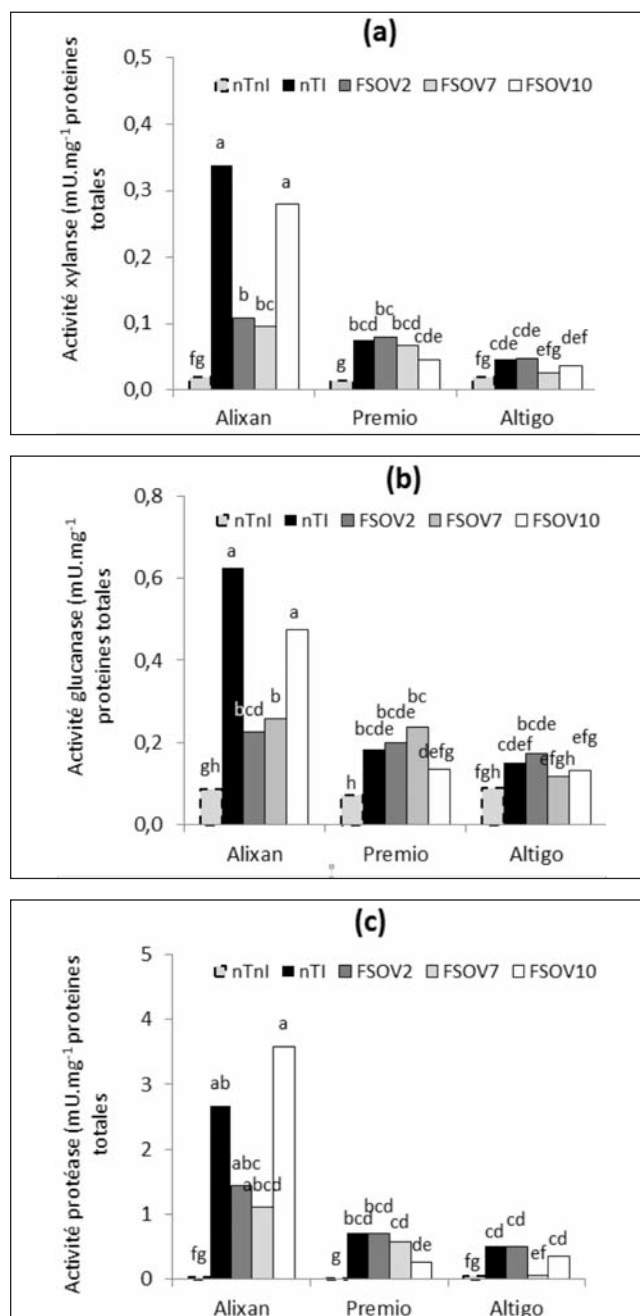
		% SG	% SGP	% CC	% CCP
Alixan	nTI	69 ^{abc}	53 ^{ab}	79 ^a	19 ^{abc}
	FSOV2	72 ^{ab}	35 ^{cd}	77 ^{ab}	12 ^{abc}
	FSOV7	73 ^a	33 ^{cd}	55 ^{bcd}	13 ^{abc}
	FSOV10	59 ^{abc}	41 ^{abcd}	76 ^{abc}	25 ^a
Premio	nTI	71 ^{ab}	55 ^a	72 ^{abc}	24 ^{ab}
	FSOV2	58 ^{abc}	44 ^{abc}	68 ^{abc}	13 ^{abc}
	FSOV7	66 ^{abc}	44 ^{abc}	31 ^{ef}	4 ^c
	FSOV10	53 ^c	38 ^{bcd}	33 ^{def}	7 ^{bc}
Altigo	nTI	73 ^a	39 ^{abcd}	73 ^{abc}	5 ^c
	FSOV2	68 ^{abc}	53 ^{ab}	53 ^{cde}	4 ^c
	FSOV7	70 ^{abc}	33 ^{cd}	28 ^f	4 ^c
	FSOV10	55 ^{bc}	25 ^d	40 ^{def}	3 ^c

SG : spores germées ; SGP : spores germées donnant lieu à un événement de pénétration ; CC : cavités stomatiques colonisées ; CCP : cavités stomatiques colonisées avec pycnides ; nTI : témoin non traité inoculé.

► L'efficacité de protection est liée à la réduction des activités CWDE fongiques

L'impact des SDP sur les activités xylanase, glucanase et protéase du champignon a été étudié sur les trois cultivars. La production de ces activités sur les témoins non traités inoculés débute à 17 jpi, au moment du basculement du parasite vers la phase nécrotrophe (*résultats non présentés*). Le taux de ces activités ensuite augmente jusqu'à 21 jpi, avec une cinétique qui coïncide avec la sporulation. Une production marquée de ces activités a été obtenue seulement sur Alixan (Figure 2), due probablement à son niveau de sensibilité et donc de sporulation plus élevé comparativement à Premio et Altigo (Figure 1). Le traitement avec les SDP a réduit le niveau d'activité de ces enzymes sur Alixan, avec une réduction des symptômes et de la densité de pycnides. Seuls les produits efficaces (FSOV2 et FSOV7) ont également réduit le niveau de ces activités enzymatiques (Figure 1, Figure 2). Une corrélation élevée entre l'efficacité de protection et la réduction de ces trois activités a été mise en évidence (Tableau 7).

Figure 2. Effet de FSOV2, FSOV7 et FSOV10 sur les activités xylanase (a), glucanase (b) et protéase (c) à 21 jpi sur les trois cultivars. nTI, témoin non traité non inoculé. Les moyennes taguées avec une lettre commune se sont pas significativement différentes selon le test de Tukey à $P = 0.05$.



	Symptômes 21 jpi	Sporulation 21 jpi
Germination 1 jpi	0,13	0,12
Pénétration 5 jpi	0,36	0,29
Colonisation 21 jpi	0,81	0,71
Xylanase 21 jpi	0,45	0,64
Glucanase 21 jpi	0,46	0,72
Protéase 21 jpi	0,45	0,73

Tableau 7. Coefficient de corrélation entre le niveau de la maladie (symptômes et sporulation) et les différentes composantes du pouvoir pathogène du champignon en conditions traitées inoculées. En gras les valeurs élevées

Absence de corrélation entre les activités PO et PAL et l'efficacité de protection

L'induction de la PO et de la PAL par les trois SDP a été suivie lors des premières heures après traitement, en conditions non inoculées. Seul FSOV10 a induit la PO (Figure 3). L'induction de cette activité prend effet de façon très précoce, dès 12 hat. Toutefois, aucune corrélation n'a été obtenue entre l'induction de cette activité et l'efficacité de protection (*résultats non présentés*). Pour la PAL, FSOV10 est le SDP qui a également induit les quantités les plus élevées de cette enzyme. Comme pour la PO, aucune association entre l'induction de la PAL et l'efficacité de protection n'a été observée (*résultats non présentés*).

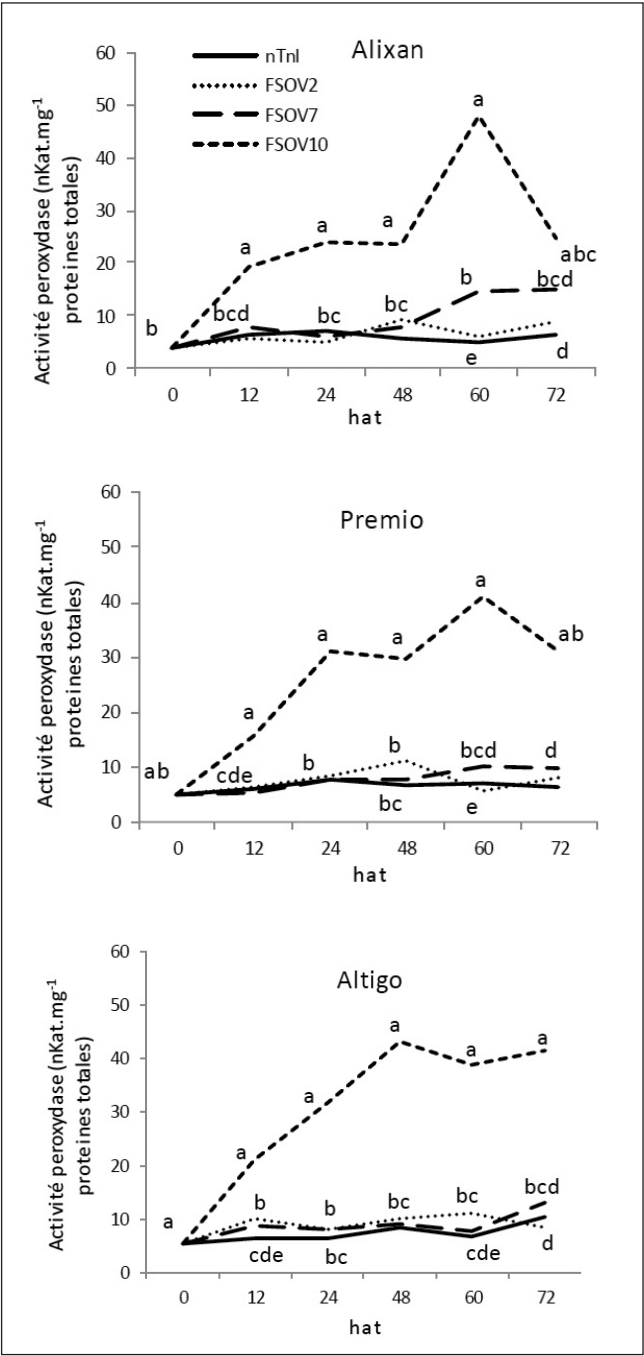


Figure 3. Elicitation de l'activité peroxydase chez les trois cultivars après traitement avec FSOV2, FSOV7 et FSOV10 en conditions non inoculées. nTnl, témoin non traité non inoculé. Les moyennes de chaque jour après traitement taguées avec une lettre commune se sont pas significativement différentes selon le test de Tukey à P = 0.05.

► Absence d'association entre le niveau d'induction des dix gènes de défense étudiés et l'efficacité de protection

L'expression de dix gènes de défense a également été évaluée lors des premières heures après traitement, en conditions non inoculées. Premio et Altigo ont présenté pour tous les gènes étudiés des niveaux d'expression intrinsèque plus élevés comparativement à Alixan (Tableau 8). Le niveau d'expression entre Premio et Altigo varie en fonction du gène considéré.

Tableau 8. Effet cultivar sur l'expression relative des dix gènes de défense étudiés en conditions non traitées non inoculées. Les moyennes d'une même ligne taguées avec une lettre commune se sont pas significativement différentes selon le test de Tukey à P = 0.05.

	Alixan	Premio	Altigo
<i>pr1</i>	1 ^b	10.9 ^a	9.1 ^a
<i>chit2</i>	1.0 ^b	2.1 ^a	1.4 ^b
<i>gluc</i>	1.0 ^b	9.9 ^a	10.8 ^a
<i>lox</i>	1.0 ^b	1.5 ^a	1.2 ^{ab}
<i>aos</i>	1.0 ^b	3.6 ^a	4.5 ^a
<i>pal</i>	1.0 ^b	2.7 ^a	1.4 ^b
<i>chs</i>	1.0 ^a	0.6 ^b	0.6 ^b
<i>pox2</i>	1.0 ^b	2.1 ^a	0.8 ^b
<i>oxo</i>	1.0 ^b	5.1 ^a	1.5 ^b

Tous les produits ont induit l'expression des gènes étudiés sur les trois cultivars, mais le niveau d'expression, ainsi que le moment de l'induction, dépendent grandement du produit et du cultivar considéré (Figure 4). Les profils d'expression des gènes *pox2* et *pal* (codant pour une PO et une PAL, respectivement) ne semblent pas suivre les profils d'activité enzymatique obtenus pour la PO et la PAL (Figure 3, Figure 4). Cette différence peut s'expliquer par le fait que la PO et la PAL sont des activités enzymatiques déterminées de façon polygénique. Aucune liaison entre le profil d'expression des gènes et l'efficacité de protection ne peut être constatée (Figure 1, Figure 4).

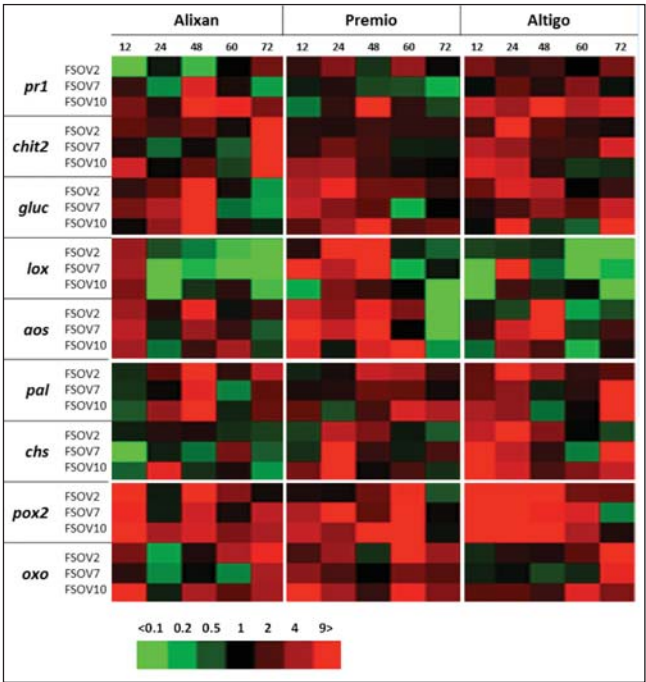


Figure 4. Expression relative des dix gènes de défense étudiés sur Alixan, Premio et Altigo après traitement avec FSOV2, FSOV7 et FSOV10 en conditions non inoculées. Les chiffres indiquent l'heure après traitement.

4. Conclusions

Ce projet a permis d'étudier pour la première fois le fonctionnement des SDP sur le pathosystème blé-septoriose. Sur les quatorze SDP criblés en conditions de laboratoire sur les trois cultivars, seuls six présentent des efficacités significatives, et dose-dépendantes, vis-à-vis de la maladie.

Certains produits ont été écartés de l'étude à cause de leur forte activité biocide directe, comme FSOV9, qui a présenté un niveau d'effet direct comparable à celui des pesticides conventionnels. Une irrégularité d'efficacité a été observée pour certains produits, comme FSOV8, due probablement à son principe actif d'origine naturelle, potentiellement instable.

Au champ, l'efficacité des produits dépend de leur insertion ou non dans un programme conventionnel. Aucun SDP appliqué seul n'a montré une quelconque efficacité. Seuls ceux associés à un traitement fongicide ont apporté un complément d'efficacité, mais le plus souvent non significatif statistiquement. La nécessité de recourir à des associations avec des produits conventionnels pour améliorer la performance des SDP au champ est ainsi à souligner.

Les résultats ont décelé des interactions SDP-cultivar significatives à la fois en serre et au champ. En serre, ces interactions ont été marquées pour FSOV2 et FSOV10, alors qu'au champ, elles l'ont été pour FSOV2, FSOV2Bis, FSOV7 et

FSOV8 principalement sur l'étage foliaire F1. Ces résultats soulignent l'importance du choix variétal dans l'utilisation des SDP pour lutter contre la septoriose du blé, mais également pour évaluer l'activité de nouveaux candidats.

La caractérisation du mode d'action de FSOV2, FSOV7 et FSOV10 a montré que l'efficacité de ces produits est fortement corrélée à certains paramètres caractérisant le développement du champignon comme la colonisation du mésophile, la sporulation et la production de CWDE (xylanases, glucanases et protéases). En revanche, l'efficacité de ces SDP ne semble pas être associée, ni à l'élicitation des activités PO et PAL, ni à l'expression des gènes *pr1*, *chit2*, *gluc*, *lox*, *aos*, *pal*, *chs*, *pox2* et *oxo* chez le blé.

L'absence d'activité biocide directe associée à une efficacité *in planta* pour FSOV2 et FSOV7 à la dose D3 suggère cependant que leur efficacité est due à une stimulation de réactions de défense de la plante qu'il reste à caractériser.

Pour FSOV10, son efficacité pourrait être liée à un double effet (direct et indirect), qui pourrait expliquer ses bons résultats procurés au champ dans certaines conditions. Les travaux engagés sur ce pathosystème ont permis de souligner la complexité des interactions en jeu et invite à une caractérisation complémentaire du mode d'action des trois produits sélectionnés pour identifier les voies de défense associées à leur efficacité.

Références bibliographiques

Douaiher M.N., Nowak E., Dumortier V., Durand R., Reignault P., Halama P., (2007) *Mycosphaerella graminicola* produces a range of cell wall-degrading enzyme activities in vitro that vary with the carbon source. *European Journal of Plant Pathology* 117, 71-79.

Hellweg M. (2003) Molecular biological and biochemical studies or proteolytic enzymes of the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *PhD thesis*, Münster University, Germany.

Mitchell H.J., Hall J.L., Barber M.S. (1994) Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Plant Physiology* 104: 551-556

Reglinski T., Lyon G.D., Newton A.C. (1994) Assessment of the ability of yeast-derived elicitors to control barley powdery mildew in field. *New Phytologist* 101: 1-10.

Siah A., Deweer C., Duyme F., Sanssené J., Durand R., Halama P., Reignault Ph. (2010a). Correlation of in planta endo-beta-1,4-xylanase activity with the necrotrophic phase of the hemibiotrophic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Pathology* 59: 661-670.

Siah A., Deweer C., Morand E., Reignault Ph., Halama P. (2010b) Azoxystrobin resistance of French *Mycosphaerella graminicola* strains assessed by four in vitro bioassays and by screening of G143A substitution. *Crop Protection* 29: 737-743.

Tian S.M., Weinert J., Zaho Q.H. (2009) Correlation between cell wall-degrading enzymes in wheat leaves infected by *Septoria tritici* and disease severity. *Canadian Journal of Plant Pathology* 31: 387-392.

Développement d'un nouvel outil d'aide à la sélection de variétés de blé résistant à la Septoriose

Olivier ROBERT^{1*}, Amir M. GOHARI⁴, Valérie LAURENT¹, Laure DUCHALAIS², Delphine HOURCADE³, Denis BEGHIN¹, Ellen GOUEMAND¹, Sarrah Ben M'BAREK⁴, Gert H. J. KEMA⁴

1 – Bioplante-Florimond Desprez, BP41, 59242 Cappelle en Pévèle

2 – Bioplante-R2n, Route d'Épincy, 28150 Louville la Chenard

3 – ARVALIS-Institut du végétal, 3 rue Joseph & Marie Hackin, 75116 Paris

4 – Plant Research International, Biointeractions and Plant Health, P.O. Box 16, 6700 AA Wageningen, The Netherlands

* **Coordinateur** : Olivier ROBERT, olivier.robert@florimond-desprez.fr

1. Introduction

La septoriose est une maladie du blé qui peut être provoquée par deux champignons : *Zymoseptoria tritici* et *Stagonospora nodorum*. *Z. tritici* est désormais devenue majoritaire en Europe et provoque souvent de fortes diminutions du rendement. Cette maladie du blé est donc classée parmi les plus dévastatrices en Europe de l'Ouest et chaque année environ 300 millions d'euros sont dépensés pour lutter contre ce parasite.

Malgré la disponibilité de 18 gènes de résistance et leur application potentielle en sélection (Goodwin, 2007), la lutte contre la maladie est actuellement réalisée principalement par des fongicides. Toutefois, seuls les azoles et les strobilurines sont disponibles et leur efficacité sur les populations naturelles présentes au champ se réduit un peu plus chaque année. Ce phénomène a été récemment confirmé par le développement de résistances aux strobilurines chez *Z. tritici* et de sa propagation rapide dans toute l'Europe (Sierotzki *et al.* 2005). De même, cette diminution de l'efficacité des strobilurines est associée à celle de certains azoles (Fraaije *et al.* 2007). La chute de l'efficacité de ces matières actives représente une menace pour l'agriculteur qui veut maintenir durablement un bon rendement en blé. Ainsi, il est probable que l'amélioration génétique de la résistance sera la principale réponse durable à l'évolution de cette maladie.

Z. tritici a un style de vie dimorphique. Le champignon prolifère en conidiogénèses blastiques dans des conditions riches alors que la croissance est filamenteuse dans des conditions pauvres en éléments nutritifs et sur les tissus foliaires. L'infection commence par la formation des hyphes qui entrent par les stomates des feuilles de blé, sans différencier les structures infectieuses (Kema *et al.* 1996; Mehrabi *et al.* 2006; Keon *et al.* 2007). Le développement ultérieur est biotrophe, intercellulaire et asymptomatique pendant environ 8 jours. Puis, le processus de développement est rapide et nécrotrophe, impliquant une abondante dégradation de la paroi cellulaire. Ce phénomène a été une source de spéculation sur un rôle actif potentiel pour les composés toxiques au cours de la pathogenèse (Kema *et al.* 1996 ; Perrone *et al.* 2000 ; Keon *et al.* 2007) notamment parce qu'elle aboutit à la dégradation massive des tissus du mésophylle. Cette dégradation de la partie interne de la feuille permet l'augmentation rapide de la biomasse fongique et la formation de pycnides, les organes de fructification asexuée caractéristiques de taches nécrotiques macroscopique (Kema *et al.* 1996 ; Duncan et Howard, 2000; Sierotzki *et al.* 2005).

De récentes découvertes sur les pathogènes nécrotrophes du blé *Pyrenophora tritici-repentis* (Ptr) et *Stagonospora nodorum*, ont montré que les toxines protéiques sont des déterminants importants de la pathogénicité (Friesen *et al.* 2007, 2008). Ces toxines ont des cibles sur les chloroplastes ce qui expliquerait

leur inductibilité à la lumière (Manning *et al.* 2009). Ces constatations ont conduit à la détermination d'un modèle inverse du modèle gène pour gène avec des toxines sélectives de l'hôte (HSTs) et des gènes de sensibilité aux toxines de la plante hôte.

Ainsi, l'équipe de Gert Kema a identifié la première toxine (MgTox1) issue du substrat de culture de l'isolat IPO323 de Septoriose (*Z. tritici*). Cette toxine, lorsqu'elle est infiltrée sur des feuilles, provoque des nécroses foliaires qui sont similaires aux symptômes foliaires habituellement observés avec des tests de résistance. Par contre, les résultats sont observables 4 jours après infiltration alors que 3-4 semaines sont nécessaires pour interpréter le test de résistance classique. Outre la rapidité d'obtention des symptômes nécrotiques, cette méthode semble présenter d'autres avantages comme une fiabilité accrue de l'évaluation de la résistance (ou plus exactement de l'absence de sensibilité) des plantes. Un autre avantage en faveur de l'utilisation des toxines est qu'elles pourraient ne pas être spécifiques de chaque isolat : L'utilisation des toxines serait alors un nouvel outil pertinent pour estimer facilement et précocement la résistance des futures variétés.

Ainsi, dans ce projet, nous nous proposons pour développer et valider ce nouvel outil :

- 1) D'identifier les protéines SSP (small secreted proteins) constituant la toxine MgTox1 et d'identifier celle(s) qui jouent un rôle dans la pathogénicité (nécroses foliaires) de la septoriose.
- 2) De valider au champ les protéines SSP sur un panel de génotypes résistants et sensibles.

2. Matériel et méthodes

► Identification des protéines SSP de la toxine de l'isolat IPO323

Analyse Bioinformatique de l'ADNc de *Z. tritici*

Un des critères appliqué à la sélection des protéines candidates concerne leur taille qui doit être inférieure à 300 acides aminés. Un travail de recherche de gènes candidats ainsi que l'utilisation de l'algorithme de PexFinder pour de l'analyse d'EST ont été utilisés pour identifier des protéines SSP candidates. Les protéines sans motif GPI ni domaine trans-membranaire et qui sont riches en cystéine ont été retenues. Un tri des protéines candidates a été complété par une comparaison de séquences avec celles de la base de données EST accessibles via l'interface JGI genome (<http://genome.jgi-psf.org/Mycgr3.home.html>).

Analyse Protéomique

Le substrat de culture de IPO323 a été obtenu après culture de l'isolat IPO323 en boîte de Petri sur un milieu V8/PDA pendant

5 jours. Le pathogène est ensuite agité en milieu liquide à 27°C (100rpm) pendant 3 jours. Le substrat de culture est ensuite filtré par du papier Whatmann, puis avec un filtre 0,45µm et dialysé en utilisant des tubes 7KDa.

La séparation et l'identification des protéines SSP du substrat de culture ont été obtenues grâce à une analyse par chromatographie liquide à échange d'ion de type Fast Performance liquid Chromatography (FPLC).

Analyse QTL

L'analyse QTL a été effectuée sur une population de 163 isolats de *Z. tritici* issus du croisement IPO323 x IPO95052. Ces isolats ont été phénotypés sur les variétés de blé dur Volcani447, Zenati, Bouteille, Bidi17 et sur les variétés de blé tendre blé tendre Shafir, Gerek, Taichung29, Obelisk. L'isolat IPO323 est avirulent sur les lignées de blé dur mais développe des symptômes sur le blé tendre tandis que c'est l'inverse pour IPO95052.

► Test de résistance au champ

Matériel Végétal

Treize variétés ont été testées (Tableau I) durant les 3 années du programme sur 3 sites avec 2 répétitions : Boigneville (Arvalis), Bersée (F. Desprez) et Louville la Chenard (R2n).

Toxine

Le substrat de culture de IPO323 contenant un ensemble de protéines SSP a été produit et testé la première année du programme. La protéine SSP127 a été testée les deux années suivantes selon plusieurs protocoles d'inoculation. Un témoin négatif avec de l'eau a été inoculé pour vérifier que la méthode d'inoculation n'était pas responsable des nécroses foliaires.

Méthode d'inoculation

Les méthodes d'inoculation appliquées ont été :

- l'infiltration : La toxine est injectée sous pression dans la feuille à l'aide d'une seringue.
- L'abrasion : La toxine est appliquée au doigt (ganté) avec de la célite (1g/10ml). Une pression modérée et un mouvement de va et vient sont appliqués afin d'abimer la cuticule de la feuille.
- Le badigeonnage : Les feuilles sont recouvertes de la toxine par un badigeonnage au pinceau. Avec cette méthode la feuille était soit laissée intacte, soit pliée dans le sens transversal.

Pour les 3 méthodes, les limites de diffusion de la toxine dans la feuille sont marquées au feutre indélébile.

Dix feuilles par génotype, par répétition, par méthode d'inoculation et par lieu ont ainsi été inoculées. Les feuilles ont été prélevées 4 jours après inoculation et ont été numérisées pour noter le pourcentage de surface nécrosée par rapport à la surface inoculée avec le logiciel SCANAREA.

3. Résultats et discussion

► Identification des protéines SSP

Analyse Bioinformatique

266 protéines SSP avec une taille inférieure à 300 acides aminés et plusieurs résidus cystéine ont été identifiées. Vingt quatre de ces protéines prédites possèdent un domaine trans-membranaire en dehors de la séquence du peptide signal et ont été exclues de la liste. Après avoir confronté nos données de séquence avec celles de la base de donnée EST JGI, la liste de protéines candidates a été réduite à 68. Cependant, dix protéines SSP

supplémentaires ont été ajoutées pour leurs caractéristiques particulières comme leur richesse élevée en cystéine. Au final, ce sont 78 protéines SSP qui ont été retenues comme effecteurs candidats de la pathogénicité de la septoriose.

Analyse Protéomique

Sur les 78 gènes codant pour les protéines SSP, 93% sont issues de données EST obtenues soit sous conditions *in vitro* soit sous condition *in planta*. Nous avons analysé leur activité par RT-qPCR pour déterminer leur profil d'expression durant la phase de pathogénicité. Tous les gènes ont été transcrits *in planta* et leur profil correspond clairement aux différentes phases d'infection (biotrophe (2-4 dpi⁽¹⁾), nécrotrophe (>8 dpi) ou de transition entre les deux phases (8 dpi)). Ainsi, les gènes sont surexprimés durant la phase biotrophe pour un groupe de protéines SSP (incluant SSP142) (entre 2 et 4 dpi) (figure 1a). Dans le groupe de la SSP15, les gènes ne sont surexprimés que durant la phase de transition entre la phase biotrophe et la phase nécrotrophe (à 8 dpi) (figure 1b). Les gènes surexprimés durant la phase nécrotrophe du champignon (comme SSP44) le sont à partir de 8 dpi avec un pic à 8 ou 12 dpi puis ce phénomène est suivi d'une décroissance de l'activité des gènes jusqu'à 20 dpi (figures 2a et 2b).

Au final 42% des protéines SSP analysées sont spécifiquement produits durant la phase nécrotrophe, tandis que 21% sont synthétisés durant les deux phases (biotrophe et nécrotrophe). 18% sont faiblement transcrits durant tout le processus d'infection.

(1) dpi : jour après inoculation

Validations des protéines SSP15 et SSP18

Comme ces deux protéines ont été détectées en grandes quantités à 8 dpi (SSP15 : 120x et SSP18 : 13x), il nous semblait intéressant de valider leur action comme effecteur de pathogénicité en inhibant les gènes codant pour ces protéines. Ainsi, trois mutants « knock-out » indépendants ont été générés par recombinaison homéologue, pour chacun des deux gènes. Les mutants et le type sauvage de IPO323 montrent des symptômes foliaires similaires en serre (figure 3) à 21 dpi sur 12 variétés de blé : ce résultat prouve que ces deux protéines ne sont pas des effecteurs de pathogénicité.

Analyse QTL

Sept QTL ont été identifiés sur les chromosomes 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 13 de *Z. tritici* (tableau II). Un QTL majeur ressort sur le chromosome 5 en expliquant jusqu'à 48.5% de la variance phénotypique. 84 gènes prédits colocalisent au niveau de ce QTL.

► Tests au champ

Comparaison entre notation visuelle / notation numérisée des symptômes

La numérisation des feuilles inoculées nous semblait importante pour traiter un grand nombre d'échantillons. Si le gain de temps offert par la numérisation des feuilles est toute relative, cette numérisation présente l'avantage de pouvoir revenir sur les observations *à posteriori*. La corrélation observée ($R^2=0.76$) entre les deux types de notation permet d'envisager l'utilisation de l'outil numérique pour la quantification des symptômes.

Pertinence du protocole d'inoculation

En 2013, le protocole d'abrasion est celui qui provoque, en moyenne, les symptômes les plus importants. Celui-ci est suivi de l'infiltration par seringue (Figure 4). Le badigeonnage au pinceau (avec ou sans pliure de la feuille) ne permet pas d'obtenir des symptômes aussi importants qu'avec les deux autres méthodes. Toutefois, selon l'année et le lieu, le protocole

d'inoculation des protéines sur les feuilles varie en efficacité, prouvant ainsi qu'aucune des techniques d'inoculation utilisées n'est pas réellement applicable au champ.

Effet de la Toxine et relation avec la résistance variétale

L'observation des symptômes obtenus par infiltration ou abrasion révèle un polymorphisme entre les variétés. Ce polymorphisme n'est absolument pas corrélé avec le niveau de résistance des variétés à la septoriose qui a été observé au champ. Ainsi la variété Nogal qui est très résistante présente des symptômes importants avec la toxine chez R2n (abrasion) alors que la lignée FD3 qui normalement est très sensible à la septoriose au champ présente peu de symptômes avec la toxine chez Arvalis (abrasion). Pour compléter cette absence de relation entre le niveau de résistance variétale à la septoriose et les symptômes obtenus avec la toxine, nous avons observé, dans plusieurs cas, des nécroses foliaires supérieures avec de l'eau comparé à la toxine. Il est clair que le protocole d'inoculation de la toxine et l'application par l'expérimentateur de ces protocoles jouent un rôle significatif dans l'apparition des symptômes puisque l'application du témoin neutre (eau) peut provoquer des symptômes supérieurs à ceux observés avec la toxine. Au final, malgré deux années de test, nous n'avons pas réussi à mettre au point un protocole fiable qui soit indépendant de l'effet expérimentateur et qui donne des résultats cohérents avec le niveau de résistance des variétés à la septoriose (et plus particulièrement à IPO323).

4. Conclusions

La synthèse entre l'analyse bioinformatique, l'analyse protéomique et l'analyse de QTL a permis d'identifier 18 protéines SSP qui sont des candidates comme effecteurs de la pathogénicité de *Z. tritici*. Ces protéines sont secrétées soit durant la phase biotrophe, soit durant la phase nécrotrophe (ou durant les deux phases) de développement du champignon. Ces résultats représentent une avancée importante dans la connaissance des mécanismes de pathogénicité de ce champignon.

Concernant le test de résistance au champ, nous avons rencontré deux problèmes majeurs :

- Nous n'avons réussi à produire qu'une seule protéine en quantité suffisante pour nos tests au champ durant la durée du programme.
- La méthode d'inoculation de la protéine ou du substrat de culture reste perfectible car elle est trop sujette aux variations dues à l'expérimentateur ou à la méthode d'inoculation.

Ainsi, si la production de nombreuses protéines SSP semble pouvoir être solutionnée rapidement, la mise au point d'un protocole d'inoculation fiable reste un problème majeur qui devra être résolu par des mises au point supplémentaires si nous voulons pouvoir utiliser ces effecteurs pour des tests prédictifs de la résistance variétale à la septoriose.

Tableau I : Liste des 13 variétés ou lignées utilisées pour les tests au champ.

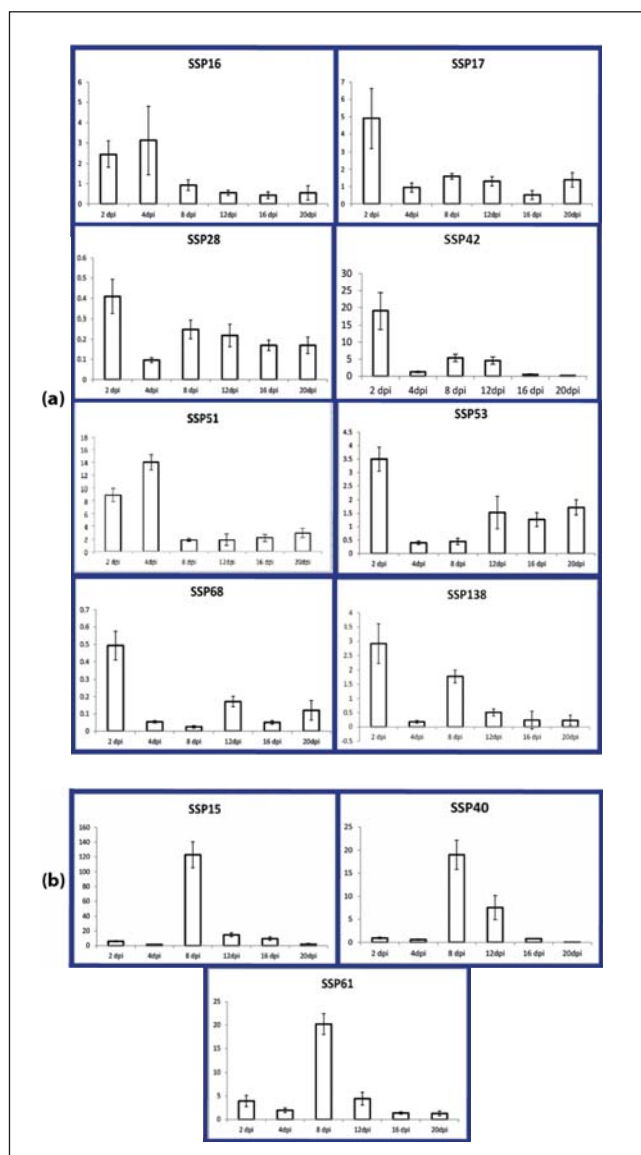
Variétés	
Apache	Nogal
Baguette11	Nuage
Balance	Robigus
Bermude	SE11
Cordiale	Soissons
FD12	Timber
FD3	

Tableau II : Tableau récapitulatif des QTL identifiés dans la population d'isolats issue du croisement IPO323/IPO95052.

Chromosomes	QTL	Source (LOD score)	Variance (%)	Nombre de gènes prédicts
Chromosome 2	QTL-P1	BT Taichung 29 (LOD $\geq$ 5.70)	15.1	586
Chromosome 3	QTL-P2	BT Shafir (LOD $\geq$ 3.22)	8.6	69
Chromosome 4	QTL-P3	BD Volcani 447 (LOD $\geq$ 7.64)	12.4	581
Chromosome 5	QTL-P4.1	BT Shafir (LOD $\geq$ 7.20)	23.5	84
	QTL-P4.2	BD Zenati Bouteille (LOD $\geq$ 14.83)	45.2	84
	QTL-P4.3	BD Volcani (LOD $\geq$ 16.60) 447	47.9	84
	QTL-P4.4	BD Bidi 17 (LOD $\geq$ 17.12)	48.5	84
	QTL-P5	BT Obelisk (LOD $\geq$ 4.80)	16.7	...
Chromosome 6	QTL-P6	BD Bidi 17 (LOD $\geq$ 3.33)	6.2	158
Chromosome 7	QTL-P7	BT Obelisk (LOD $\geq$ 3.76)	10.9	24
	QTL-P8.1	BD Bidi 17 (LOD $\geq$ 2.91)	5.4	...
	QTL-P8.2	BD Zenati Bouteille (LOD $\geq$ 3.89)	7.7	...
Chromosome 13	QTL-P9.1	BT Gerek (LOD $\geq$ 3.06)	14.1	106
	QTL-P9.2	BT Taichung 29 (LOD $\geq$ 7.61)	28.3	106

BT : Blé Tendre, BD : Blé Dur.

Figure 1 : Niveau d'expression des gènes codant pour les protéines SSP : Cas des gènes exprimés durant la phase biotrophe (a) et durant la transition biotrophe / nécrotrophe (b).



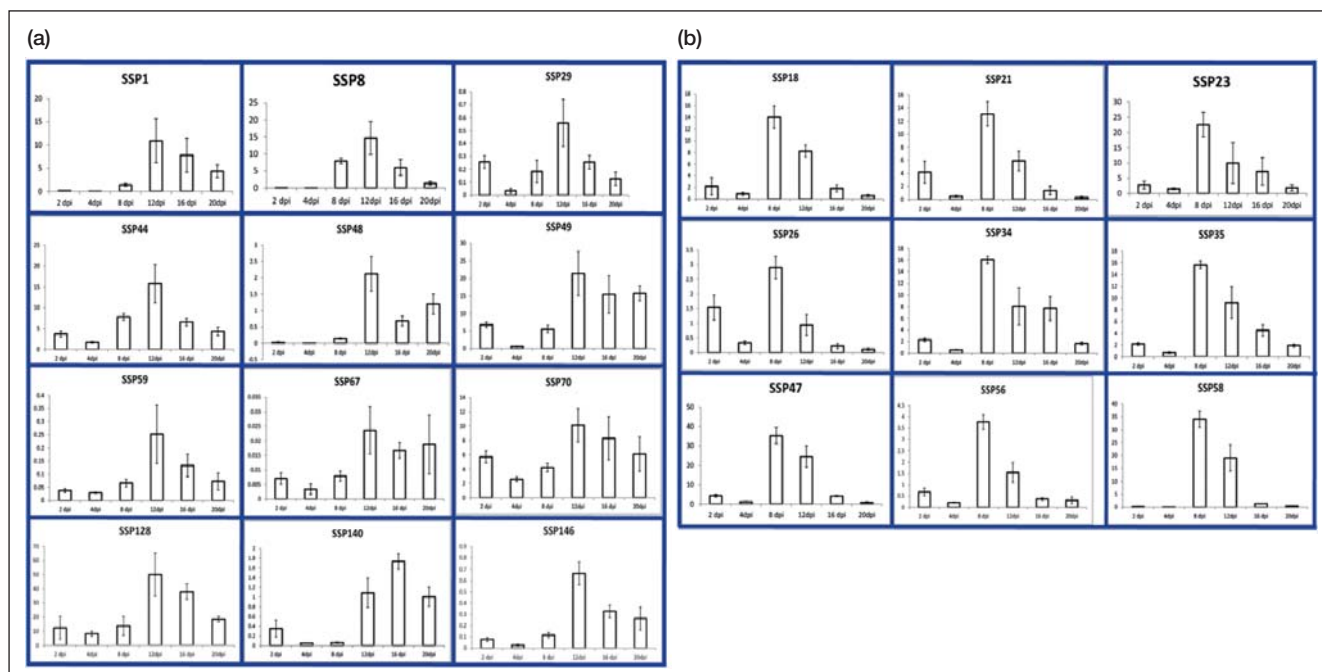


Figure 2 : Niveau d'expression des gènes codant pour les protéines SSP : Cas des gènes exprimés durant la phase nécrotrophe avec un pic à 12 dpi (a) ou à 8 dpi (b).

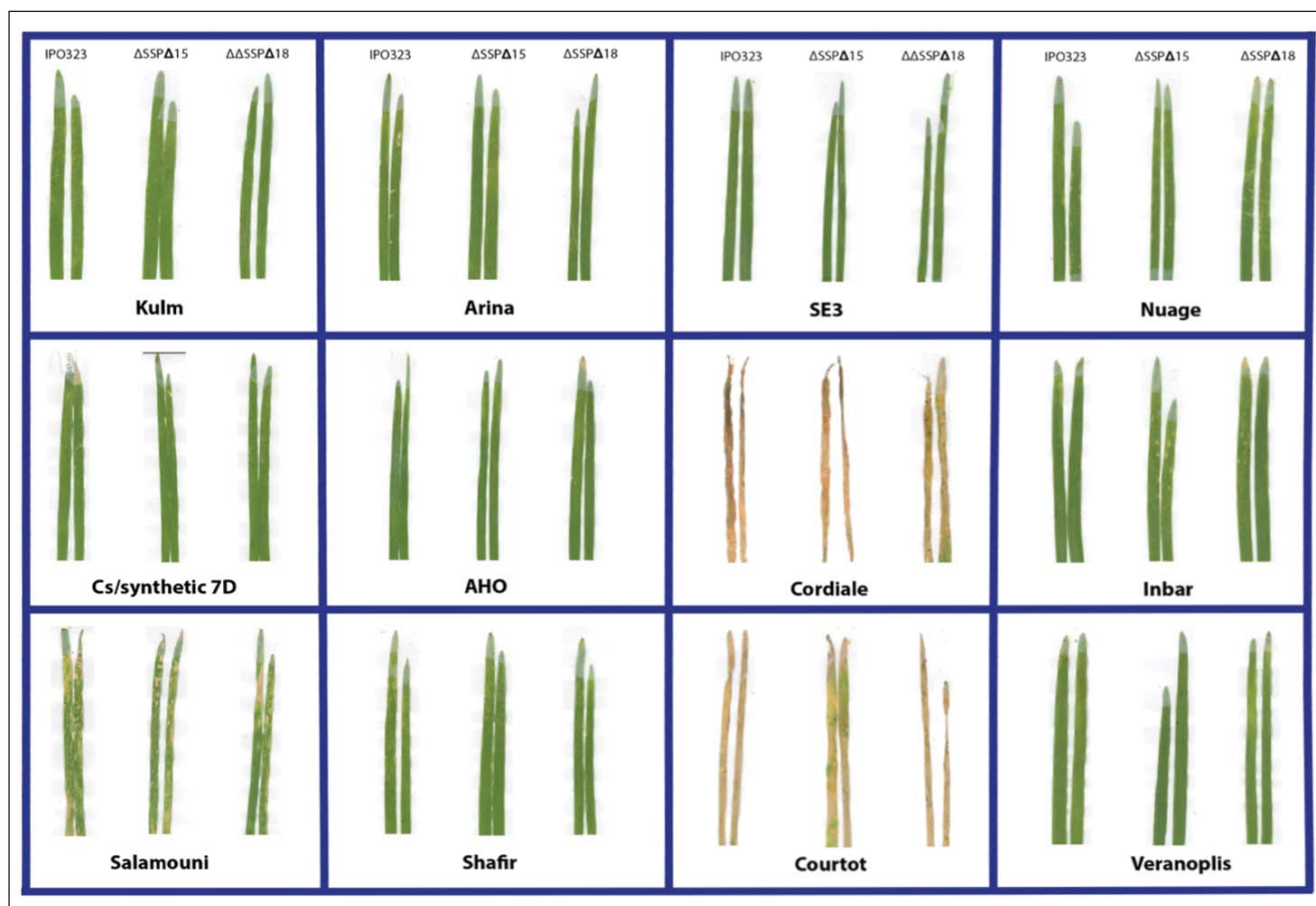
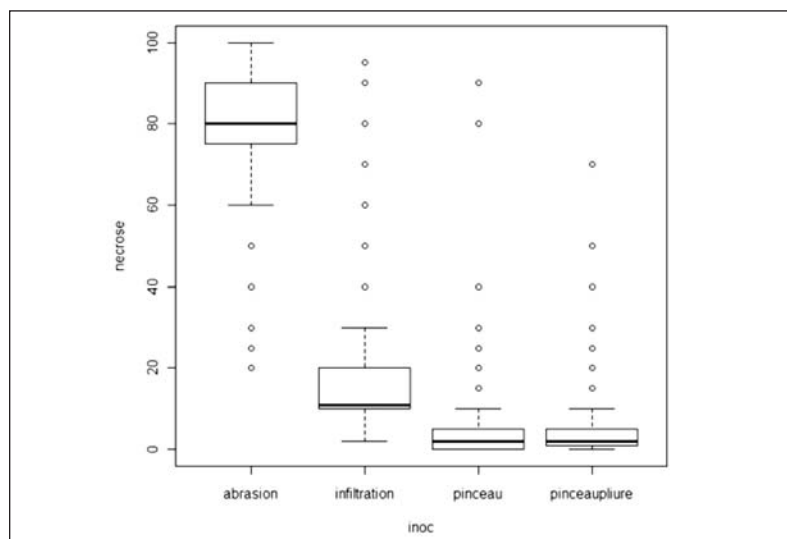


Figure 3 : Développement des symptômes en serre 21 jours après inoculation avec les isolats de *Z. tritici* IPO323 et les mutants IPO323 Δ SSP15 and IPO323 Δ SSP18 sur 12 lignées de blé.

Figure 4 : Comparaison des symptômes de nécrose obtenus aux champs par abrasion, infiltration, badigeonnage au pinceau avec ou sans pliure transversale (R2n, 2012).



Références bibliographiques

Duncan, K. E., and Howard, R. J. (2000). Cytological analysis of wheat infection by the leaf blotch pathogen, *Mycosphaerella graminicola*. *Mycol. Res.* 104:1074-1082.

Fraaije, B.A., Cools, H.J., Kim, S.-H., Motteram, J., Clark, W.S. and Lucas, J.A. (2007). A novel substitution I381V in the sterol 14 -demethylase (CYP51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. *Molec. Pl. Pathol.* 8: 245-254

Friesen, T.L., Meinhardt, S.W., Faris, J.D. (2007). The *Stagonospora nodorum*-wheat pathosystem involves multiple proteinaceous host-selective toxins and corresponding host sensitivity genes that interact in an inverse gene-for gene manner. *Plant Journal.* 51:681-692.

Goodwin, S.B. (2007). Back to basics and beyond: increasing the level of resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. *Australas. Plant Pathol.* 36: 532-538.

Kema, G. H. J., Yu, D. Z., Rijkenberg, F. H. J., Shaw, M. W., and Baayen, R. P., (1996). Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology* 86: 777-786.

Keon, J., Antoniw, J., Carzaniga, R., Deller, S., Ward, J.L., Baker, J.M., Beale, M.H., Hammond-Kosack, K., and Rudd, J.J. (2007). Transcriptional adaptation of *Mycosphaerella graminicola* to programmed cell death (PCD) of its susceptible wheat host. *Molec. Plant-Microbe Interact.* 20: 178-193.

Manning, V.A., Chu, A.L., Steevens, J.E., Wolpert, T.J. and Ciuffetti, L.M., (2009). A Host-Selective Toxin of *Pyrenophora tritici-repentis*, *Ptr ToxA*, Induces Photosystem Changes and Reactive Oxygen Species Accumulation in Sensitive Wheat. *Molec. Plant-Microbe Interact.* 22: 665-676.

Mehrabi, R., Zwiers, L.H., De Waard, M., and Kema, G.H.J. (2006). MgHog1 regulates dimorphism and pathogenicity in the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:1262-1269.

Perrone, G., Logrieco, A., Kema, G.H.J., Ritieni, A. and Bottalico, A., (2000). Phytotoxic activity of *Mycosphaerella graminicola* culture filtrates. In: *Phytosfere'99 - Highlights in European Plant Biotechnology Research and Technology Transfer* (Eds. G.E. de Vries and K. Metzlaß). *Proceedings of the Second European Conference on Plant Biotechnology*, held in Rome Italy, from 7 to 9 June 1999. Pp. 39-45.

Shetty, N.P., Mehrabi, R., Lütken, H., Haldrup, A., Kema, G.H.J., Collinge, D.B., and Jørgensen, H.J.L. (2007). Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. *New Phytologist* 174: 637-647.

Sierotzki, H., Pavic, L., Hugelshofer, U., Stanger, C., Cleere, S., Windass, J., and Gisi, U. (2005). Dynamics of *Mycosphaerella graminicola* populations in response to selection by different fungicides. In: *Modern fungicides and antifungal compounds II*, eds Lyr H., Russell PE, Dehne HW, Gisi U, and Kuck KH, *14th International Reinhardtsbrunn Symposium, AgroConcept*, Bonn, Verlag Th. Mann Gelsenkirchen, pp 89-101.

Étude et identification de facteurs de résistance à la cécidomyie chez le blé tendre

Olivier ROBERT^{1*}, Cristobal UAUY², Pierre TAUPIN³, Laure DUCHALAIS⁴, Patrice SENELLART⁵, Jayne STRAGLIATI⁶

1 – BIOPLANTE - FLORIMOND DESPREZ – 3 rue Florimond Desprez, 59242 Cappelle en Pévèle

2 – JOHN INNES CENTRE - Colney Lane, NR4 7UH, Norwich, UK

3 – ARVALIS – ARVALIS Institut du Végétal, Service Génétique et Protection des Plantes, Station Expérimentale, 91720 Boigneville

4 – R2n – Route d'Epincy, 28150 Louville La Chenard

5 – SYNGENTA – Ferme de Moyencourt, 78910 Orgerus

6 – LIMAGRAIN EUROPE – 5 rue de l'égalité, 28130 Chartainvilliers

* **Coordinateur** : Olivier ROBERT, olivier.robert@florimond-desprez.fr

1. Introduction

La cécidomyie orange, *Sitodiplosis mosellana*, est un parasite commun du blé tendre qui prend de plus en plus d'importance chaque année dans l'hémisphère nord. Ce parasite est responsable de pertes sévères de rendement car ses larves se nourrissent des grains en cours de formation causant ainsi leur échaudage et des problèmes de germination sur pieds. De plus, la présence de ce parasite peut faciliter l'attaque secondaire de champignons comme la fusariose. Ainsi, ce parasite affecte aussi bien le rendement que la qualité du grain récolté. En 2004, lors d'une pandémie de cécidomyie au Royaume Uni, les pertes de rendement occasionnées par ce parasite furent estimées à 6% (soit environ 1 million de tonnes). Ces pertes étaient accompagnées de la diminution de la qualité du grain, malgré l'épandage d'insecticides sur 500 000 ha de blé (Ellis *et al.*, 2009). La cécidomyie a une distribution spatiale très inégale et les infestations varient d'année en année en fonction des conditions climatiques, ce qui rend difficile toute prédiction des risques et complique la tâche des sélectionneurs pour obtenir des variétés résistantes.

Un polymorphisme variétal a été observé pour la résistance à la cécidomyie pour des variétés de blé tendre issues de différents pays. Cependant, il y a eu très peu d'études sur la génétique de ces sources de résistance. L'étude la plus importante démontre que la résistance à la cécidomyie des variétés canadiennes est conditionnée par la présence d'un gène majeur unique, appelé *Sm1*, présent sur le chromosome 2BS du blé tendre. Un marqueur moléculaire PCR (Wm1) a été développé (Thomas *et al.* 2005). Il est lié au gène de résistance *Sm1* et aurait pu être utilisé en sélection assistée par marqueurs par de nombreux sélectionneurs si celui-ci ne s'était pas révélé perfectible dans de nombreux cas.

Ainsi, le John Innes Centre (JIC) a montré, avant le début de ce programme, que trois variétés résistantes au Royaume-Uni possèdent le gène *Sm1* de la résistance cécidomyie (Ellis *et al.*, 2009) et que le marqueur Wm1, associé au gène *Sm1*, n'était pas fiable pour l'ensemble de matériel génétique britannique (par exemple, certaines variétés sensibles amplifient la bande marqueur de Wm1; Oakley *et al.*, 2005). Par ailleurs, dans le cadre d'un projet parallèle (Simmonds *et al.*, 2008), le JIC a établi la colinéarité entre le blé, le riz et *Brachypodium* dans la région chromosomique où est localisé le gène *Sm1*. Ces connaissances, associées aux résultats d'un phénotypage précis sur du matériel pertinent (fourni par les partenaires du programme), va permettre d'identifier plusieurs marqueurs SNP étroitement liés au gène *Sm1* et également, de révéler l'existence probable de nouvelles sources de résistance à la cécidomyie pour plusieurs lignées.

2. Matériel et méthodes

► Matériel végétal et tests de résistance

Matériel Végétal

96 lignées ou variétés ont été semées (Tableau I) durant les 3 années du programme sur au moins 3 sites avec 3 répétitions : Orgerus (Syngenta), Allemagne (Limagrain) et Rothwell, Lincolnshire (JIC, UK), Cobrieux (F. Desprez) et Louville la Chenard (R2n). Durant la seconde année, 2 populations de 40 lignées ayant potentiellement d'autres sources de résistance ont également été testées.

Quarante huit lignées BC4 quasi-isogéniques (NILs) ont également été produites avec une introgression du chromosome 2BS portant le gène *Sm1* (intervalle compris *Xgwm614-Xwmc25*) de Robigus dans Shamrock. Ainsi, durant la 3^{ème} année du programme une population composée de 48 lignées recombinantes homozygotes BC3F2 et BC4F2 issues du croisement Robigus x Shamrock (RxS) ont été phénotypées pour la cartographie fine du gène *Sm1*.

Test de résistance

Des pièges à insectes (cuvettes jaunes et/ou pièges à phéromone) ont été disposés entre les rangs, placés de manière à ce que le bord supérieur de la cuvette soit au niveau de la base des épis. Chaque cuvette est remplie avec de l'eau additionnée de 5 à 10 gouttes de détergent «type liquide vaisselle». Pour avoir une bonne précision de la courbe de vol, les pièges ont été relevés tous les 2 jours. Les épis ont été prélevés dans les deux lieux où la pression parasitaire a été la plus forte et la plus longue. Les 30 épis (10 épis par répétition) par variétés ont été envoyés à Arvalis pour le comptage des larves de cécidomyie. Par ailleurs des notations de caractère morphologiques comme la compacité de l'épi, l'extrusion d'anthère, la hauteur des plantes et la précocité à l'épiaison ont été notées.

► Génotypage et développement de marqueurs moléculaires

Génotypage

Le marqueur Wm1 a été testé sur l'ensemble du matériel selon le protocole décrit par Thomas *et al.* (2005). Les marqueurs SNP développés sont de type KASPar. Le protocole d'amplification appliqué à ces marqueurs est le protocole standard préconisé par KBioScience.

Recherche de nouveaux marqueurs

A partir de 89 marqueurs contigs du IWGSC assignés au chromosome 2BS, 52 nouveaux marqueurs SNP ont été

identifiés sur le panel de 96 lignées et 17 marqueurs SNP ont été cartographiés sur le chromosome 2BS (et 35 sont potentiellement sur ce chromosome). Les 17 marqueurs SNP ont été comparés au marqueur Wm1 (lié à *Sm1*) sur les 96 génotypes.

Par ailleurs, une étude RNAseq a été menée à partir de l'extraction d'ARN de feuilles des lignées BC4 NILs. Les échantillons ont été séquencés avec un séquenceur illumina HiSeq2000. Les reads NGS (Next Generation Sequencing) ont été alignés sur le bras chromosomique de la séquence de référence avec une attention portée sur les contigs du chromosome 2BS ayant une homologie avec les gènes de *Brachypodium*.

3. Résultats et discussion

► Tests de résistance au champ

Les cécidomyies capturées nous ont permis de connaître la cinétique de la pression parasitaire sur chaque lieu. Celle-ci a toujours été forte dans au moins deux lieux ce qui nous a permis d'effectuer la synthèse de résultats sur 2 ou 3 lieux chaque année. Les périodes de vol de cécidomyies pouvaient ne pas couvrir la totalité de la période de floraison des lignées mais en associant les résultats des différents lieux, nous avons obtenu une pression parasitaire couvrant toute la durée de floraison du matériel végétal.

Le matériel testé a révélé des niveaux de résistances très différents allant de totalement résistant à très sensible (64 larves / épi) et cela sur plusieurs lieux et sur les 3 années du programme.

Ainsi en 2013, à Ouzouère le Marché, 33 lignées sont indemnes toutes larves, 35 lignées ont entre 0.01 à 1 larve par épi, 11 lignées ont de 1.1 à 5 larves par épi et 19 lignées ont de 5.1 à 30 larves par épi. Ainsi 70% du matériel testé offre un bon niveau de résistance à la cécidomyie. Ce nombre (69) important de variétés ou lignées résistantes provenant d'origines diverses, constitue un panel de validation qui permet d'évaluer la pertinence et la robustesse des marqueurs du gène *Sm1* lorsqu'il est présent dans différents fonds génétiques.

► Relation avec les caractères morphologiques

Les trois caractères phénotypiques qui ont été principalement étudiés sont la précocité, la hauteur des plantes, la compacité de l'épi et l'extrusion d'anthères. Il n'y a pas de corrélation entre ces caractères et le niveau de tolérance à la cécidomyie. Les seules corrélations significatives concernent la précocité d'épiaison / date de floraison et le nombre de larves par épi / le pourcentage d'épis infectés (Tableau II).

► Détection de nouveaux marqueurs moléculaires

Utilisation des contig IWGSC pour la détection de nouveaux marqueurs associés à la résistance

A partir de 89 marqueurs issus des contigs IWGSC assignés au chromosome 2BS, 52 nouveaux marqueurs SNP ont été caractérisés sur le panel de 96 lignées et 17 marqueurs SNP ont été cartographiés sur le chromosome 2BS. Les 17 marqueurs SNP ont été comparés au marqueur Wm1 (lié à *Sm1*) sur les 96 génotypes. Deux marqueurs OWBM6 et OWBM8 semblent être les plus proches de *Sm1* (et meilleurs que Wm1). En effet, les lignées avec l'allèle de résistance de Wm1 ont 38% d'épis infestés contre seulement 3.5% avec OWBM6 et 6% avec OWBM8 (alors que le pourcentage attendu avec *Sm1* est de 0%). Donc, même si ces deux marqueurs donnent de meilleurs résultats que le marqueur Wm1, ils donnent encore de résultats perfectibles (faux positifs) pour

certaines fonds génétiques (comme Shamrock, Cadenza et leurs descendants). Les lignées Oxebo, LG OBM 11-05 et LG OBM 11-06 ont le même haplotype « sensible » avec OWBM6 et OWBM8 alors que ces 3 lignées sont très résistantes : Soit ces 3 lignées ont une autre source de résistance, soit il y a eu une recombinaison entre le gène et les marqueurs (ce qui est peu probable).

Cartographie fine autour de *Sm1*

Nous avons testé une série de nouveaux marqueurs génétiques d'origines multiples sur les lignées NILs homozygotes. Nous avons utilisé autant de marqueurs que possible à partir des données KASPar générées dans le projet BBSRC CIRC afin de mieux définir la localisation chromosomique du gène *Sm1*. En utilisant ces marqueurs et le phénotypage disponible à partir de 2013, nous avons cartographié *Sm1* dans un intervalle entre les marqueurs SNP OWBM7 et OWBM9 (OWBM7 et OWBM9, Figure 1). Ces deux marqueurs présentent une forte homologie avec les gènes de *Brachypodium* (*Bradi5g01020* et *Bradi5g00850*). Ceci suggère que le gène *Sm1* est cartographié dans un intervalle correspondant à environ 20 gènes de *Brachypodium*.

Nous avons porté plus particulièrement notre attention sur les contigs de blé homologues aux gènes de *Brachypodium* *Bradi5g00810* et *Bradi5g00010* sachant que la carte génétique suggère une inversion entre les espèces dans cette région. Nous avons identifié plusieurs contigs de blé pour *Bradi5g00810*, *Bradi5g00790* / *Bradi5g00780* ; *Bradi5g00610* et *Bradi5g00570*. Seulement deux de ces contigs ont une couverture suffisante pour la détection de SNP et c'est pourquoi seulement deux SNP ont été convertis en marqueurs KASPar (OWBM2 et OWBM4). Ces deux marqueurs SNP ont été cartographiés comme complètement liés à *Sm1* sans qu'il soit possible d'identifier celui qui serait le plus proche physiquement du gène (Figure 1). En résumé, nous avons identifié et cartographié quatre marqueurs SNP qui co-ségrègent avec le gène *Sm1* dans l'intervalle génétique défini.

Analyse d'association avec l'ensemble des nouveaux marqueurs

Nous avons déjà identifié des marqueurs OWBM6 et OWBM8 comme associés à *Sm1*, bien que nous ne pouvions pas les cartographier dans la population RxS. Nous avons donc utilisé la carte iSelect récemment publiée par Wang *et al.* (2014) pour vérifier si ces marqueurs SNP y étaient présents. Nous avons constaté que les deux marqueurs OWBM6 et OWBM8 ont été cartographiés sur le bras court du chromosome 2B et que leur position sur la carte correspond à la position des marqueurs complètement liés ou flanking *Sm1* (marqueurs que nous avons identifiés dans la population RxS). Le seul marqueur qui n'est pas sur la carte iSelect est le marqueur flanking OWBM1.

Nous avons ensuite déterminé si les deux marqueurs issus des séquences RNAseq pouvaient être inclus dans le même intervalle de la carte iSelect. En utilisant les contigs CSS de blé comme une référence commune aux deux ensembles de données, nous avons constaté que quatre SNP d'un même contig sont cartographiés à la position de 27,2 cM, ce qui suggère que ce contig est localisé à cette position (27,2 cM sur le chromosome 2BS). Par contre, le marqueur OWBM2 n'a pas pu être placé dans cet intervalle. Ces résultats permettent de localiser le gène *Sm1* avec une position de carte comprise entre 26,48 cM et 32,16 cM sur la carte iSelect de Wang *et al.* (2014).

Dans cette analyse, nous avons identifié que le 2nd SNP du contig CSS portant le marqueur OWBM6 est également cartographié à une position de 23.51 cM sur la carte iSelect. Un 2nd SNP est présent sur un locus génétiquement adjacent mais avec le même profil : Ce SNP est donc localisé à deux positions

différentes (23.51 cM et 26,48 cM). Ce résultat peut s'expliquer par la présence d'une possible duplication du contig.

Ainsi, nous avons identifié, par différentes approches, 9 marqueurs SNP : ces marqueurs seront très utiles pour une identification précise du gène *Sm1*. Des associations significatives entre les 4 phénotypes et plusieurs marqueurs SNP ont été observées. Ainsi, en plus des deux marqueurs précédemment identifiés (OWBM6 et OWBM8), nous avons également révélé une association significative ($P < 0.001$) avec les marqueurs OWBM7 (marqueur distal) et OWBM9 (marqueur proximal). Une association plus faible a été observée avec les marqueurs OWBM1 et OWBM2. Par contre, aucune association n'a été obtenue avec les 3 autres marqueurs (OWBM3, OWBM4 et OWBM5) complètement liés à *Sm1*. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que ces SNP ont été identifiés entre Robigus et Shamrock et que cette dernière variété n'a pas ou peu été utilisée dans les croisements : l'allèle du SNP lié à la sensibilité de Shamrock n'est pas présent dans les variétés qui ont été testées. Les marqueurs faiblement associés à la résistance (même s'ils sont génétiquement proches de *Sm1*) ne sont pas prédictifs pour le matériel végétal que nous avons testé, c'est pourquoi notre analyse s'est essentiellement portée sur les 3 marqueurs OWBM6, OWBM7 et OWBM9 (Tableau III) :

Nous avons identifié un haplotype « Robigus » (*Sm1*) identique dans 48 lignées pour les trois marqueurs les plus pertinents (OWBM6; OWBM7; OWBM9), y compris toutes les lignées qui avaient été classées comme des descendants de Robigus/*Sm1*/Welford (Tableau III). Cet haplotype G:G/T:C-C:T a toujours montré une faible infestation par la cécidomyie dans nos essais.

Quand le marqueur OWBM6 a été testé seul, deux variétés distinctes ont révélé des faux positifs (Sy Epson et K3909).

Par contre, des problèmes d'inversion d'étiquette des lignées Visage et G2424 sont responsables des résultats contradictoires observés sur le terrain en 2011 et 2012 (Tableau III) et expliquent que nous ayons trouvé des faux positifs pour ces deux variétés une année.

L'haplotype le plus couramment observé a été T:T/T:T/T:T (avec de possibles légères modifications dans les deux marqueurs adjacents OWBM7 et OWBM9). Cet haplotype est présent dans 31 lignées qui ont toutes un niveau très élevé d'infestation (Tableau III).

Trois lignées qui portent l'haplotype "sensible" aux deux marqueurs, sont résistantes dans les trois essais (T:T/T:T/C:T). Ces lignées sont LG OBM 11-05, 11-06, et Oxebo (Tableau III). Avant l'utilisation des marqueurs flanquants, nous avons supposé que l'incohérence entre le génotypage et le phénotypage pouvait être soit le résultat d'une recombinaison étroite entre OWBM6 et le gène *Sm1*, soit que ces trois lignées avaient d'autres gènes de résistance. Initialement, les résultats identiques obtenus avec les 2 marqueurs flanquant *Sm1* ne nous permettaient pas d'exclure l'hypothèse de recombinaison entre le marqueur SNP OWBM6 et le gène *Sm1*. Mais l'identification de nouveaux marqueurs liés à *Sm1* et le fait que ces trois lignées partagent un haplotype identique pour ces 9 marqueurs SNP autour de *Sm1* révèle que ces trois lignées possèdent probablement un ou plusieurs facteurs de résistance autres que le gène *Sm1* ou que ces lignées ont un nouvel haplotype de *Sm1* qui est différent de l'haplotype *Sm1* « traditionnel » (provenant de Robigus).

4. Conclusions

- Nous avons cartographié génétiquement *Sm1* à l'intérieur d'une région définie par les marqueurs SNP OWBM7 et

OWBM9. Cette région correspond à une zone comprenant environ 20 gènes chez *Brachypodium*.

- L'exploitation de différentes ressources (Contig, RNAseq, carte iSelect, *Brachypodium*) nous a permis d'identifier neuf marqueurs SNP soit complètement liés à *Sm1* soit flanquant le gène de chaque côté.
- L'analyse d'association effectuée sur les données de la première année montrent que le marqueur SNP OWBM6 et les deux marqueurs flanquants nouvellement identifiés fournissent un haplotype très puissant et robuste pour identifier le gène *Sm1* parmi les descendants de Robigus. Ainsi, seulement 3.5% des lignées avec l'allèle *Sm1* du marqueur OWBM6 sont sensibles (contre 38% avec Wm1).
- Deux faux positifs (avec l'haplotype de *Sm1*, mais sensibles) ont été identifiés. Ces deux lignées seront ré-examinées car elles ont montré un phénotype sensible dans nos pépinières alors qu'elles sont connues pour avoir un comportement opposé : Nous suspectons un problème de semences...
- L'haplotype sensible constitué des allèles de ces 3 marqueurs s'est également révélé globalement très prédictif parmi les variétés testées, sauf pour 3 lignées qui ont révélé 3 faux négatifs (haplotype sensible, mais lignée résistante à la cécidomyie). Un haplotype commun dans toute la région *Sm1* (9 marqueurs SNP) et l'utilisation de marqueurs flanquant génétiquement cartographiés dans la région du gène suggère que ces trois lignées (LG OBM 11-05, LG OBM 11-06, et Oxebo) possèdent probablement une nouvelle source de résistance à la cécidomyie ou ont un nouvel haplotype de *Sm1* qui est différent de l'haplotype provenant de Robigus.

En conclusion, ce programme a permis d'obtenir trois marqueurs liés à *Sm1* qui sont utilisables en sélection (ce qui n'était pas le cas du marqueur Wm1) et de d'identifier des lignées possédant d'autres gènes de résistance à la cécidomyie. Un nouveau programme FSOV 2014 a débuté pour permettre d'obtenir des marqueurs de *Sm1* totalement fiables.

Tableau I : Liste des lignées ou variétés, proposées par les partenaires, qui ont été phénotypées au champ en 2013.

Bioplante	Arvalis	R2n	Limagrain	Syngenta	JIC
FD1-OWBM	APACHE	RAGT OBM-11	LG01-2012-R	H10686	Robigus
FD2-OWBM	COURTOT	RAGT OBM-12	LG02-2012-R	H10697	Shamrock
FD3-OWBM	BERMUDE	RAGT OBM-13	LG03-2012-R	07FR143-239	HR-RS1
FD4-OWBM	BOREGAR	RAGT OBM-14	LG04-2012-R	H12FR14123	HR-RS1C
FD5-OWBM	ASCOTT	RAGT OBM-15	LG05-2012-R	H1111103	HR-RS2
FD6-OWBM	BALETKA	RAGT OBM-16	LG06-2012-R	H1111195	HR-RS3
FD7-OWBM	BELEPI	RAGT OBM-17	LG07-2012-R	H1111197	HR-RS4
FD8-OWBM	BERGAMO	RAGT OBM-18	LG08-2012-R	H12FR14331	HR-RS5
KWS CROFT	CALABRO	RAGT OBM-19	LG09-2012-R	H13FR14277	HR-RS5C
LEEDS	CELLULE	RAGT OBM-20	LG010-2012-R	H13FR14279	HR-RS6
KWS SANTIAGO	FAIRPLAY	RAGT OBM-21	LG011-2012-R	H13FR14351	HR-RS7
KWS TARGET	LYRIK	RAGT OBM-22	LG012-2012-R	H13FR14447	HR-RS8
KWS YARIS	MEETING	RAGT OBM-23	LG013-2012-R	H13FR14450	HR-RS9
KWS KIELDER	OREGRAIN	RAGT OBM-24	LG014-2012-R	H13FR14474	HR-RS9C
KWS CLEVELAND	RONSDARD	PAKITO	LG015-2012-R	H13FR14481	SyEpson
AREZZO	RUBISKO		LG016-2012-S	H12FR11010	
	SY MOISSON		LG017-2012-S	H11FR13295	

Tableau II : Tableau de corrélation entre les caractères morphologiques et la résistance à la cécidomyie.

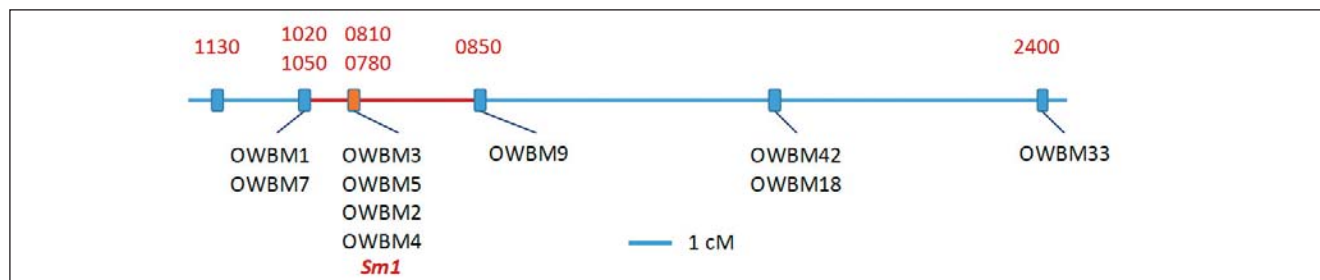
	Extrusion	Hauteur	Compacité	Nb de larves /épi	% épis infestés	Date épiaison	Date floraison
Extrusion	1						
Hauteur	0.11133812	1					
Compacité	-0.06079968	0.02058616	1				
Nb de larves	0.08511147	0.11907004	0.16622039	1			
% épis infestés	0.08697204	0.09597737	0.1219345	0.943319211	1		
Date épiaison	-0.02814726	-0.31581907	-0.38269493	-0.368170503	-0.398826953	1	
Date floraison	-0.07615593	-0.35890784	-0.37760939	-0.309015681	-0.307095336	0.824498443	1

Tableau III : Haplotype associé à la résistance à la cécidomyie pour les 3 marqueurs SNP OWBM6, OWBM7 et OWBM9.

	Marqueurs SNP KASPar			2011-Louville		2011-Ouzouer		2012-UK		Moyenne	
	Associé	flankant	flankant	LvSp	% inf	LvSp	% inf	LvSp	% inf	LvSp	% inf
	OWBM6	OWBM7	OWBM9								
Robigus-Haplotype (48 lignées)	G:G	T:C	C:T	0.01	0.5	0.02	2	0.0	0.0	0.0	1.1
G 2424	G:G	T:C	C:T	0.00	0.0	0	0	1.6	30.0	0.5	10.0
SY EPSON	G:G	T:C	C:T	0.27	23.3	0.07	7	.	.	0.2	15.0
K 3909	G:G	T:C	C:T	0.40	20.0	0.70	40	5.2	56.7	2.1	38.9
VISAGE (inversion avec Viscount)	G:G	T:C	C:T	0.93	53.3	1.17	67	.	.	1.1	60.0
18 lignées	T:T	T:T	T:T	2.50	53.24	1.49	52.34	4.25	75.00	2.75	60.19
5 lignées	T:T	T:C	T:T	0.90	31.33	0.69	35.33	4.09	77.33	1.89	48.00
8 lignées	T:T	T:T	C:C	4.46	82.50	2.94	78.28	4.31	80.98	3.90	80.59
OXEBO	T:T	T:T	C:T	0.00	0.0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
LG OBM 11-05	T:T	T:T	C:T	0.00	0.0	0.03	3	0.0	0.0	0.0	1.1
LG OBM 11-06	T:T	T:T	C:T	0.00	0.0	0.03	3	0.0	0.0	0.0	1.1
Nogal	T:T	T:T	C:T	3.83	96.7	.	.	0.4	10.0	2.1	53.3

LvSp : Nombre de larves par épis
% inf : Pourcentage d'épis infectés

Figure 1 : Cartographie des marqueurs SNP et des gènes de *Brachypodium* dans la région du gène *Sm1*. En rouge : Le nom du gène de *Brachypodium* (exemple : 0810 → Bradi5g00810). Les marqueurs OWBM sont des marqueurs SNP de type KASPar.



Références bibliographiques

Ellis S.A., Bruce T.J.A., Smart L.E. *et al.* (2009) Integrated management strategies for varieties tolerant and susceptible to wheat blossom midge. HGCA Project Report 451. (http://www.hgca.com/document.aspx?fn=load&media_id=5270&publicationId=5996)

Oakley J.N., Ellis S.A., Watling M. *et al.* (2005) Responses of summer cereal aphid populations to reduced rate aphicide applications in field plots of winter wheat. *Agricultural and Forest Entomology* 7: 211-218

Simmonds J.R., Fish L.J., Leverington-Waite M.A. *et al.* (2008) Mapping of a gene (Vir) for a non-glaucous, viridescent phenotype in bread wheat derived from *Triticum dicoccoides*, and its association with yield variation. *Euphytica* 59:333-341

Thomas J., Fineberg N., Penner G. *et al.* (2005) Chromosome location and markers of *Sm1*: a gene of wheat that conditions antibiotic resistance to orange wheat blossom midge. *Molecular Breeding* 15: 183-192.

Wang S., Wong D., Forrest K. *et al.* (2014) Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90 000 single nucleotide polymorphism array. *Plant Biotechnology Journal* 12: 787-796.

Evaluation de la résistance à la septoriose par génétique d'association

Delphine HOURCADE^{*1}, David GOUACHE¹, Katia BEAUCHENE¹, Christophe MICHELET², Laure DUCHALAIS², Olivier ROBERT³, Ellen GOUEMAND³, Denis BEGHIN³, Seyed Mahmod TABIB GHAFARY⁴, Gert KEMA⁴

1 – ARVALIS – 3 rue Joseph et Marie Hackin – 75116 Paris

2 – RAGT 2n - Route d'Epincy - 28150 Louville la Chenard

3 – BIOPLANTE - FLORIMOND DESPREZ – 3 rue Florimond Desprez, 59242 Cappelle en Pévèle

4 – PRI- Droevendaalsesteeg 1 (6708 PB) Wageningen, The Netherlands

* Coordonateur : Delphine HOURCADE, d.hourcade@arvalisinstitutduvegetal.fr

1. Introduction

La septoriose, provoquée par le champignon *Mycosphaerella graminicola* (ex *Septoria tritici*), est actuellement la maladie la plus dommageable sur le blé en France. Sa nuisibilité moyenne interannuelle est de 21.7 qx/ha (Arvalis, 2014). La lutte contre la septoriose reste largement assurée par les traitements fongicides. Cependant, cette lutte chimique devient difficile à mener, de par l'apparition de souches résistantes aux fongicides et à cause des contraintes sociétales sur l'usage des pesticides en agriculture (Plan Ecophyto). Face à ces évolutions, la résistance variétale représente une alternative d'intérêt majeur. Ainsi, les variétés résistantes à la septoriose actuelles ont permis des gains de 7 et 10 qx/ha par rapport aux variétés les plus sensibles. De plus, l'utilisation de variétés résistantes actuelles permet de réduire la dépense en traitement fongicide de 20 €/ha en moyenne. Toutefois, la caractérisation du niveau de résistance du blé vis-à-vis de la septoriose ainsi que sa sélection restent difficiles et les niveaux de résistance des variétés de blé françaises ne sont pas encore suffisants et pourraient être améliorés. Ce projet vise à améliorer les méthodes d'évaluation de la résistance du blé à la septoriose pour 3 utilisations : la sélection, l'inscription et la préconisation des variétés.

La résistance à *M. graminicola* peut être de nature spécifique, ou bien quantitative. La résistance spécifique à *M. graminicola* est pratiquement totale, oligogénique, et gouvernée par une relation gène-pour-gène (Brading *et al.*, 2002). Ces dernières années, 18 gènes majeurs de résistance à *M. graminicola*, Stb1 à Stb18, ont été identifiés (Somasco *et al.*, 1996; Arraiano *et al.*, 2001; Brading *et al.*, 2002; Adhikari *et al.*, 2003; McCartney *et al.*, 2003; Adhikari *et al.*, 2004a,b,c; Chartrain *et al.*, 2005a,b, Arraiano *et al.* 2007 ; Tabib Ghaffary *et al.* 2012). De plus, de récents travaux sur diverses populations et panels de variétés sont régulièrement publiés décrivant l'identification de QTLs différents des gènes Stb (Mergoum *et al.*, 2013)

Les gènes de résistance spécifique confèrent une résistance au niveau des jeunes plantes de blé pouvant perdurer au stade adulte pour certains d'entre eux (Brown *et al.* 2001). L'identification de ces gènes repose sur des tests à des stades très précoces (plantules : Kema *et al.* 1996a, Kema *et al.* 1996b) ou sur des feuilles détachées (Arraiano *et al.* 2001). Plusieurs marqueurs liés à ces gènes ont été identifiés, entre autres par, Adhikari *et al.* (2003, 2004a, 2004b, 2004c), Arraiano et Chartrain (2007). En complément de cette information génétique variétale, il est également primordial d'avoir accès à la caractérisation des populations françaises de *M. graminicola* pour leur virulence vis-à-vis des gènes Stb, afin de pouvoir expliquer les variabilités observées des comportements variétaux ; tout en ayant conscience de l'évolution constante

des populations d'agents pathogènes sous la pression de sélection imposée par les pratiques agricoles, en particulier l'introduction de nouvelles variétés résistantes.

Par ailleurs, les gènes de résistance spécifiques Stb ont souvent montré leurs limites en termes de durabilité avec l'apparition rapide de souches virulentes.

Une analyse fine de la génétique des variétés françaises et européennes par la génétique d'association semble être un levier pour disposer d'outils efficace pour l'évaluation et la sélection variétale. D'autant plus que nous connaissons actuellement un développement très rapide de technologies de séquençage et de génotypage qui permettent d'avoir accès à de très nombreux marqueurs couvrant l'ensemble du génome du blé tendre.

2. Matériel et méthodes

► Matériel Végétal

Un panel de 206 variétés de blé tendre (60 lignées en cours de sélection et 146 variétés commerciales) a été évalué au stade plantule et adulte.

► Phénotypage

Afin d'assurer le développement de symptômes provoqués par *Mycosphaerella graminicola*, les différents types d'essais ont été inoculés avec au moins 2 souches. Le choix des souches est basé sur le fait qu'elles aient une virulence représentative de celle présente généralement en France. Le profil de virulence des souches a été caractérisé dans le cadre du projet FSOV 2008 H par le PRI (tableau 1).

	Stb1, 5BL & Stb6	Stb2, 3Bs & Stb6	Stb3, 7As & Stb6	Stb4, 7Ds	Stb5, 7Ds	Stb6, 3As	Stb7, 4AL	Stb8, 7BL	Stb9, 2B	Stb10(1D), Stb12(4AL), Stb6	Stb11, 1Bs & Stb6 & Stb7
IPO 98046					13						
IPO 98047	37		36			54				31	
IPO 98001		0	0	0	0	0				0	

Tableau 1 : Agressivité des 3 souches inoculées sur les variétés hôtes différents. La couleur verte signifie que peu ou pas de symptômes se sont développés sur la variété, indiquant qu'une réaction gène pour gène a eu lieu et donc que la souche présente la virulence pour le gène correspondant.

En 2011, le Plant Research International (PRI) a évalué le panel de variétés en serre au stade plantule après une inoculation par

les souches IPO98001, IPO98046 et IPO98047. L'intensité des nécroses et la quantité de pycnides ont été notées pour chacune des variétés.

Au champ, 4 essais inoculés avec 2 répétitions ont été générés :

- souche IPO98046, en 2011 (Plélo, ARVALIS) et 2012 (Prémèsques, RAGT2n)
- souche IPO98047, en 2012 (Bignan, ARVALIS et Bersée, FLORIMOND-DESPREZ).

Pour tous les essais, l'inoculation est débutée au stade dernière feuille étalée. Au total, 3 inoculations successives sont réalisées, une par semaine pendant 3 semaines afin de rapprocher les inoculations autant que faire ce peu des précocités variétales et des conditions climatiques.

L'intensité visuelle des symptômes a été notée à au moins 3 dates après l'inoculation sur tous les essais. Des photos numériques (sur 1m² / parcelles) ont été prises sur les essais ARVALIS puis analysées à l'aide du logiciel SATVA (<http://www4.paca.inra.fr/emmah/Production-Documentation/Outils-et-modeles/SATVA>). Un indice de vert a ensuite été calculé à partir des photos pour chaque parcelle à chaque date.

La quantification de la biomasse fongique a été mesurée à 3 dates post-inoculation par qPCR (gène EF1 α) sur des échantillons de feuilles prélevées dans les essais de Plélo et Bignan ainsi que sur l'essai au stade plantule inoculé avec la souche IPO98046. Par ailleurs des notations d'épiaison, de hauteur, de rouille jaune ont été effectuées au stade adulte sur tous les essais. Enfin le rendement et nombre de grains/m² ont été relevés sur le site de Plélo et le PMG sur l'essai de Bignan.

Afin de prendre en compte l'évolution de la maladie à partir de l'inoculation, des AUC (*area under curve*) sont calculées entre la date de précocité et la date de sénescence. Ensuite des moyennes ajustées entre les répétitions et pour tous les caractères mesurés sont obtenues avec un modèle mixte.

► Génotypage

Différents types de marqueurs ont été utilisés pour génotyper le panel :

- 439 SSR publics parmi lesquels les marqueurs liés aux gènes Stb. La révélation des profils est réalisée sur électrophorèse capillaire, et l'interprétation des profils à l'aide du logiciel GeneMapper (Carte génétique issue du projet FSOV 2008-PRI2)
- 1572 DArT obtenus via le prestataire Triticarte (Carte génétique issue du projet FSOV 2008-PRI2)
- 1734 SNP issus du projet DIGITAL (INRA-GDEC) (Carte génétique consensus entre Chinese Spring x Renan, Apache x Balance Alchemy x Robigus et carte ITMI)
- 35857 SNP issus de la puce 90K (Infinium, Illumina)(carte génétique Wang *et al.*, 2014)
- 104727 SNP issus de la puce TaBW420K élaborée dans le projet BREEDWHEAT(Axiom) (carte génétique consensus entre Chinese Spring x Renan et carte ITMI).

► Génétique d'association

Les analyses de génétique d'association ont été réalisées à l'aide d'un modèle linéaire mixte :

$P = G + K + \epsilon$ (avec P=phénotype, G=génotype, K=Kinship, ϵ =résiduelle) dans lequel les effets des marqueurs sont fixes et les autres facteurs sont aléatoires. Les analyses ont été réalisées

à l'aide du package ASReml (Gilmour *et al.*, 2002) sous l'interface R. Les coefficients de parenté ou Kinship ont été calculés à l'aide du package emma.kinship dans R avec les marqueurs de la 90K.

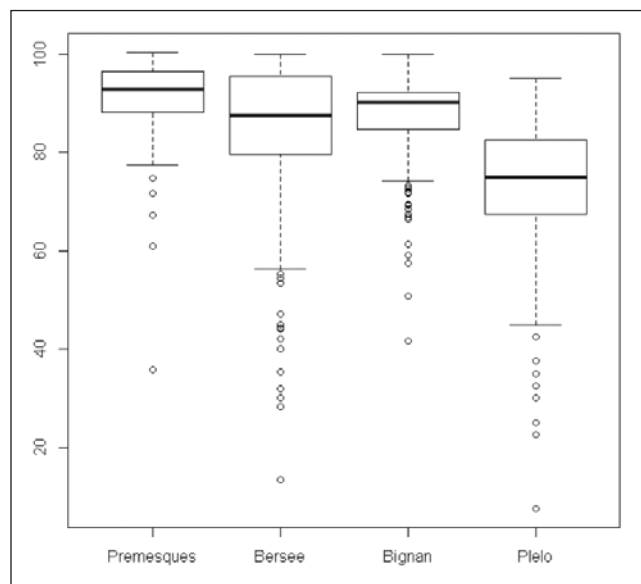
La matrice de génotypage a été filtrée pour éliminer les marqueurs dont la MAF (minimum allele frequency) est faible (< 5%) et qui présentent plus de 15% de données manquantes. La proportion de la variance génotypique expliquée par tous les QTLs est estimée par la valeur de R² issue de la corrélation entre les données phénotypiques et les valeurs des effets alléliques.

3. Résultats et discussion

► Evaluation de la résistance

Au stade plantule, les inoculations avec les 3 souches ont favorisé le développement de symptômes (gamme de 0 à 100%) et de pycnides (gamme de 0 à 95%) avec une agressivité moins élevée pour la souche IPO98001.

Au stade adulte, la maladie s'est également bien propagée puisque la surface verte évolue de 100% à 7.5% selon les sites (graphique 1).



Graphique 1 : % de surface verte observée sur les 4 lieux d'essais au stade adulte.

Concernant l'analyse des corrélations entre variables (tableau 2), elles sont bonnes entre sites et également intrasite lorsqu'on s'intéresse aux données obtenues avec les photos et les notations visuelles. Une corrélation négative relie la qPCR et les notations visuelles ce qui confirme que le pathogène ne se développe pas ou peu sur des variétés résistantes. Enfin, la corrélation entre le rendement et la maladie est quasiment nulle voire légèrement négative entre sites, ce qui indique que les variations de rendement ne sont pas directement impactées par la sévérité des symptômes.

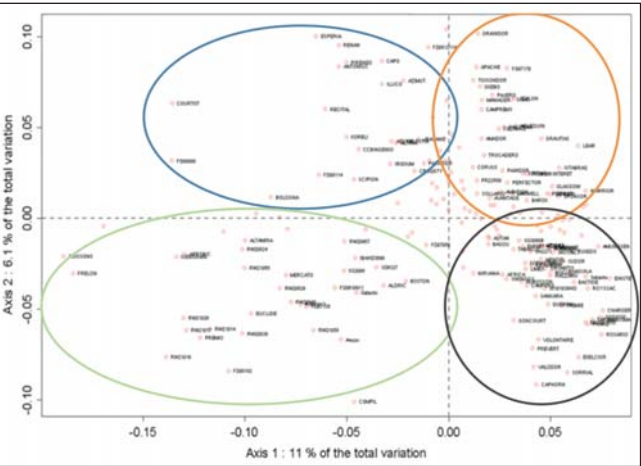
	AUC Notations. BERSEE	AUC Notations. BIGNAN	AUC Notations. PLELO	AUC Notations. PREMESQUES	AUC Photo. PLELO	Rendement. PLELO	qPCR. PLELO
AUC Notations.BERSEE	1						
AUC Notations.BIGNAN	0.800538959	1					
AUC Notations.PLELO	0.69215907	0.51045242	1				
AUC Notations.PREMESQUES	0.753469162	0.773225815	0.452713753	1			
AUC Photo.PLELO	0.628322202	0.555483215	0.827111034	0.505921162	1		
Rendement.PLELO	-0.212790943	0.362558684	0.06680631	-0.346944879	-0.00190192	1	
qPCR.PLELO	-0.28841439	-0.117235618	-0.603822346	-0.055273097	-0.4447846	-0.14970476	1

Tableau 2 : Corrélation entre quelques caractères mesurés au champ.

► **Description génétique du panel et analyse du Déséquilibre de liaison**

Les différents batches de génotypage ont permis de couvrir de façon homogène le génome. Le nombre de marqueurs par chromosome varie entre 5534 (4D) et 16186 (2B) La moyenne est de 10860 marqueurs et le génome D reste cependant le moins bien représenté.

Une analyse de la diversité génétique à l'aide d'une ACP et CAH sur la matrice de Kinship générée avec les marqueurs SNP de la TaBW420K permet de distinguer 4 groupes (Graphique 2). La même conclusion aurait été faite sur la base des 439 SSR, à la différence que les groupes auraient été plus resserrés.



Graphique 2 : Analyse en Composante principale de la Kinship obtenue sur le panel avec les marqueurs de la 420K.

Le déséquilibre de liaison a été calculé avec le package LDHeatMap dans R pour chaque paire de marqueur et par chromosome. L'équation de décroissance du DL de Hill & Weir a été ajustée sur la courbe et la distance à partir de laquelle le DL décroît en dessous de 0,2 a été déterminée pour chaque chromosome (Tableau 3). Les distances varient entre 0.2 et 3.9 cM indiquant une structure du panel faiblement marquée. Par ailleurs cette information nous permet de diminuer les intervalles de confiance des pics d'association mis en évidence.

chromosome	1A	1B	1D	2A	2B	2D	3A	3B	3D	4A	4B	4D	5A	5B	5D	6A	6B	6D	7A	7B	7D
LD decay < 0.2	0.8	0.2	2.7	0.5	0.8	2.0	0.9	0.2	1.2	1.6	1.1	3.9	0.5	2.6	1.5	0.7	0.4	2.5	0.4	0.7	3.5

Tableau 3 : Distance en cM à partir de laquelle le LD<0.2.

► **Résultats de génétique d'association**

Les analyses ont été réalisées au fur et à mesure de la disponibilité des matrices de génotypage. La comparaison des zones associées avec les différents batches montre que globalement les mêmes zones sont mises en évidence même si certaines régions restent spécifiques d'une origine de marqueurs (graphique 3).

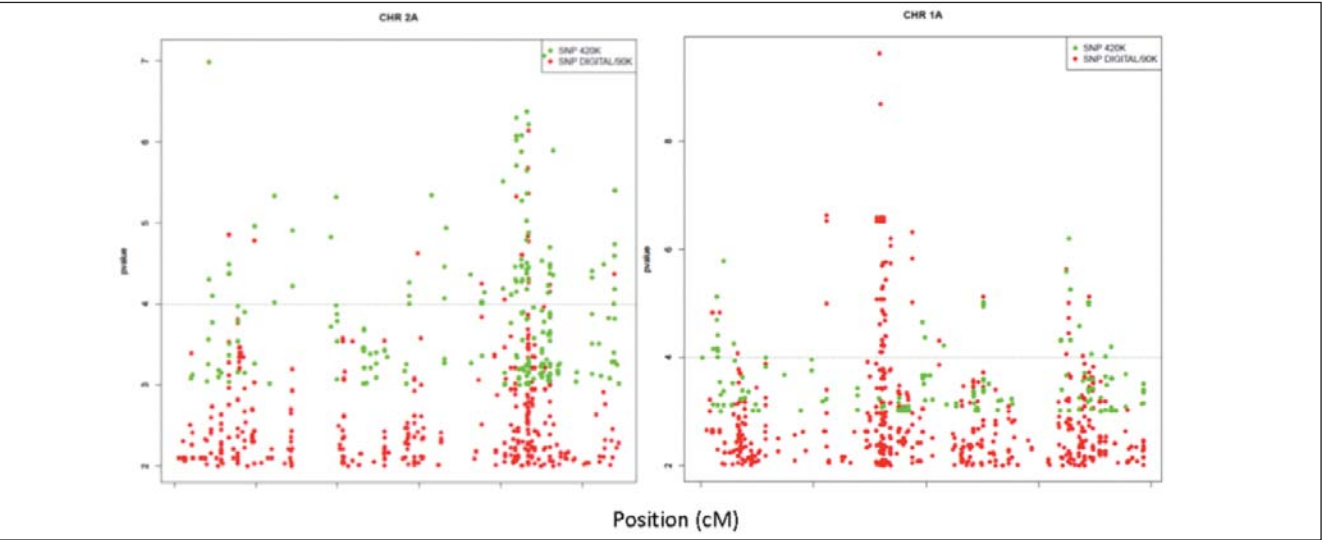
34 QTLs ont été identifiés dont 10 sont spécifiques du stade plantule. Aucun QTL n'est cependant spécifique de la souche inoculée car les traits associés aux marqueurs proviennent des sites inoculés avec les 2 souches. Ce résultat n'est peut-être pas surprenant dans la mesure où le profil de virulence des souches choisies n'est pas très contrasté. Des QTLs ont été identifiés sur tous les chromosomes sauf sur le 4D, 6D et 7B. Le tableau en Annexe liste les différents QTLs identifiés, les caractères qui y sont associés ainsi que des informations de part génétique avec le R².

Les effets des QTLs varient entre 3 et 20% et dans la majorité des cas les surfaces vertes obtenues à partir des notations visuelles et photos sont améliorées.

La majorité des QTLs identifiés ont un impact négatif sur le rendement (notation disponible uniquement pour le site de Plelo). Cependant 3 QTLs présents sur les chromosomes 1D, 4B, 7D semblent offrir un avantage en terme d'augmentation de surface verte et de diminution de la biomasse fongique ainsi qu'un gain pour le rendement. Les R² de ses 3 QTLs varient entre 14 et 20%.

Concernant les analyses de colocalisation, et sous réserve de la portabilité des cartes génétiques qui sont différentes entre les divers projets, quelques QTLs semblent correspondre à certaines régions identifiées dans le projet FSOV PRI2 (Goudemand *et al.*, 2013). Ainsi, les QTL1, 4, 13, 14, 26 et 33 colocalisent respectivement avec MQTL1, QTL2, MQTL4, MQTL5, QTL10 et MQTL24. Nous avons également regardé si certaines zones étaient proches des gènes Stb décrits. Seulement le QTL28 semble colocaliser avec le gène Stb15. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la majorité des gènes étant contournés, la résistance qui s'exprime ici est induite par des loci non encore identifiés et caractérisés.

Par ailleurs, nous nous sommes intéressés à identifier les variétés qui cumulent les allèles positifs à ces différents QTLs mis en évidence, dans l'objectif de valider leur pertinence. L'analyse a été uniquement focalisée sur les QTLs identifiés à la fois au stade adulte et au stade plantule.



Graphique 3 : Exemple de Manhattan plot des marqueurs associés.

Les corrélations entre le nombre de SNP positifs pour les QTLs et l'AUC calculée pour les notations et pour les photos des 4 sites varient entre 0.35 et 0.58.

Note Globale	0.35
AUC.Notations.BIGNAN	0.47
AUC.Notations.PLELO	0.45
AUC.Notations.BERSEE	0.58
AUC.Notations.PREMESQUES	0.44
AUC.Photo.BIGNAN	0.41
AUC.Photo.PLELO	0.50

Tableau 4 : Corrélation entre le Nombre d'allèles positifs présents dans les variétés et les principales notations maladie. La note globale varie de 1 à 8, sensible à résistant.

Ces corrélations non négligeables confirment la significativité des QTLs identifiés qui expliquent en partie la résistance observée sur ce panel.

4. Conclusions

Le projet a permis d'acquérir une importante et riche base de données phénotypiques et génotypiques sur la résistance à la septoriose.

Grâce aux analyses de génétique d'association, 34 QTLs ont pu être identifiés parmi lesquels 10 sont spécifiques du stade plantule.

L'inoculation avec 2 souches différentes n'a pas permis de révéler des QTLs souches spécifiques. Cependant leur spectre de virulence est représentatif de la virulence fréquemment rencontrée en France, cela laisse donc de bonnes perspectives sur l'efficacité des QTLs identifiés pour de la caractérisation variétale et sur leur exploitation future dans les programmes de sélection.

L'effet négatif des QTLs de résistance sur le rendement a été observé dans cette étude et a également décrit par Brown *et al*, en 2011. Ce paramètre est donc à prendre en compte.

Les colocalisations mises en évidence semblent prometteuses cependant des efforts restent à faire sur la connexion des différentes cartes génétiques obtenues avec ces nombreux et divers marqueurs afin de réaliser une méta-analyse pour confirmer ces hypothèses et pouvoir exploiter les autres ressources disponibles.

Les nombreux QTLs identifiés confirment le fait que la résistance est polygénique, et des modèles de prédiction basés sur la sélection génomique doivent être mis en œuvre pour parvenir à capter cette complexité

Enfin, l'identification de variétés présentant peu d'allèles positifs mais ayant un bon niveau de résistance, prouve que certains QTLs de résistance à la septoriose, ont été écartés à cause de leur faible MAF. Comme ces QTLs présentent un intérêt, l'exploitation de la diversité génétique demeure un levier indispensable pour la mise à disposition de nouveaux géniteurs pour l'obtention de variétés résistantes.

Références bibliographiques

Akhunov E., Nicolet E., Dvorak J. (2009) Single nucleotide polymorphism genotyping in polyploid wheat with the Illumina GoldenGate assay. TAG 119:507-519.

A.R.Gilmour, B.J.Gogel, B.R.Cullis, S.J. Welham, R.Thomposin. ASReml User Huide Release 1.0. VSN International (2002), 5 The Waterhouse St, Hemel Hempstead, HP1 1ES, UK

Arraiano L.S., Brading P.A., Brown J.K.M. (2001) A detached seedling leaf technique to study resistance to *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) in wheat. Plant Pathology 50: 339-346.

Brading, P. a, Verstappen, E. C. P., Kema, G. H. J., & Brown, J. K. M. (2002). A Gene-for-Gene Relationship Between Wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the *Septoria Tritici* Blotch Pathogen. Phytopathology, 92(4), 439-45. doi:10.1094/PHYTO.2002.92.4.439

Brown et al., 2011. A yield penalty of *Septoria* resistance – and can it be overcome? 8th International Symposium on *Mycosphaerella* and *Stagonospora* Diseases of Cereals. Septembre 2011 Mexico City, Mexico

Goudemand, E., Laurent, V., Duchalais, L., Tabib Ghaffary, S. M., Kema, G. H. J., Lonnet, P., Robert, O. (2013). Association mapping and meta-analysis: two complementary approaches for the detection of reliable *Septoria tritici* blotch quantitative resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Molecular Breeding, 32(3), 563-584. doi:10.1007/s11032-013-9890-4

Hill WG, Weir BS (1988) Variances and covariances of squared linkage disequilibria in finite populations. Theor Popul Biol 33:54-78

Kema, G. H. J., Annone, J. G., Sayoud, R., van Silfhout, C. H., van Ginkel, M., and de Bree, J. (1996a). Genetic variation for virulence and resistance in the wheat-*Mycosphaerella graminicola* pathosystem. I. Interactions between pathogen isolates and host cultivars. Phytopathology 86:200-212.

Kema, G.H.J., Sayoud, R., Annone, J.G., Silfhout, C.H. van. (1996b). Genetic variation for virulence and resistance in the wheat-*Mycosphaerella graminicola* pathosystem. II. Analysis of interactions between pathogen isolates and host cultivars. Phytopathology 86, 213-220.

Mergoum, M., Harilal, V. E., Singh, P. K., Adhikari, T. B., Kumar, a., Ghavami, F., Kianian, S. F. (2013). Genetic analysis and mapping of seedling resistance to *Septoria tritici* blotch in "Steele-ND"/"ND 735" bread wheat population. Cereal Research Communications, 41(2), 199-210. doi:10.1556/CRC.2013.0005

Tabib Ghaffary, S. M., Faris, J. D., Friesen, T. L., Visser, R. G. F., van der Lee, T. a J., Robert, O., & Kema, G. H. J. (2012). New broad-spectrum resistance to *septoria tritici* blotch derived from synthetic hexaploid wheat. TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik, 124(1), 125-42. doi:10.1007/s00122-011-1692-7

Wang, S., Wong, D., Forrest, K., Allen, A., Chao, S., Huang, B. E., Akhunov, E. (2014). Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90 000 single nucleotide polymorphism array. Plant Biotechnology Journal, 12(6), 787-96. doi:10.1111/pbi.12183

Annexe : Liste des QTLs identifiés

QTLs	Chromosome	Notation associée	R ²	Effet
QTL1	1A	pyc46, necr46, Blphoto47	10%	-5%(nécroses)
QTL2	1A	PLnot46, BEnot47	9.39%	+4% (surface verte)
QTL3	1A	BEnot47	13.73%	+40% (surface verte)
QTL4	1A	necr46, pyc46, necr47, pyc47	5.11%	-9.23%(nécroses)
QTL5	1B	necr46, necr47	10.98%	-10% (nécroses)
QTL6	1B	BEnot47, BEnot47, PLnot46, PLqpcr46, PRnot46, Blqpcr47,necr01, necr47	11.52%	+5% (surface verte)
QTL7	1B	BEnot47, PLnot46, Blqpcr47, Bltkw47, necr46, pyc46	12%	+8% (surface verte) - 1.5 (qpcr)
QTL8	1D	necr46, pyc46, necr47, pyc47	10.00%	-6.08% (nécroses)
QTL9	1D	PLnot46, PLphoto46, BEnot47, PLqpcr46	20.74%	+8% (surface verte)
QTL10	2A	necr.46 et 47	12.50%	-20% (nécroses)
QTL11	2A	Blnot47, PRnot46, PRnot47, Blqpcr47, Bltkw47, BEnot47, PLqpcr46, PLphoto46	14.13%	+6% (surface verte)
QTL12	2A	Blnot47, PLnot46, BEnot47, PLqpcr46	3.69-8.25%	+7.97%(surface verte)
QTL13	2A	necr46, pyc46, necr47,pyc47	10.00%	-7.36% (nécroses)
QTL14	2A	necr46, pyc46, necr47,pyc47, necr01, pyc01	10.00%	-12.54% (nécroses)
QTL15	2B	BEnot47, Blnot47, PLnot46, PLtkw46	5.71%	
QTL16	2D	necr46, pyc46, necr47, pyc47	10.00%	-8.65% (nécroses)
QTL17	3A	necr46, pyc46, necr47, pyc47	10.00%	-9.03% (nécroses)
QTL18	3A	qpcr46, necr01, pyc01	15.14%	-0.6 (qpcr) -1%(nécroses)
QTL19	3B	PLnot46	16.22%	+9% (surface verte)
QTL20	3D	Blphoto47, Bltkw47	11.50%	+8% (surface verte)
QTL21	4A	necr46, pyc46, necr47, pyc47, Blnot47, PRnot46	2.81-4.98%	-6%(nécroses)
QTL22	4A	Binot46, PRnot47, Blphoto47	2.81-4.98%	+15%(surface verte)
QTL23	4B	BEnot47, Blnot47, Blphoto47, PLnot46	16.90%	+20% (surface verte)
QTL24	5A	PLnot46, Blnot47, PRnot47, Blphoto47	16.10%	+20% (surface verte)
QTL25	5B	BEnot47, Blnot47, Blphoto47, PRnot46, PLqpcr46, Blqpcr47	8.61%	+10% (surface verte)
QTL26	5B	PRnot46	18.77%	+15% (surface verte)
QTL27	5D	BEnot47, PLnot46, PRnot46, Blqpcr47, PLtkw46	12.40%	+13% (surface verte)
QTL28	6A	PLphoto46	17.04%	+16% (surface verte)
QTL29	6B	BEphoto47, BEnot47, PLnot46, Blnot47, BEnot47	5%	+7% (surface verte)
QTL30	6B	necr46, pyc46, necr47, pyc47	10%	-7.53% (nécroses)
QTL31	6B	PLphoto46, BEnot47	5%	+7% (surface verte)
QTL32	7A	Blnot47, PLnot46, PRnot46, Blphoto47, BEnot47	20.12%	-18% (nécroses)
QTL33	7A	BEnot47, PRnot46, PLgy46, PLnot46, necr46, pyc46, necr47, pyc47	16.20%	+15% (surface verte)
QTL34	7D	Blqpcr47	14%	-1.5 (qpcr) +5% (surface verte)

Étude des facteurs de résistances du blé tendre à la production des mycotoxines T2, HT2, DON et NIV par les fusarioses

Valérie LAURENT^{1*}, Hermann BURSTMAYR⁴, Laure DUCHALAIS², Delphine HOURCADE³, Marc LEMMENS⁴, Olivier Robert¹

1 – BIOPLANTE - FLORIMOND DESPREZ - 3 rue Florimond Desprez, 59242 Cappelle en Pévèle

2 – BIOPLANTE - R2n - Route d'Épincy, 28150 Louville La Chenard

3 – ARVALIS Institut du Végétal – 6 chemin de la Côte Vieille, 31450 Baziège

4 – IFA-Tulln – Konrad Lorenz Str. 20, 3430 Tulln, Autriche

* **Coordinateur : Valérie Laurent**, valerie.laurent@florimond-desprez.fr

1. Introduction

La fusariose est une maladie du blé qui peut conduire à des pertes importantes de rendement et de qualité lorsque les conditions environnementales sont favorables pour le développement de la maladie (précédent maïs, humidité élevée et précipitations pendant la floraison). Cette maladie est responsable de l'accumulation de mycotoxines dans les grains. Pour les céréales, les mycotoxines les plus fréquentes sont les trichothécènes de type B (surtout le déoxynivalénol (DON) et le nivalénol (NIV)), mais aussi les trichothécènes de type A comme les toxines HT2 et T2 qui peuvent être produites par certaines espèces de *Fusarium*. La DON provoque chez les animaux de ferme une consommation réduite d'aliments, une prise de poids réduite et des vomissements. La consommation de fortes concentrations de DON par les humains provoque des nausées, des vomissements, une diarrhée, des douleurs abdominales, des maux de tête, des étourdissements et de la fièvre. Les toxines NIV et T2 sont jusqu'à 20 fois plus toxiques que la DON. La toxicité des mycotoxines a conduit la Commission Européenne à fixer des limites législatives pour les mycotoxines de *Fusarium*, y compris les trichothécènes, DON et zéaralénone, dans les céréales et produits à base de céréales destinés à la consommation humaine dès 2006. Des limites ont été ajoutées pour la combinaison de trichothécènes, HT2/T2 en 2013 (100 µg/kg). À l'heure actuelle, aucune information n'est connue sur la résistance des cultivars à HT2 et T2, et il n'y a pas suffisamment de variétés résistantes à la production de DON.

Dans ce projet, nous nous sommes donc concentrés sur une comparaison de la résistance du blé aux producteurs de DON et aux producteurs de HT2/T2. Ce projet visait également à obtenir de nouveaux outils (marqueurs moléculaires, qPCR, FT-NIR) qui faciliteront l'obtention de variétés de blé tendre résistantes à la production de mycotoxines de fusarioses dans les grains.

Notre projet est donc une première étape pour fournir des variétés plus résistantes aux mycotoxines de *Fusarium* pour les agriculteurs français et les outils pour les étudier et caractériser.

2. Matériel et méthodes

► Matériel végétal et tests de résistance

Tests aux champs

Sur les 3 ans, un total de 329 lignées de blé tendre, 3 orges

et 3 blés durs ont été semés en 2 répétitions dans 3 lieux: en Autriche, à l'IFA-Tulln et dans le Nord de la France chez Bioplante (FD ou R2n) et chez Arvalis (Loir et Cher). Les inoculations ont été effectuées en soirée avec 3 inoculums différents : une souche de *Fusarium graminearum*, productrice de trichothécènes B, à une concentration de 20,000 spores de conidies par ml et une souche de *F. sporotrichoides*, productrice de trichothécènes A, à une concentration de 40.000 conidies par ml et un mélange des 2 souches. Les inoculations ont été réalisées à 50% de floraison. Chez R2n, FD et Arvalis, la contamination a été réalisée pour chaque cultivar individuellement à 50% de floraison et 2 jours après.

À l'IFA, l'inoculation a été réalisée pour tous les génotypes dès la floraison des premiers cultivars et répétée tous les 2 jours jusqu'à la floraison du dernier génotype. Toutes les parcelles ont été irriguées par springler (R2n, FD, Arvalis) ou brumisation (IFA) pendant 20 heures après l'inoculation.

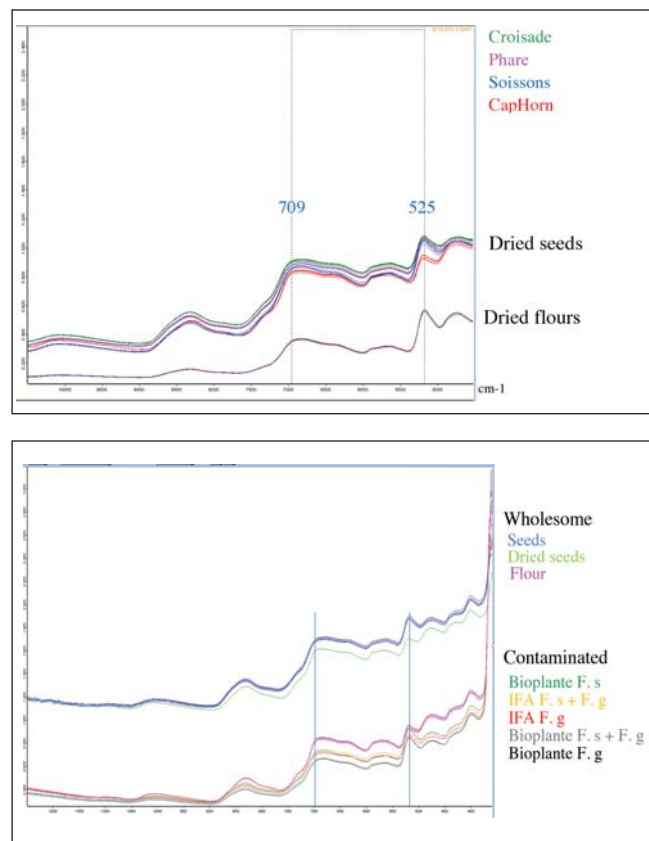
Les notations ont débuté 10 jours après la floraison puis été répétées tous les 4 jours jusqu'à 30 jours après. La notation visuelle est exprimée en % d'épillets touchés sur l'ensemble de la parcelle. Le pourcentage d'épillets touchés a été utilisé pour calculer une AUDPC jusqu'au jour 26 après floraison. Une note visuelle du FDK (pourcentage de grains échaudés) a été effectuée après le battage.

Mesure de la teneur en mycotoxines

La teneur en mycotoxines de la farine de 6 génotypes de comportements contrastés face aux *Fusariums* a été analysée par ELISA (Labs Roemer, Tulln, Autriche) et par GC-MS/MS (Capinov, Landerneau, France) pour comparer la validité des 2 types de mesures. L'Elisa et le GC-MS/MS ayant donné des résultats très comparables pour la DON ($r=0,99$), et un peu moins pour T2 ($r=0,75$), la teneur en mycotoxines de la farine des génotypes semés à l'IFA les années 2 et 3 a été analysée uniquement par GC-MS/MS. La teneur en DON des mêmes génotypes a ensuite été déterminée par FT-NIR avec un Multi Purpose Analyser de chez Brucker équipée d'une sphère rotative à partir des grains ou de farine.

Une analyse préliminaire, effectuée sur les grains, a permis de vérifier que l'appareil permettait bien de détecter la DON. Après avoir vérifié que la DON liquide (1mg/ml dans de l'acétonitrile) était bien détectée dans la gamme d'ondes attendues (7095 cm^{-1} et 5251 cm^{-1}), la répétabilité des mesures à partir de grains ou de farine a été comparée (cf

figure). L'utilisation de farine plutôt que des grains permet d'obtenir une meilleure répétabilité des mesures.



Répétabilité des mesures effectuées sur grains et sur farine et
Comparaison des résultats obtenus sur grains sains et contaminés.

Quantification de l'ADN fongique par qPCR

L'ADN fongique de *F. graminearum* et *F. sporotrichioides* des 190 génotypes inoculés l'année 3 a été quantifié par PCR quantitative en temps réel Taqman avec le gène EF1 α .

Test en serre de la résistance de type III contre les trichothécènes A

La concentration optimale de toxines (DON, NIV T2 et HT2) a été évaluée sur 4 génotypes de blé de sensibilité connue à DON et NIV. Une lignée contient Fhb1, le QTL qui régit la résistance à DON et NIV. Les autres lignées n'ont pas ce QTL et l'une d'entre elle est très sensible aux DON et NIV. Les 4 trichothécènes ont été appliqués à différentes concentrations (0,5, 1 et 2 mg / épi) afin de déterminer si T2 et HT2 sont phytotoxiques pour le blé, et si oui, quelle concentration provoque l'apparition des symptômes. Il s'agissait, en outre, d'observer si les lignées montraient des différences de résistance envers T2 et HT2.

La résistance aux mycotoxines a été étudiée pour 24 génotypes de blé sur 2 répétitions de 4 épis. Les toxines ont été solubilisées dans du méthanol ou bien dans un solvant eau-acétonitrile (60:40) non toxique et la solution de toxine a été appliquée sur 2 épis voisins à l'aide d'une micropipette. Les épis ont ensuite été couverts d'un sac en plastique pendant 24 heures afin d'assurer une forte humidité relative de l'air. Les symptômes sont apparus 10 jours après l'application et les mesures ont été répétées les jours 14, 18 et 22. Une AUDPC a été calculée avec la valeur moyenne des quatre épis par plante et des 2 répétitions à partir des caractères blanchiment des épis et flétrissement de l'épi au-dessus du point de traitement. Comme le méthanol utilisé

pour solubiliser les trichothécènes est phytotoxique, des contrôles effectués avec le solvant seul ont permis de soustraire les symptômes induits par le méthanol de ceux observés avec les toxines.

Génotypage et génétique d'association

L'ADN de 186 lignées de l'année 3 a été génotypé avec les marqueurs SNP de la puce SNP AXIOM TaBW420K SNP développée par l'INRA dans le cadre de BreedWheat. A l'IFA, sur les 169 642 SNP polymorphes obtenus, 34 735 marqueurs ont été retenus pour l'étude d'association. Les associations entre SNP et caractères ont été détectées à l'aide du progiciel R GAPIT. Un modèle linéaire de cartographie mixte a été appliqué en tenant compte de la structure de la population (coordonnées principales (Q-matrice)) et de la structure familiale (matrice de la relation (K-matrice)). La même démarche a été appliquée avec le package R EMMA par R2n et Arvalis sur leurs données de phénotypages des années 1 et 2 avec respectivement 92 700 SNP et 95 génotypes et 92 491 SNP et 66 génotypes et une p value inférieure à 0.01 et 0.001.

Identification des espèces naturelles de Fusarium

388 échantillons prélevés en France en condition de contamination naturelles pendant les saisons 2012-2013 ont été caractérisés pour identifier les espèces de *Fusarium* présentes naturellement sur le territoire français (Nirenberg, 198; Nelson *et al.*, 1983).

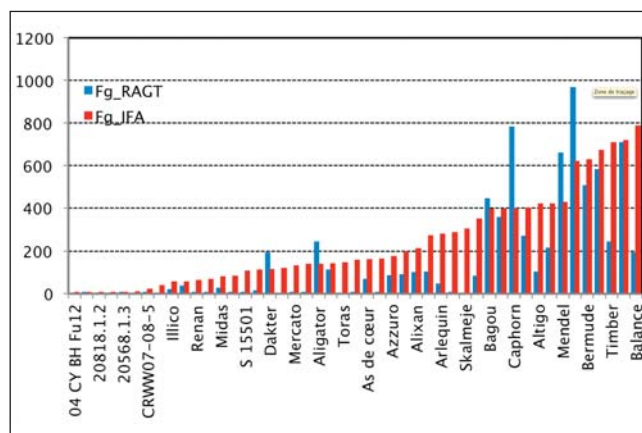
3. Résultats et discussion

► Variation génétique pour la réponse à la fusariose aux champs

Mesures aux champs

Pour les 3 années, de façon inattendue, la sévérité de la maladie était très différente entre les lieux (cf figure) et les isolats.

L'attaque par *F. graminearum* est toujours plus sévère que l'attaque par *F. sporotrichioides* quelque soit le lieux ou l'année sauf pour l'année 2011, dans le Nord de la France que cela soit chez R2n en 2011 ou chez FD en 2013, l'attaque par *F. sporotrichioides* a été plus sévère que l'attaque par *F. graminearum*.



Exemple de différence d'AUDPC obtenue
en 2011 entre les lieux R2n et IFA avec *F. graminearum*.

Deux types de protocoles d'inoculation ont été appliqués : bien que les quantités finales de spores inoculées soient les

mêmes dans les 2 pays, en France, les inoculations ont eu lieu en 2 passages alors qu'en Autriche il y a des inoculations tout les 2 jours pendant toute la période d'épiaison du panel que de date d'épiaison différentes. De plus, le système d'irrigation est différent (springler en France et brumisation en Autriche). Ces différences peuvent en partie expliquer les différences de sévérité de fusariose observée entre les lieux français et autrichien.

Quelque soit l'année, le lieu et l'isolat, les génotypes présentent une grande variabilité de résistance à la fusariose.

Les lignées les plus résistantes sont les lignées expérimentales possédant *Fhb1*. Les variétés résistantes au moins 2 des trois années de test sont Capo, Renan, Oxebo, Ambello et Illico et les sensibles, Timber, Toison dor, Charger, Royssac et Balance. Bagou et Isengrain apparaissent résistants ou sensibles selon les années.

Un classement similaire est obtenu avec le FDK et la teneur en mycotoxines reflétant les corrélations élevées qui existent entre l'AUDPC et ces 2 caractères : respectivement 0.85 et 0.86 pour *F. graminearum* et 0.61 et 0.70 pour *F. sporotrichioides*.

Les caractères hauteur de la plante, date de floraison et rétention des anthères présentent également une variation importante entre les génotypes.

Contamination par les mycotoxines

Comme attendu au regard de la variation de résistance observée, les lignées inoculées avec *F. graminearum* présentent une variation significative de la teneur en DON, de 822 µg/kg à 49 100 µg/kg. Les échantillons inoculés par *F. sporotrichioides* présentent également une grande variation pour la teneur en T2 et HT2. La teneur HT2 varie de 46 µg/kg à 3 250 µg/kg, elle est plus élevée que la teneur en T2. De la DON est également trouvée dans ces échantillons (moyenne 1 995 µg/kg), mais à une concentration 10 fois moindre que dans les échantillons inoculés par *F. graminearum* (moyenne 21 800 µg/kg). Seules des traces de ZON ont été trouvées dans les échantillons.

Teneur en ADN fongique

En 2013, il y a une grande variation de la teneur en ADN de *F. graminearum* (1 à 239 pg/ng d'ADN total) pour les lignées inoculées par ce champignon et une variation moindre de la teneur en *F. sporotrichioides* (0.2 à 14 pg/ng) pour les génotypes inoculé par *F. sporotrichioides* (cf figure ci-dessous).

Corrélation entre les différentes mesures

	Inoculation <i>F. graminearum</i> (FG)					Inoculation <i>F. sporotrichioides</i> (FS)			
	FHB	AUDPC	FDK	Qté champignon	[DON]	FHB	AUDPC	FDK	Qté champignon
AUDPC_FG	0.96	1							
FDK_FG	0.86	0.85	1						
Qté champignon FG	0.58	0.55	0.61	1					
[DON]_FG	0.85	0.86	0.91	0.61	1				
FHB_FS	0.7	0.7	0.66	0.43	0.66	1			
AUDPC_FS	0.71	0.74	0.68	0.46	0.71	0.91	1		
FDK_FS	0.69	0.68	0.77	0.53	0.76	0.61	0.61	1	
Qté champignon FS	0.69	0.7	0.71	0.46	0.73	0.53	0.58	0.65	1
[T2.HT2]_FS	0.7	0.75	0.76	0.48	0.8	0.62	0.7	0.73	0.78

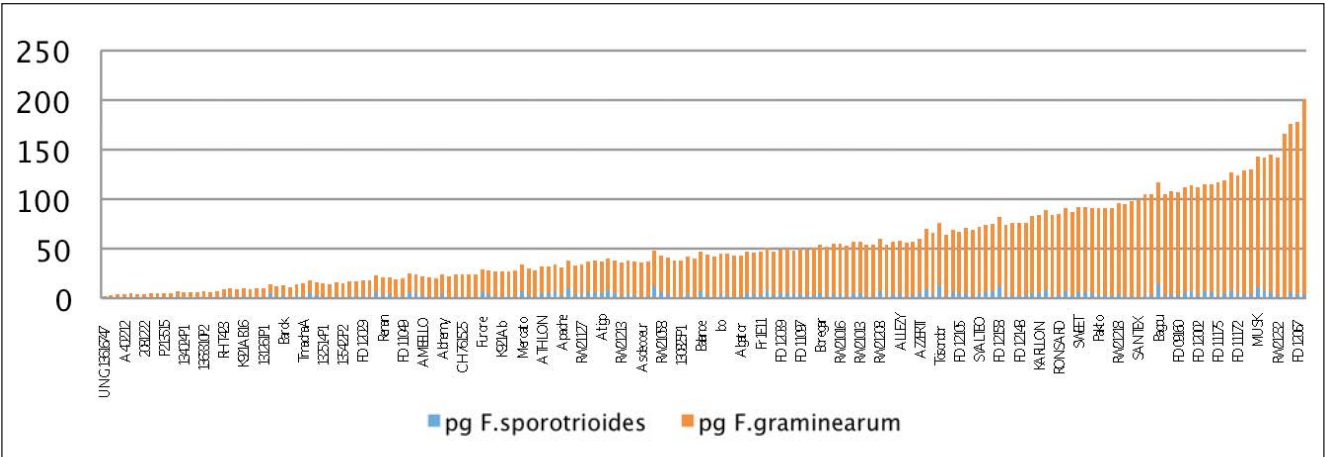
Les corrélations entre les différents mesures de résistance (sévérité (FHB, AUDPC et FDK), teneur en mycotoxines DON et T2-HT2, et quantité de champignons) sont toutes positives et élevées tout comme les coefficients de corrélation entre la résistance à différentes espèces de *Fusarium*.

La hauteur de la plante est corrélée négativement avec la résistance à *F. graminearum* (-0.61) et à *F. sporotrichioides* (-0.57) tandis que la rétention des anthères est corrélée positivement avec la résistance aux 2 espèces (0.63 et 0.51). La date de floraison n'a aucun impact sur la résistance aux 2 espèces (-0.03 et -0.04).

► Association génétique pour la réponse à la fusariose

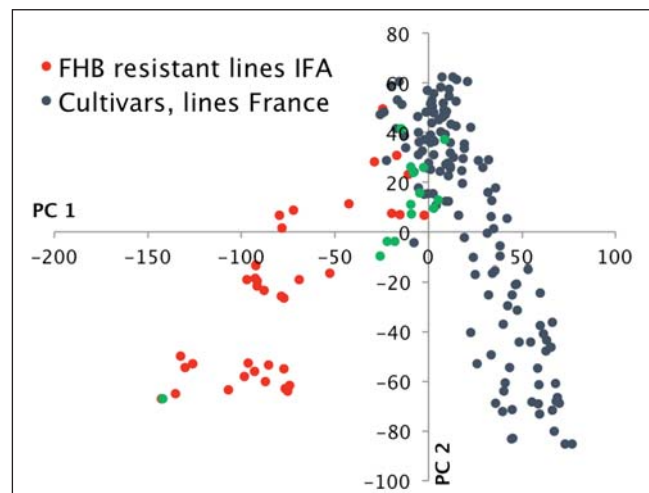
Associations marqueurs - caractères IFA 2013

La structure du panel a été étudiée à l'aide d'une analyse en coordonnées principales sur les données de génotypage. Les coordonnées sur les axes 1/2 séparent clairement le groupe des



Quantité d'ADN de champignon présent dans les échantillons inoculés en 2013 à l'IFA

cultivars du matériel génétique très résistant à la fusariose de l'IFA-Tulln (cf figure ci-dessous).



L'analyse des associations marqueur-caractères a révélé pour la plupart des caractères une dizaine de marqueurs avec une valeur de $p < 0,001$.

Pour l'inoculation avec *F. graminearum*, les marqueurs IAAV8952 (1B), cfn0616018 (2B) cfn3349111 (7A) et cfn0578972 (2A) présentent la plus forte association avec l'AUDPC, pour la teneur en DON les marqueurs les plus importants sont cfn0301796 (7A), cfn0506851 (1A), cfn2337440 (4A) et cfn0288097 (7D). Avec *F. sporotrichioides*, les associations les plus fortes avec l'AUDPC ont été trouvées pour cfn0698313 (3B), cfn0508215 (1A), cfn1576914 (2B), et cfn0542607 (1B), et pour la teneur en T2 + HT2 cfn0944112 (7D), cfn0537041 (1B), cfn2421028 (4B) et cfn2542103 (5A). Les zones 2A (95-99cM), 5B (120cM) et 7A (80-84cM) combinent plusieurs caractères de résistance et deux zones sont liées à la fois à la teneur en T2+HT2 et à la quantité de *F. sporotrichioides*.

Plusieurs régions de QTL d'échappement combinent des associations avec des caractères de résistance et des caractères morphologiques. Des zones des chromosomes 1B (39-40cM), 2B (61cM), 4A (144cM) combinent la résistance à la fusariose et la hauteur, trois zones liées à la hauteur sont spécifiques de la résistance à *F. sporotrichioides* : deux sur le chromosome 3 A (18-19 et 140-144cM) et une du 7D (184-185 cM). Sur le chromosome 1A, une zone (54.1cM) est associée à la sévérité de la fusariose, la teneur en toxine et la hauteur de la plante et une autre (0cM) à la résistance à la fusariose et à la rétention des anthères.

Associations marqueurs - caractères R2n 2011

L'analyse effectuée avec *F. graminearum* a révélé 730 marqueurs liés à l'AUDPC et avec *F. sporotrichioides* 1169 marqueurs sont liés à l'AUDPC. Cinq QTL qui expliquent entre 6 et 18% de la variation totale de la résistance montrent une association claire avec le phénotype des 85 lignées testées chez R2n et ont été validés sur les phénotypes testés par l'IFA en 2013.

Les lignées Apache, Bio4036, Oregrain, Graindor, K921Ab, K921AB18 et Miroir combinent les 5 QTL 1A, 2A, 2B, 3B et 4D.

Associations marqueurs - caractères Arvalis 2012

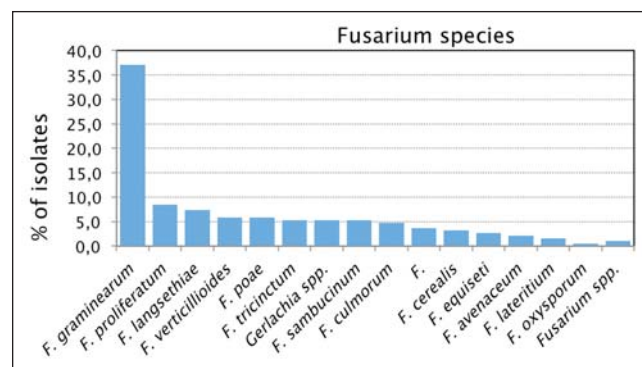
L'analyse a révélé 278 marqueurs liés à l'AUDPC obtenue avec *F. graminearum* et 435 marqueurs liés à l'AUDPC obtenue avec *F. sporotrichioides*. 59 marqueurs sont associés aux résistances aux deux espèces.

Pour la résistance à *F. graminearum*, aucun des marqueurs ne montre une association claire avec les phénotypes ; mais pour

la résistance à *F. sporotrichioides* une zone du chromosome 6BS qui réunit les marqueurs cfn0158300, cfn0129517, cfn0343707 et cfn0868525 montre une association nette avec le phénotype. Dix neuf génotypes présentent l'allèle résistant aux 4 marqueurs. Il s'agit de Adagio, Alligator, Altigo, Ambello, Altigo, As de cœur, Azzerti, Boregar, Cordiale, Isengrain, Mercato, Musik, Oxebo, Premio, Renan, Royssac, Sokal, Toisonor, UNG13616747 et X2056813.

Confirmant la faible corrélation entre lieux, aucune association commune n'a été mise en évidence entre les 3 lieux testés.

► Espèces de Fusarium provenant d'infection naturelle en France



F. graminearum (producteur de DON et de zéaralénone) est de loin l'espèce de *Fusarium* dominante en France. *F. langsethiae* (producteur de T2 et HT2) lié à *F. poae*, est la troisième espèce la plus fréquemment trouvée. *F. proliferatum* et *F. verticillioides* (producteurs des fumonisines et connus comme des agents pathogènes importants sur le maïs) apparaissent comme des agents pathogènes plutôt faibles sur le blé tendre tout comme *F. sporotrichioides* (producteur de T2 et HT2). La répartition des espèces observées en France est en accord avec la répartition des espèces de *Fusarium* présentes sur le blé en Europe (Boutigny *et al.*, 2014).

► Résistance de type III contre les trichothécènes de type A

Les trichothécènes DON, NIV, HT2 et T2 sont tous phytotoxiques sur le blé. Toutes les toxines provoquent des symptômes similaires à ceux induits par les espèces *Fusarium* (blanchiment des épillets, la propagation des symptômes du bas vers le haut, le flétrissement de la partie supérieure de l'épi dessus du point de traitement).

Quel que soit le solvant utilisé, une variabilité significative importante de la résistance aux 4 trichothécènes a été détectée et les lignées avec le gène de résistance *Fhb1* (20812.2.2, 20568.1.3, 20818.1.2, RHT423) montrent le niveau de résistance le plus élevé non seulement pour la DON, mais aussi pour les autres trichothécènes.

Il existe une différence importante de toxicité entre les trichothécènes : HT2 ≈ DON > NIV ≈ T2.

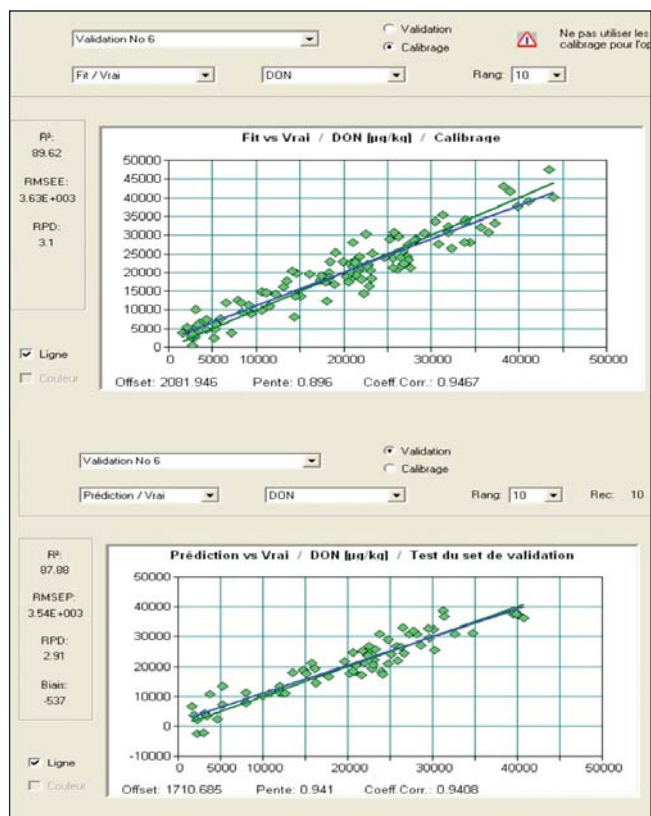
Il y a une relation étroite ($r =$ de 0.74 à 0.89) de la résistance des génotypes aux différents trichothécènes en utilisant le solvant non toxique.

► Utilisation du FT-NIR comme outil prédictif de la résistance

La mesure a été réalisée sur une boîte de Pétri en rotation. Deux mesures par échantillon ont été moyennées. La droite à été

construite à partir des spectres obtenus entre 4 605.4 et 4 242.8 cm⁻¹ ondes.

Une droite de calibration a été construite à partir des spectres obtenus sur les grains et les farines des génotypes inoculés en 2011 et 2012. La valeur de référence utilisée provenait des concentrations de DON obtenues par GC-MS/MS. Les concentrations varient de 116 à 43 500 µg/kg. Soixante dix pour cent des échantillons ont été utilisés pour la calibration et 30% pour la validation.



Bien que le coefficient de détermination (R^2) obtenu indique que la droite de calibration peut prédire une valeur approximative et que le standard deviation of reference data (RPD = 2.9) prouve que la classification obtenue serait acceptable mais grossière (Williams, 1997), la valeur de l'erreur de prédiction (RMSEP) est si élevée (36 300 µg/kg) qu'elle couvre une grande partie de la gamme de concentrations disponibles (116 à 43 500 µg/kg) : l'erreur est plus grande que les concentrations réelles de sorte que la droite de détermination ne peut pas être utilisée pour des prévisions réalistes. Ainsi, si la droite est utilisée pour la prédiction de DON à partir de génotypes inoculés par *F. sporotrichioides*, on obtient des prédictions négatives.

Girolamo *et al.*, (2009) avait obtenu des résultats similaires sur le coefficient de détermination d'échantillons de blé naturellement contaminés ($r^2 = 0.82$, RPD = 2.0); mais leur RMSEP était seulement de 348 µg/kg alors que la concentration de DON de leurs échantillons variait de 0 à 2 290 µg/kg. Pour l'industrie, la valeur seuil est située de 200 µg/kg à 1 250 µg/kg. Or dans cette gamme, la droite de prédiction obtenue n'est pas bonne et les erreurs d'estimation sont importantes. Avec le panel utilisé, inoculé artificiellement, les valeurs obtenues peuvent être jusqu'à 10 fois supérieures à celles obtenues avec une contamination naturelle. Ceci suggère que l'utilisation du FT-NIR pour la détermination de DON nécessiterait le développement d'une droite de calibration à partir d'échantillons naturellement contaminés pour être dans la bonne gamme de calibration.

4. Conclusions

Les résultats des 3 années sont cohérents et permettent d'identifier des parallèles entre la résistance au champignon et la contamination par les toxines.

Parmi les génotypes de blé d'hiver testés, il y a une grande variation génétique pour la sévérité de la fusariose mesurée par des symptômes visuels tout comme il y a une grande variabilité de la résistance aux quatre trichothécènes (DON, T2, HT2 et NIV). Les lignées avec le gène de résistance de type II *Fhb1* montrent un niveau de résistance plus élevé non seulement pour la DON, mais aussi pour les autres trichothécènes testés.

La sévérité de la maladie est plus prononcée avec *F. graminearum* qu'avec *F. sporotrichioides* et une différence significative de toxicité des trichothécènes a été observée (toxicité: HT2 ≈ DON > NIV ≈ T2).

La résistance à *F. graminearum* est fortement corrélée à la résistance à *F. sporotrichioides* et une relation étroite ($r=0.74$ à 0.89) entre la résistance des génotypes aux différents trichothécènes a été observée. La teneur en mycotoxines est élevée et cohérente avec le champignon inoculé: l'inoculation avec *F. graminearum* conduit à la contamination par de la DON et l'inoculation par *F. sporotrichioides* à la contamination par T2 et HT2.

Ni la hauteur de la plante ni la date d'épiaison ne sont systématiquement associées à la réponse à la fusariose. Même si les lignées hautes ont tendance à être moins atteintes, plusieurs génotypes avec une paille courte présentent une bonne résistance à la fusariose et des génotypes résistants ont été trouvés dans toutes les classes de précocité.

L'extrusion des anthères est négativement corrélée avec la sévérité de la fusariose, les lignées qui expulsent la plupart ou la totalité de leurs anthères peu de temps après la floraison sont moins fusariées que les lignées qui conservent leurs anthères dans les fleurs. Une extrusion des anthères rapide et complète pourrait être un élément de résistance passive chez le blé. Une sélection pour une extrusion des anthères élevée semble une cible de la sélection indirecte prometteuse pour une faible sensibilité à la fusariose.

La teneur en ADN fongique a montré une bonne corrélation avec la sévérité des symptômes de *Fusarium* sur les épis et les grains (0.53-0.58) et avec la contamination par les mycotoxines (0.61-0.78). La qPCR est donc un outil efficace pour suivre la résistance dans les essais. Le FT-NIR ne semble, par contre, pas adapté au suivi des concentrations très faibles de toxines à détecter.

Bien que *F. graminearum* soit l'espèce la plus répandue dans les échantillons naturellement infectés en France (prévalence > 35%), les espèces productrices de T2 et HT2 *F. langsethiae* (8%) et *F. sporotrichioides* (4%) représentaient, ensemble, 12% des isolats de *Fusarium* identifiés. Cela représente une menace non négligeable pour la sécurité alimentaire du blé, car T2 et HT2 sont considérés comme beaucoup plus toxiques que la DON. De plus sous la pression élevée de la maladie au niveau des lignées sensibles dans les parcelles ensemencées par *F. sporotrichioides*, *F. graminearum* et de la DON ont été trouvés, indiquant l'existence de fonds d'infections «naturels».

La recherche d'association avec un très grand nombre de marqueurs est complexe et nécessite une grande rigueur dans l'interprétation des résultats. Très peu de marqueurs ont montré une forte association avec des symptômes de fusariose. La résistance à la fusariose dans ce panel de lignées semble régi par de multiples QTL à effet relativement faible et hautement spécifiques du milieu et de l'année.

Références bibliographiques

Boutigny A-L, Ward T.J., Ballois N., Iancu G., Ioss R. (2014). Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. *European Journal of Plant Pathology* 138:133-148.

De Girolamo A., Lippolis V., Nordkvist E., Visconti A. (2009). Rapid and non invasive analysis of deoxynivalenol in durum and common wheat by Fourier-Transform Near Infrared (FT-NIR) spectroscopy. *Food Additives and Contaminants A* 26:907-917.

Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O. (1983). *Fusarium species: an illustrated manual for identification*. The Pennsylvania State University Press, University Park and London.

Nirenberg H. (1981). A simplified method for identifying *Fusarium spp.* occurring on wheat. *Canadian Journal of Botany* 59:1599-1609.

Williams P. C. (1997). Recent advances in near-infrared applications for the agricultural and food industries. *Proceedings: International Wheat Quality Conference. Manhattan, Kans.* Manhattan, Kans., Grain Industry Alliance.

Constitution d'une mycothèque des champignons pathogènes du blé tendre et mise au point d'outils permettant la caractérisation et la quantification de ces espèces

Romain VALADE¹, Cindy VITRY¹, Stephen LEITE¹, Jayne STRAGLIATI², Patrice SENELLART³, Benoit FOUCAULT⁴, Stephen SUNDERWIRTH⁴, Philippe LONNET⁵, Thierry LANGIN⁶, Laetitia PINSON-GADAIS⁷, Vessela ATANASOVA⁷, Pierre GEORGE⁸, Jean-Philippe MAIGNIEL⁹, Rodolphe VADAINÉ¹⁰, Valérie CADOT¹⁰, Hélène BATINA¹¹, Valérie LAVAL¹¹, Julie FERREYROLLE^{1 et 5*}

1 – Arvalis-Institut du végétal. Laboratoire de pathologie végétale. Avenue Lucien Brétignières, Bât Bioger-CPP, 78850 Thiverval-Grignon

2 – Limagrain Europe. Site de Chartainvilliers, 5 rue de l'égalité, 28130 Chartainvilliers. (Représentant l'UFS)

3 – Syngenta France SAS. Ferme de Moyencourt, 78910 Orgerus. (Représentant l'UFS)

4 – SARL Adrien Momont et fils. Rue Maurice Violette, 28150 Allonnes (Représentant l'UFS)

5 – Florimond-Desprez. 59242 Cappelle-en-Pévèle (Représentant l'UFS)

6 – INRA. UMR1095 GDEC. 5 chemin de Beaulieu. 63039 Clermont-Ferrand.

7 – INRA. UR1264 MycSA, 1 avenue Edouard Bourlaux, F-33 883 Villenave d'Ornon, France

8 – Biogemma. Plateforme de Phénotypage et de pathologie végétale – 6, chemin de Panedautes, 31700 Mondonville

9 – GEVES. 25 rue Georges Morel - 49071 Beaucaudé cedex

10 – GEVES. Unité expérimentale de l'Anjouère. Domaine de l'Anjouère, 49370 La Pouëze

11 – INRA. UR1290 BIOGER-CPP, Avenue Lucien Brétignières, 78850 Thiverval-Grignon

* **Coordinateur Julie FERREYROLLE**, julie.ferreyrolle@groupsud.com, Tel. : 04.66.02.21.21, Tel. : 06.03.83.36.11

1. Introduction

Le blé tendre (*Triticum aestivum*) est sujet à de nombreuses maladies (piétin verse, piétin échaudage et fusarioses au niveau du pied, rouilles jaune et brune, helminthosporiose et septorioses sur les feuilles, fusarioses de l'épi) qui se développent à différents stades causant des pertes de rendement importantes et des problèmes de qualité sanitaire (production de mycotoxines). Si l'amélioration de la tolérance des variétés, les pratiques culturales et les traitements fongicides ont permis de poursuivre la progression des rendements (rendement national moyen en 2013 de 74 qx/ha selon FranceAgriMer) et une bonne qualité du grain, il est nécessaire d'intensifier les travaux afin de caractériser les variétés vis-à-vis des agents pathogènes et de fournir des outils efficaces aux sélectionneurs. L'apparition de champignons pathogènes résistants aux traitements fongicides, l'érosion de la durabilité des tolérances des variétés ainsi que les contraintes actuelles sur l'usage des produits phytosanitaires en agriculture (plan ECOPHYTO) ont créé un contexte difficile dans lequel la prédiction et l'évaluation des comportements variétaux vis-à-vis de la résistance aux maladies prennent une place prépondérante. La caractérisation des variétés de blé tendre pour leur tolérance aux maladies implique une connaissance des populations actuelles de champignons pathogènes, de leurs modes de croissance et de conservation, des symptômes générés, allant jusqu'à la maîtrise de la contamination artificielle. De surcroît, ces études nécessitent le développement d'outils fiables permettant d'observer et de quantifier les différences de comportement des variétés.

Le premier enjeu de ce projet a été la constitution d'une mycothèque de souches actuelles représentatives des différentes espèces de champignons pathogènes du blé tendre et l'identification des meilleures méthodes permettant leur isolement et leur conservation au cours du temps. Le second enjeu de cette étude a été le développement d'outils permettant la caractérisation (taxonomique, génétique et potentiel toxigène) et la quantification des différentes espèces de champignons pathogènes du blé. Des travaux ont également

été réalisés sur la mise au point d'une méthode de phénotypage par imageur multispectral. Enfin, l'intérêt de ces outils pour la sélection variétale a été évalué en plein champ.

2. Constitution d'une mycothèque des champignons pathogènes du blé

► 2.1 Constitution de la mycothèque

Il a été choisi de constituer une mycothèque composée des espèces de champignons nuisibles auxquels les cultures de blé sont le plus souvent confrontés (hors champignons biotrophes tels que les rouilles) : fusarioses causées par *Fusarium spp.*, *Microdochium spp.*, septorioses causées par *Zymoseptoria tritici* et *Phaeosphaeria nodorum*, l'helminthosporiose causée par *Pyrenophora tritici-repentis*, le piétin verse causée par *Oculimacula spp.*, le piétin échaudage causée par *Gaeumannomyces graminis var. tritici* et le rhizoctone causée par *Rhizoctonia cerealis*.

Les différents partenaires ont fourni des souches déjà disponibles et des isollements ont été réalisés à partir de plantes symptomatiques lors des trois années du projet. Au total, 151 souches correspondant à 14 espèces ont été isolées, purifiées, monosporées et constituent la mycothèque. Les espèces les plus représentées sont *F. graminearum*, *F. culmorum*, *Microdochium spp.* et *Z. tritici* qui sont les agents pathogènes les plus représentatifs des maladies sur blé tendre à l'heure actuelle (hors rouilles). Cette mycothèque est stockée en trois exemplaires distincts (Arvalis-Institut du végétal, Biogemma, GEVES-SNES) afin d'éviter tout risque de perte. L'ensemble des données disponibles sur les souches est accessible pour les partenaires sur la base R-syst (<http://138.102.89.203/champsys/>).

Cette banque, pérenne et accessible aux acteurs de la sélection variétale, génère à la fois une connaissance sur les souches actuelles de champignons pathogènes du blé tendre et une importante source d'inoculi pouvant être employée de manière concrète pour phénotyper les essais de sélection variétale vis-à-vis des résistances aux maladies ciblées.

La création d'une mycothèque est assez facile mais l'entretien et la conservation des souches sur le long terme est souvent problématique. Dans ce projet, nous avons évalué des protocoles de conservation des souches afin d'assurer la pérennité de la collection.

► 2.2. Méthodes de conservation des isolats

2.2.1 Matériel et Méthodes

Deux genres particulièrement bien représentés ont été choisis pour évaluer les protocoles de conservation : le genre *Fusarium* (5 espèces, 51 isolats) et le genre *Zymoseptoria* (1 espèce, 11 isolats). 3 protocoles de conservation des isolats ont été testés :

- dans du glycérol 20% à -80°C
- dans du glycérol 50% à -80°C
- sans substance cryoprotectante (uniquement *Z. tritici*).

Pour chacun de ces protocoles, nous avons évalué la forme de conservation (spore ou mycélium) la plus adaptée pour maintenir les capacités de sporulation et d'agressivité des différentes souches après 8 jours, 1 mois, 6 mois et 1 an de congélation.

2.2.2 Résultats

- Conservation de *Fusarium spp.* sous forme de spores :

Pour les deux concentrations de glycérol étudiées, certaines souches survivent mal sous la forme de spores. A la plus forte concentration de glycérol (50%), jusqu'à 50% des souches peuvent être perdues et cela dès 8 jours de congélation. Le temps de conservation n'influe pas sur le nombre de souches qui survivent.

- Conservation de *Fusarium spp.* sous forme mycélienne :

Indépendamment de l'espèce, toutes les souches se sont développées après une conservation à -80°C pendant 8 jours, 1 mois, 6 mois ou 1 an. Le diamètre moyen des colonies après 4 jours de culture est présenté Figure 1. La vitesse de croissance diffère d'une espèce à l'autre et les souches conservées dans du glycérol 50% ont une croissance plus lente. Après plusieurs jours de culture, toutes les souches de toutes les espèces ont complètement envahi la boîte de culture, indépendamment du temps de conservation à -80°C.

- Conservation des souches de *Z. tritici* :

In vitro, sur milieu malt agar, *Z. tritici* ne se développe pas sous forme mycélienne mais sous sa forme levure. Cette forme levure se présente sous forme d'une 'pâte' laiteuse de couleur marron clair/rosé qui peut être stockée sans substance cryoprotectante.

Les souches de *Z. tritici* se sont très mal conservées sous forme de spores dans le glycérol 50%. En effet, les taux de survie ont été faibles, inférieurs à 0.16. Pour les conservations sans cryoprotectant et avec 20% de glycérol, les taux de survie sont meilleurs et toutes les souches ont fini par coloniser le milieu gélosé. Dans les trois méthodes de conservation, une forte variabilité a été observée entre les souches (Figure 2).

2.2.3 Conclusions

Les espèces de *Fusarium* supportent bien la conservation à -80°C sous forme mycélienne sur un an contrairement aux spores où la perte est très variable selon les souches et indépendante du temps de conservation. La croissance est plus rapide quand la conservation a été effectuée dans du glycérol 20%.

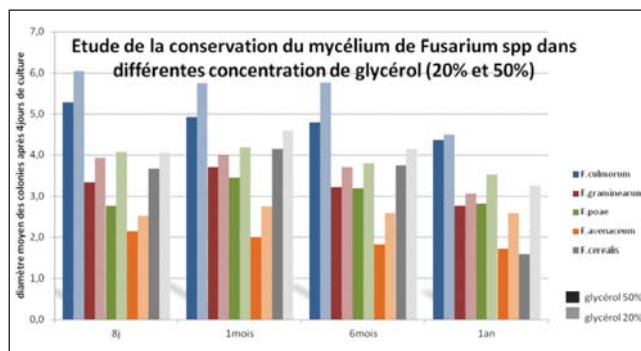


Figure 1 : mesure de la croissance des souches de *Fusarium spp.*, conservées à -80°C à 4 jours de culture. Le diamètre moyen des colonies est présenté pour toutes les espèces de *Fusarium* testées. Les barres pleines représentent les souches conservées dans du glycérol 50% et les barres hachurées celles conservées dans du glycérol 20%. Les analyses ont été effectuées à 8 jours (8J), 1 mois (1M), 6 mois (6M) et 1 an de congélation.

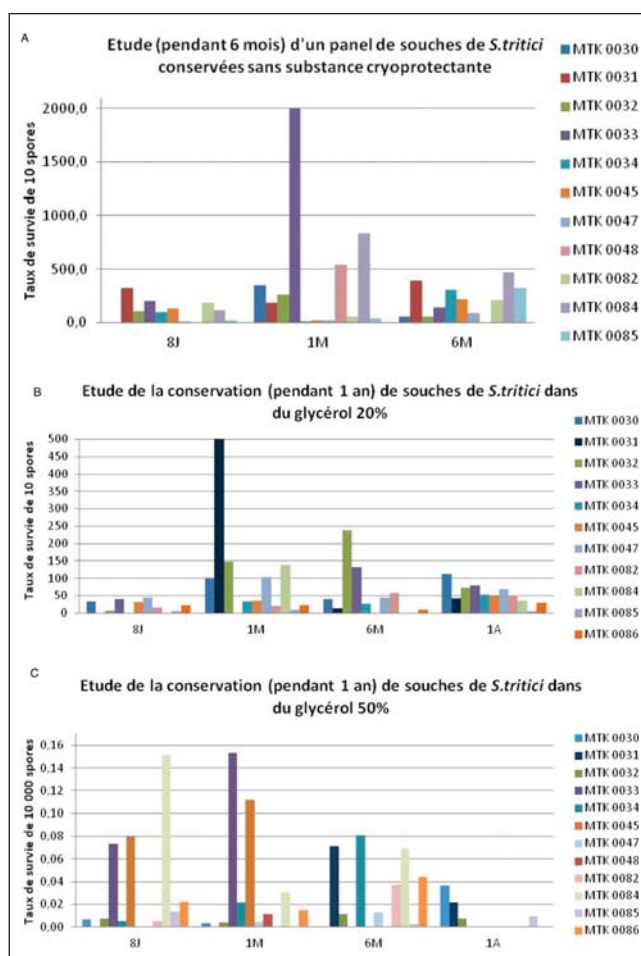


Figure 2 : mesure du taux de survie des spores de *Z. tritici* après congélation sans substance cryoprotectante (A), dans du glycérol 20% (B), dans du glycérol 50% (C). Le taux de survie est présenté pour toutes les souches à 8 jours (8J), 1 mois (1M), 6 mois (6M), et 1 an (1A).

La conservation des souches de *Z. tritici* ne doit pas se faire dans 50% de glycérol. La conservation sans cryoprotectant est rapide, peu coûteuse et efficace puisque toutes les souches sont reparties. La conservation des spores dans 20% de glycérol est également efficace.

Une fiche technique pour la conservation de ces genres a été mise à disposition des partenaires (Annexes 1 et 2).

► 2.3. Aggressivité des souches après conservation

2.3.1 Matériel et Méthodes

L'espèce *Fusarium graminearum*, particulièrement bien représentée a été choisie pour évaluer l'agressivité après conservation : 4 méthodes de conservation ont été comparées : repiquage régulier sur milieu solide (plug), conservation sous huile à température ambiante, congelé à -80°C et congelé sous azote liquide. Le test a consisté à produire un inoculum liquide d'une concentration de spores connues à partir des 4 conservations pour 9 souches sélectionnées pour leurs origines variées. L'agressivité a été évaluée en serre sur les variétés Apache et Altigo. Les épis ont été inoculés à floraison par pulvérisation des spores. L'évolution des symptômes a été notée une fois par semaine pendant 1 mois après infection.

2.3.2 Résultats

Les tests effectués ont mis en évidence des différences d'agressivité entre les souches pour un génotype donné mais également selon la tolérance du génotype infecté.

La comparaison des méthodes sur la base du taux maximum de symptômes obtenus 28 jours après infection sur un génotype tolérant (Apache) a révélé des différences en fonction de la méthode de conservation (Figure 3). Pour certaines des souches étudiées, les méthodes de conservation sont comparables mais pour 4 souches, l'agressivité peut se trouver réduite (jusqu'à 40%). Cette baisse d'agressivité a été observée dans le cas d'une conservation par repiquages successifs (plugs) ou d'une conservation en huile.

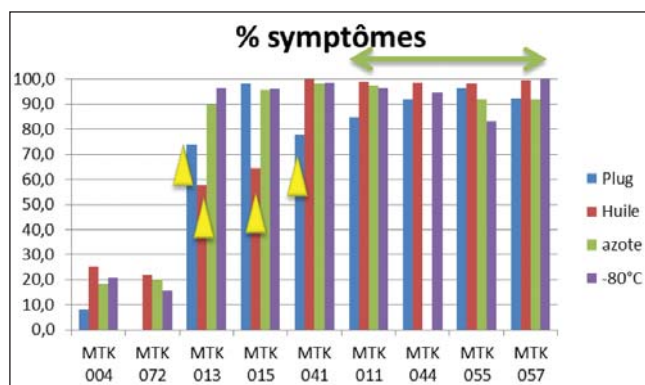


Figure 3 : % symptômes obtenus (par rapport au maximum observé) en fonction des 4 méthodes de conservation (plug, huile, azote, -80°C) pour les 9 souches de *F. graminearum* inoculées sur Apache.

2.3.3 Conclusion

Il apparaît donc important de privilégier la congélation soit à -80°C soit sous azote liquide pour assurer le maintien de l'agressivité des souches de *Fusarium graminearum* dans le temps.

3. Développement d'outils de caractérisation des isolats

► 3.1. Caractérisation taxonomique des isolats

Certaines espèces fongiques sont difficilement identifiables par des caractères taxonomiques classiques (morphologie) qui peuvent être soit difficiles à observer, soit faiblement discriminants. Dans ces cas, des marqueurs moléculaires taxonomiques (gènes bar code, gènes pour analyses phylogénétiques), sont utilisés pour identifier de manière précise

les espèces auxquelles appartiennent les différents isolats étudiés. De nombreuses initiatives nationales (R-Syst) et internationales (IBOL) consacrent leurs efforts à réunir les informations de taxonomie moléculaire et morphologique. Ces bases de données permettent de développer des outils de diagnostic et d'identification d'espèce performants en s'appuyant sur les gènes barcode connus.

Afin de valider la détermination morphologique des souches déposées dans la mycothèque, une caractérisation moléculaire de chaque souche de la mycothèque a été effectuée. L'objectif est de donner à chaque souche un marqueur barcode, la séquence de l'Internal Transcribed Spacer (ITS) de l'ADN ribosomique. Ce gène a été choisi car il est à présent le barcode officiel et référent pour les champignons (Schoch *et al.*, 2012). Le gène ITS, bien que permettant de déterminer l'espèce d'appartenance des souches dans la plupart des cas, n'est pas taxonomiquement résolutif pour le genre *Fusarium*. Ainsi, pour le genre *Fusarium*, le gène EF1 alpha, plus résolutif, a été amplifié et séquencé.

L'ensemble des séquences obtenues une fois analysées et nettoyées ont été déposées dans la base de données R-Syst et sont accessibles aux partenaires du projet via le web. De plus, les séquences obtenues dans ce projet alimentent la base qui permet de produire des outils de plus en plus spécifiques au fur et à mesure que le nombre de séquences augmentent.

► 3.2. Caractérisation génotypique des isolats

En complément des données de taxonomie moléculaire, les isolats de *Z. tritici*, ont été génotypés à l'aide de marqueurs moléculaires microsatellites par une méthode développée lors d'un précédent projet FSOV (Gautier *et al.*, 2014, FSOV 2008 H).

Chaque isolat génotypé a au moins un allèle qui le différencie des autres. Ainsi, les isolats de *Z. tritici* constituant la mycothèque correspondent à des souches distinctes qui grâce aux marqueurs microsatellites pourraient être suivies dans des essais inoculés et différenciés de l'allo-inoculum.

► 3.3. Caractérisation du potentiel toxigène des isolats

Parmi les différents agents pathogènes du blé tendre, certaines espèces sont connues pour leur production de mycotoxines. Les espèces du genre *Fusarium spp.* sont les principales responsables de la présence de mycotoxines dans le grain à la récolte (Trichothécènes A et B, Enniatines, Beauvericine...). Ainsi, les souches de *Fusarium spp.* de la mycothèque ont été caractérisées pour leur potentiel toxigène par une approche moléculaire, ou biochimique quand les tests moléculaires n'ont pu être définis.

3.3.1 Définition d'outils moléculaires de caractérisation du type de toxines potentiellement produites par une souche donnée.

Des outils de caractérisation et quantification moléculaire (qPCR) des souches productrices de trichothécènes A et B (TCT), d'enniatiens (ENN) et beauvericine (BEA) ont été développés dans ce projet.

Un outil spécifique des chénotypes de TCTB (DON/15ADON, DON/3ADON et NIV/FX) basé sur le gène Tri12 et un outil TCTA (T2/HT2 +DAS/MAS) basé sur le gène Tri16 ont été validés. Le gène Tri16 est un gène impliqué uniquement dans la voie de biosynthèse des TCTA (Kimura *et al.*, 2007 ; Peplow *et al.*, 2003). Le gène Tri12 code pour un transporteur membranaire spécifique des TCTs (Alexander *et al.*, 1999). En ce qui concerne

les TCTA, un outil permettant de quantifier spécifiquement les producteurs de T2/HT2 a été validé. Ces outils ont été développés en technologie TaqMan avec des sondes FAM/BBQ.

De même, le développement d'outils permettant d'identifier et de quantifier les *Fusarium* producteurs d'ENNs et BEA a été mené. Un seul gène a jusqu'à présent été décrit comme impliqué dans la biosynthèse d'ENNs, *esyn1* (Kulik *et al.*, 2007, 2011 ; Nicholson *et al.* 2004). Une analyse comparée des séquences disponibles pour ce gène chez toute une gamme de souches potentiellement productrices d'ENNs a mis en évidence l'impossibilité de définir un outil commun à l'ensemble des espèces fusariennes capables de produire des ENNs. Dans un premier temps quatre couples d'amorces ont ainsi été définis et ont été analysés. Un seul couple d'amorces (AVE/SCRIPI) a permis d'amplifier quatre espèces suivantes : *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. tricinctum* et *F. temperatum*. Pour les autres espèces productrices d'ENNs et/ou BEA (*F. sporotrichioides*, *F. equesiti*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*), le produit d'amplification est spécifique mais se fait tardivement. Nous avons essayé d'augmenter la spécificité et gagner de la sensibilité en développant des sondes TaqMan (FAM/BBQ) avec le couple d'amorces AVE/SCRIPI. Ainsi trois sondes TaqMan ont été testées avec ces amorces AVE/SCRIPI :

- sonde 1 : spécifique de *F. acuminatum*, *F. tricinctum* et *F. avenaceum*,
- sonde 2 : spécifique de *F. poae* et *F. sporotrichioides*,
- sonde 3 : spécifique de *F. proliferatum* et *F. oxysporum*.

Seule la sonde 1 avec les amorces AVE/SCRIPI a permis d'obtenir une amplification pour les espèces de *F. acuminatum*, *F. avenaceum* et *F. tricinctum* avec des CT (Cycle Threshold) et des efficacités pour les trois espèces proches. Cette sonde 1 FAM/BBQ + les amorces AVE/SCRIPI permet une bonne identification et quantification dans une matrice complexe comme le blé. L'outil permet donc de quantifier 3 des 7 espèces de *Fusarium* producteurs d'ENNs et/ ou BEA retrouvés sur blé. Dans la littérature des amorces et une sonde spécifiques à l'amplification de *F. poae* ont été développées. Ces amorces et cette sonde seront testées pour essayer de faire un multiplexage avec l'outil développé pour *F. avenaceum*, *F. tricinctum* et *F. acuminatum*. Ainsi nous pourrions détecter et quantifier les 4 espèces majoritairement présentes sur blé productrices d'ENNs et BEA.

3.3.2 Mise au point et validation de méthodes d'extraction et d'analyse de toxines émergentes : enniatines, beauvericine et moniliformine

Nous avons également mis au point et validé les méthodes d'extraction et d'analyse de la beauvericine, des enniatines et de la moniliformine considérées comme des toxines "émergentes".

La moniliformine est extraite par un mélange acétonitrile / eau. L'extrait est évaporé, repris dans du méthanol et purifié sur colonne Strata Sax de PHENOMENEX. Puis la moniliformine est éluée par de l'acide chlorhydrique. L'extrait est de nouveau évaporé et repris avec une solution acétonitrile/eau pour être analysé par HPLC UV.

L'extraction d'ENNs et BEA se fait par un mélange d'acétonitrile / eau. L'extrait est évaporé et repris avec une solution acétonitrile/eau pour être analysé. Nous avons testé deux modes de détections pour ces toxines : par spectrométrie de masse et DAD. Nous avons opté pour la détection par spectrométrie de masse compte tenue d'une plus grande spécificité par ce mode de détection.

3.3.3 Caractérisation du potentiel toxigène des isolats de la mycothèque

La mise au point des outils moléculaires, et des méthodes d'extraction et d'analyse des toxines dites "émergentes", a permis la caractérisation du potentiel toxigène des souches de la mycothèque et la comparaison des 2 méthodes

• Moléculairement :

Grâce aux outils définis, nous avons pu caractériser le chémotype en TCTB, des 69 souches de *F. graminearum*, *F. culmorum* et *F. crookwellense* de ce projet.

48 souches de *F. graminearum* sont de chémotype DON/15ADON, 3 souches de chémotype NIV/FX et 1 souche de chémotype DON/3ADON. Pour les souches de l'espèce *F. culmorum* 10 souches sont de chémotype DON/3ADON et 9 souches de chémotype NIV/FX. Les deux souches de *F. crookwellense* sont de chémotype NIV/FX.

Ces résultats sont en accord avec la littérature. En effet les souches de *F. graminearum* présentes en Europe peuvent être de deux chémotypes soit DON/15ADON soit NIV/FX (Boutigny *et al.*, 2014, Yli-Mattila 2010, Wang *et al.*, 2008) avec une fréquence beaucoup plus importante des souches de *F. graminearum* de chémotype DON/15ADON. La souche de *F. graminearum* chémotypée DON/3ADON est à confirmer par caractérisation biochimique de son potentiel toxigène car ce chémotype n'est pas encore rencontrée en France, bien que quelques souches aient été récemment isolées en Angleterre (2011) (Communication personnelle Ryan Basler). Chez *F. culmorum*, deux chémotypes existent : le DON/3ADON et le NIV/FX. Chez les souches de *F. crookwellense*, seul le chémotype NIV existe.

• Biochimiquement :

Dans plusieurs publications (Duverger *et al.*, 2011, Greenhalgh *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 2013), il a été montré que le potentiel toxigène des souches était plus important *in vitro* sur substrat riz. Ainsi, pour caractériser au mieux le potentiel toxigène des souches, nous avons testé plusieurs substrats de culture :

- le riz et le maïs pour les souches de *F. poae* et *F. avenaceum* producteurs de toxines "émergentes",
- le blé et le riz pour les souches de *F. graminearum* et *F. culmorum* producteurs de TCTB.

Nous avons ainsi comparé ces substrats sur un panel de 6 souches pour chacune de ces quatre espèces.

F. poae et *F. avenaceum* sont connus pour être des producteurs de BEA et ENNs. Actuellement pour ces deux espèces, il existe très peu d'études sur l'évaluation de leur capacité à produire ces toxines et leur variabilité intra-spécifique et inter-spécifique :

F. avenaceum : 5 des 6 souches produisent les quatre types d'ENNS (A1, A, B, B1) avec majoritairement de l'ENNS B1 et B. Les niveaux de productions sont très importants, pouvant aller jusqu'à 225 000µg/Kg. Pour cette espèce et ce type de toxine, la production a été meilleure sur le substrat riz.

F. poae : 3 des 6 souches produisent de l'ENN et exclusivement de l'ENN A. Les souches de *F. poae* sont des souches faiblement productrices d'ENNS (2 à 50µg/Kg) comparativement aux souches de *F. avenaceum*. Pour les souches de *F. poae*, les deux substrats semblent convenir pour la caractérisation du potentiel toxigène.

Pour la BEA, toutes les souches de *F. avenaceum* produisent de la BEA mais en faible quantité (de 5µg/Kg à 30µg/Kg) alors que toutes les souches de *F. poae* en produisent de fortes quantités (de 10 000µg à 25 000µg/Kg). Le substrat affecte peu la capacité des souches de *F. poae* ou *F. avenaceum* à produire de la BEA.

Aucune des souches des deux espèces ne produit de la moniliformine.

Pour les souches de *F. graminearum* et *F. culmorum*, la production de TCTB est meilleure sur le substrat riz que sur blé (Figure 4) alors que la production de zéaralénone ne semble pas impactée par le substrat.

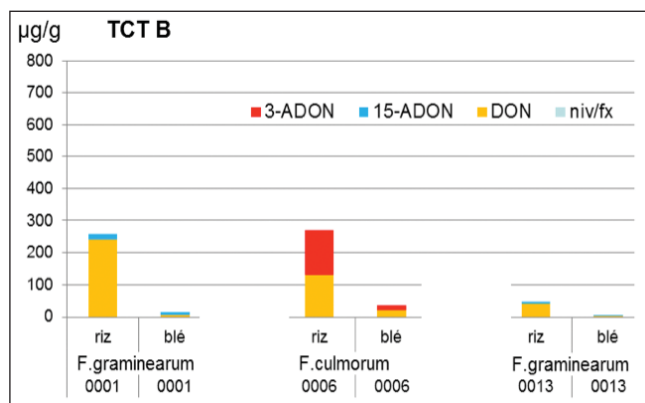


Figure 4 : Production de TCTB (3aDON, 15aDON, DON, niv/fx) en µg/g en fonction du substrat (riz ou blé) pour 2 souches de *F. graminearum* et une souche de *F. culmorum*

• Comparaison des deux méthodes :

Les souches constituant la mycothèque ont toutes été chémotypées moléculairement et biochimiquement en TCTB. Les résultats du chémotypage biochimique est cohérent avec celui déterminé moléculairement pour pratiquement toutes les souches, à l'exception de 6 souches sur les 51 analysées. Pour ces souches nous avons moléculairement déterminé un chémotype NIV/FX et nous avons biochimiquement une production de DON faible. Deux de ces souches : MTK 072 et MTK 0076 ont été également chémotypées moléculairement dans le cadre d'un autre projet (coll. Todd Ward, USDA), avec un résultat similaire au nôtre (chémotype NIV). Les analyses biochimiques de ces souches ont été ré-analysées, et ont confirmé la présence de DON. De nouvelles expériences doivent être menées afin de comprendre la différence observée.

Ainsi toutes les souches de *Fusarium* disponibles dans la mycothèque pour les différents partenaires de ce projet sont parfaitement caractérisées (caractérisation taxonomique, génotypique et potentiel toxigène). Des outils moléculaires permettant la quantification des *Fusarium* appartenant aux deux grands types de producteurs TCTB, TCTA ont été définis. Avec un outil moléculaire permettant de caractériser le chémotype de la souche chez les *Fusarium* producteurs de TCTB (DON/15ADON, DON/3ADON et NIV/FX). Quant à l'outil permettant la quantification des *Fusarium* producteurs de ENN et BEA, il cible pour l'instant 3 des 7 espèces de *Fusarium* (*F. avenaceum*, *F. tricinatum* et *F. acuminatum*) producteurs de ENNs et BEA retrouvées sur blé. Ces trois espèces sont avec *F. poae*, les quatre espèces majoritaires retrouvées sur blé.

► 3.4. Mise au point de la quantification des différentes espèces de champignons pathogènes

Des outils moléculaires de quantification de la biomasse fongique (qPCR) pour différentes espèces ont été développés, internalisés ou validés dans les différents laboratoires des partenaires. En effet, l'isolement d'un grand nombre de souches bien déterminées et caractérisées a permis de valider la spécificité des méthodes moléculaires qui étaient en cours de développement dans les différents laboratoires. Ainsi, des méthodes qPCR pour sept

espèces de *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. avenaceum*, *F. langsethiae*, *F. tricinatum*, *F. sporotrichioides*) et deux espèces de *Microdochium* (*M. majus*, *M. nivale*) ont pu être validées (Elbelt *et al.* submitted).

Une nouvelle méthode qPCR spécifique de *Z. tritici* a également été mise au point lors de ce projet. Des méthodes qPCR pour *Z. tritici* déjà publiées ont été évaluées dans un projet FSOV précédent (D. Gouache *et al.*, FSOV 2008 H). Ces méthodes présentent des niveaux de spécificité et sensibilité qui sont variables. Ainsi, une nouvelle méthode plus spécifique basée sur la technologie TaqMAN avec comme cible un gène nucléaire monocopie codant pour la mannitol déshydrogénase a été validée selon les directives de la norme AFNOR V03-110 et du protocole d'accréditation Cofrac pour la détection d'OGM (Ferreyrolle *et al.* in prep).

Ces outils moléculaires sont disponibles pour l'ensemble des partenaires et ont été appliqués et évalués, pour certains, pour leur utilité dans l'aide à la sélection variétale et pour caractériser la sensibilité variétale du blé tendre.

4. Applications à la sélection variétale

► 4.1 Outils moléculaires

Les outils moléculaires développés et validés au cours de ce projet ont été appliqués à des essais au champ pour évaluer l'intérêt de ces méthodes dans la caractérisation variétale du blé tendre face à leurs principaux agents pathogènes. L'objectif a été de déterminer si une relation existe entre les notations habituellement effectuées par des observations visuelles des symptômes (qui sont fastidieuses voire impossibles notamment quand plusieurs maladies sont présentes sur les mêmes organes), les rendements et la quantité d'ADN du champignon ciblé. Dans le projet, nous avons ciblé deux maladies principales qui sont les fusarioses causées par *F. graminearum* et *Microdochium spp.* et la septoriose causée par *Z. tritici*.

4.1.1 Matériels et méthodes

• Septoriose

10 variétés de blé tendre (Tableau 1) couvrant la gamme de sensibilité à la septoriose ont été implantées en microparcelles en 2012 sur 5 lieux dans un dispositif à deux répétitions sous des conditions de contamination naturelle. En 2013, les mêmes variétés ont été implantées dans 6 lieux en deux répétitions inoculées indépendamment par 4 souches de *Z. tritici* et deux répétitions non inoculées. Les 4 souches (MTK031, MTK046, MTK084 et la IPO09415-MSI) ont été inoculées à 3 dates au stade Z39.

Deux notations globales ont été réalisées ; la première dès que les deux témoins sensibles ont présenté des symptômes sur la F2 définitive et la seconde au stade Z75. A chaque stade de notation et suite à la notation globale, des prélèvements de 25 feuilles pour chaque étage foliaire (F1, F2 et F3) ont été effectués. Sur ces feuilles, une seconde notation détaillée par étage foliaire (F1, F2 et F3 définitives) a été effectuée. 5 feuilles de chaque étage foliaire ont été regroupées pour créer un échantillon moyen qui a été ensuite analysé par la PCR quantitative développée pendant le projet. La présence du champignon a également été quantifiée pour chaque étage foliaire séparément (15 feuilles / échantillon) afin de déterminer les étages foliaires les plus représentatifs de la sensibilité variétale avec la méthode moléculaire.

En 2012, dans des conditions de contamination naturelle, deux lieux avec une pression de septoriose discriminante ont pu être analysés (Allonnes, 28 et Premesques, 59). En 2013, les deux lieux analysés sont situés dans le 28. Dans les autres lieux, le

témoin non-inoculé a été soit fortement attaqué soit d'autres champignons comme la rouille brune ont empêché les notations.

• Fusariose

10 variétés de blé tendre (Tableau 1) couvrant la gamme de sensibilité à la fusariose ont été implantées en microparcelles en 2012 sur 6 lieux dans un dispositif à deux répétitions avec cannes de maïs afin de faciliter la contamination. En 2013, 4 essais ont été réalisés avec les mêmes variétés mais contaminées artificiellement sous un dispositif de brumisation avec trois souches différentes (2 *F. graminearum* et 1 *M. nivale*). La souche MTK004 (*F. graminearum*) présente un chémotype 15aDON, la souche MTK012 (*F. graminearum*) un chémotype NIV et la souche MTK088 est une souche de *M. nivale*. Des notations ont été effectuées à 350°J et 450°J après floraison. 25 épis par modalité et notation ont été prélevés et analysés par PCR quantitative pour la présence de *F. graminearum*, *M. majus* et *M. nivale*.

Tableau 1 : Liste des variétés implantées dans les essais au champ avec cotations de résistance à la septoriose et à la fusariose des épis (Source GEVES/ Arvalis-Institut du végétal). Notes croissantes de 1 à 9 de résistance aux maladies.

Variétés blé tendre	Note CTPS septoriose	Variétés blé tendre	Note CTPS Fusariose
Aubusson	4	Royssac	2
Alixan	4	Bermude	3.5
Apache	4.5	Altigo	4
Bermude	5	Premio	4.5
Premio	5,5	Solehio	5
Altigo	5,5	Alixan	5
Caphorn	6	Aligator	5
Boregar	7	Arezzo	5.5
Solehio	7	Barok	6.5
Barok	7	Apache	7

4.1.2 Résultats

• Septoriose

En conditions naturelles, les corrélations entre les notations globales, les notations détaillées et la quantité d'ADN de *Z. tritici* sont très bonnes (Tableau 2). Une corrélation de 0.76 et 0.67 (respectivement pour l'essai d'Allonnes et de Premesques) est obtenue entre les notations globales et l'analyse moléculaire sur les étages foliaires groupés. Les étages foliaires sont retrouvés aisément avec l'outil moléculaire, avec une contamination graduelle de la F3 à la F1, conformément au développement par étages de la maladie. Les variétés se classent bien, avec une difficulté cependant au niveau des variétés intermédiaires qui sont très proches.

L'outil qPCR a permis également d'évaluer l'impact de la maladie sur le rendement. Ainsi, à Allonnes (28), la quantité d'ADN de *Z. tritici* explique 60% du rendement observé alors qu'elle n'explique que 15% à Premesques. Ceci s'explique par la présence importante de rouille brune et de rouille jaune dans l'essai de Premesques. La présence des rouilles a rendu impossible les notations à la date 2 pour deux variétés sensibles (Boregar et Alixan) à Premesques mais l'apport de la qPCR a permis de classer ces variétés de façon cohérente par rapport aux notes CTPS.

Allonnes

Globalité (F1+F2+F3)	Symptômes 1 ^{ère} notation	Symptômes 2 ^{ème} notation	Quantité d'ADN 1 ^{ère} notation	Quantité d'ADN 2 ^{ème} notation
Symptômes 1 ^{ère} notation	1	0,87	0,70	0,83
Symptômes 2 ^{ème} notation		1	0,67	0,78
Quantité d'ADN 1 ^{ère} notation			1	0,74
Quantité d'ADN 2 ^{ème} notation				1

En 2013, sous contamination artificielle, seul l'essai d'Allonnes (28) a montré des différences significatives entre les modalités inoculées et les témoins non inoculés. Ainsi, même si la méthode d'inoculation utilisée est la plus efficace connue, sa réussite est très dépendante des conditions climatiques et de la pression maladie naturelle. 3 souches différentes ont été inoculées à Allonnes. Les modalités inoculées avec la souche MTK082 ne sont pas significativement différentes du témoin non inoculé.

Ce résultat est cohérent avec les tests de phénotypage réalisés en conditions contrôlées. En effet, cette souche est avirulente sur l'ensemble des hôtes différentiels testés (17 gènes stb). Ce résultat met en évidence une bonne corrélation entre les données obtenues en conditions contrôlées et les données au champ. De même, les modalités inoculées avec les souches IPO 09415-MSI et MTK030 sont significativement différentes du témoin. Le comportement des 10 variétés face à ces deux souches est similaire suggérant un spectre de virulence proche entre les deux souches mais une agressivité plus importante a été observée pour la souche IPO 09415-MSI.

La corrélation entre les notes visuelles globales et les qPCR sur les trois étages foliaires regroupées est de mieux en mieux corrélée avec l'efficacité de l'inoculation, avec la pression maladie. En effet, la corrélation est seulement de 0.27 dans le témoin non inoculé alors qu'elle est de 0.64 avec la souche MTK30 et de 0.88 avec la souche IPO 09415-MSI.

• Fusariose

En 2012, 3 essais ont été analysés avec les outils qPCR. Dans chaque essai, les deux répétitions ont été homogènes (test student, p>0.05) à la fois pour les données de notations visuelles et les données moléculaires confirmant l'intérêt de réaliser des essais de caractérisation variétale pour la sensibilité à la fusariose avec des cannes de maïs. La corrélation entre le pourcentage d'épillets fusariés et la qPCR est très faible pour les trois essais mais meilleure avec les notes visuelles globales (Figure 5).

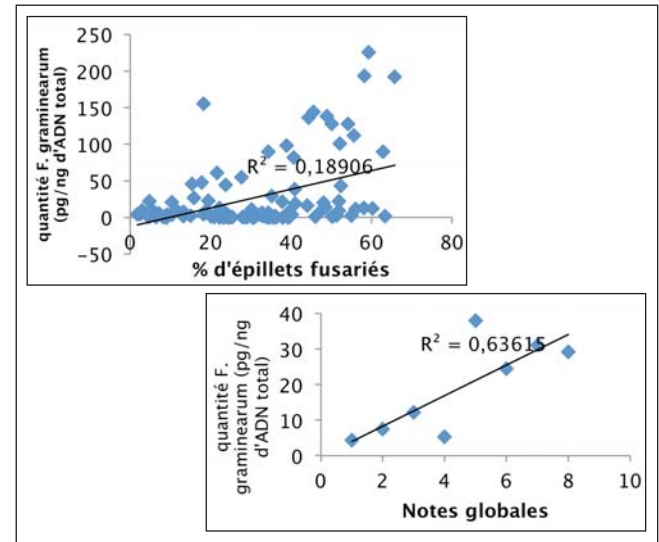


Figure 5 : quantité d'ADN de *F. graminearum* en fonction des des notes détaillées en pourcentage d'épillets fusariés (en haut) et des notes globales (en bas).

Premesques

Globalité (F1+F2+F3)	Symptômes 1 ^{ère} notation	Symptômes 2 ^{ème} notation	Quantité d'ADN 1 ^{ère} notation	Quantité d'ADN 2 ^{ème} notation
Symptômes 1 ^{ère} notation	1	0,94	0,93	0,83
Symptômes 2 ^{ème} notation		1	0,90	0,86
Quantité d'ADN 1 ^{ère} notation			1	0,92
Quantité d'ADN 2 ^{ème} notation				1

Tableau 2 : Corrélations entre notations globales et données moléculaires aux 2 dates de notations pour le site d'Allonnes (28) et le site de Premesques (59) en 2012.

Ces résultats s'expliquent par la variabilité très importante observée avec les notations en pourcentage d'épillets fusariés et de la difficulté à noter ce type de symptômes. De plus, le pourcentage d'épillets fusariés n'indique pas la surface atteinte qui est probablement mieux corrélée aux données moléculaires et confirmée par la meilleure corrélation avec les notes visuelles globales qui prennent en compte un aspect général de la parcelle. Enfin, il est très difficile de séparer les symptômes causés par *F. graminearum*, des symptômes causés par d'autres espèces comme *Microdochium* qui ont été retrouvés dans au moins deux des trois essais.

Néanmoins, le classement variétal obtenu est plutôt cohérent avec les notes DON (Arvalis) ou les notes CTPS en utilisant la qPCR d'autant plus que la pression est importante.

En 2013, deux des quatre essais réalisés ont été analysés par les outils moléculaires (Maule, 78 et Verneuil l'étang, 77). Dans ces deux essais inoculés avec trois souches différentes, aucune différence significative n'a été observée entre les répétitions d'une même modalité confirmant une homogénéité de la pression maladie. L'inoculation par *F. graminearum* a été efficace dans les deux essais pour la souche MTK012 (chénotype NIV), validée par des différences significatives observées pour les données moléculaires et les notations par rapport aux témoins. Pour la souche MTK004 (chénotype 15aDON), l'inoculation n'a été statistiquement efficace que dans un seul essai. De plus, cette souche semble moins virulente que la souche MTK012. En effet, la différence avec le témoin est moins importante à la fois pour les données quantitatives et les notations. Dans les deux essais, l'inoculation par *Microdochium nivale* (MTK088) n'a pas été efficace et n'a pas permis de caractériser les variétés pour cette souche. Néanmoins, la présence de *Microdochium nivale* dans les témoins et l'utilisation de l'outil moléculaire spécifique de *Microdochium* a permis d'estimer la sensibilité à *Microdochium* des différentes variétés. Les résultats observés suggéreraient quelques différences de sensibilité variétale qui ne sont pas complètement corrélées aux notes CTPS fusarioses. Ces résultats restant à confirmer dans des expériences dédiées et avec un plus grand nombre de variétés et d'analyses, ils ne sont pas présentés ici. Néanmoins, un projet FSOV accepté en 2014, coordonné par l'UFS et en partenariat avec Arvalis-Institut du végétal et le GEVES aura notamment pour but de mettre au point une méthode d'inoculation artificielle de *Microdochium* au champ et de caractériser un panel de variétés récentes pour la sensibilité à *Microdochium* en utilisant les outils développés dans ce projet.

4.1.3 Conclusion

L'expression des symptômes de septoriose au stade adulte est bien corrélée au développement du champignon dans la plante et donc à la quantité d'ADN présent. Dans une étude précédente (FSOV 2008), Gouache et collaborateurs ont montré que les données moléculaires et les notations sont globalement corrélées mais à des valeurs assez faibles (30 à 45 %). Dans notre étude, les corrélations observées sont de l'ordre de 70 à 80%. Ceci peut s'expliquer par une meilleure spécificité et sensibilité de la méthode moléculaire développée dans ce projet. Ainsi, la qPCR est utilisable pour caractériser plus finement les variétés. En effet, en complément des notes visuelles, elle permet de s'affranchir des risques de confusion avec d'autres maladies (comme les rouilles) afin d'obtenir une caractérisation fine pour une maladie donnée. De plus, en complétant avec une inoculation artificielle efficace avec une souche préalablement caractérisée, cela peut permettre de

différencier des variétés au champ pour des gènes *stb* putatifs.

La corrélation entre la quantification moléculaire de *F. graminearum* et les notations visuelles est moins importante que celle observée avec *Z. tritici*. Ceci s'explique par différents facteurs qui sont la difficulté à noter des symptômes de fusariose inféodée uniquement à *F. graminearum* et qui sont très dépendants de l'expertise de l'expérimentateur et de la pression maladie exercée par *F. graminearum* seule. Néanmoins, l'outil qPCR est assez bien corrélé avec les notes globales notamment dans les essais où *F. graminearum* est prédominant. L'outil moléculaire permet également de vérifier plus finement l'homogénéité d'un essai et le suivi du développement de la maladie notamment à des stades précoces ou très tardifs (stade où les notations visuelles sont difficiles à réaliser). Les outils moléculaires utilisés permettent également de suivre le développement de plusieurs agents pathogènes causant des symptômes proches (*F. graminearum* VS *Microdochium spp.*) et donc de caractériser de manière plus fine que les notations visuelles la sensibilité des variétés face à ces différents bioagresseurs.

En complément des méthodes moléculaires, un autre outil de phénotypage a été évalué pour diagnostiquer la fusariose de l'épi à partir des essais analysés avec la qPCR.

► 4.2 Etude de l'imagerie multispectrale (Vidéomètre) pour diagnostiquer la fusariose de l'épi

4.2.1 Introduction

En 2013, le GEVES a mis au point une nouvelle méthode de phénotypage pour évaluer la résistance à la fusariose sur blé tendre (*Fusarium graminearum* et *culmorum*), en développant un programme de détection des grains fusariés par le Videometer, qui enregistre une image multispectrale à partir d'éclairages successifs sur 20 longueur d'ondes (Figure 6). Les premiers essais menés, hors programme Mycotek, sur les témoins CTPS au GEVES de l'Anjouère ont montré une très bonne corrélation lors d'une étude sur 125 épis de cinq variétés entre les notations visuelles du taux d'épillets fusariés à 450°C jour après floraison et le taux de grains fusariés mesurés par le videometer, à la récolte ($R^2=0.91$) (Cadot et al., 2014). L'étude menée en utilisant un système à plus haut débit pour transporter les graines avec une bande transporteuse a également montré une bonne corrélation (Figure 7). Dans le cadre du programme Mycotek, l'objectif était de confirmer sur un plus grand nombre de variétés et de sites le classement de la résistance variétale par le Videometer comparativement aux notations visuelles et à la qPCR.

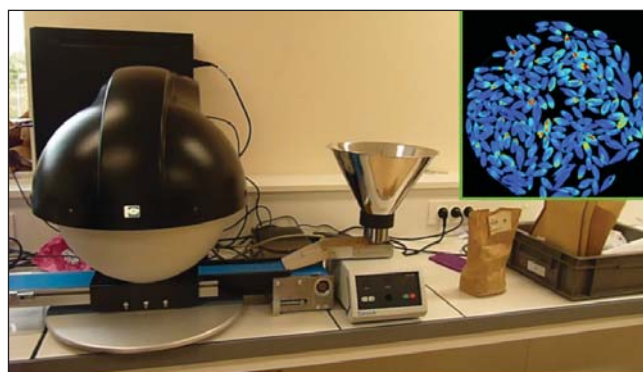


Figure 6 : Videometer avec sa bande transporteuse

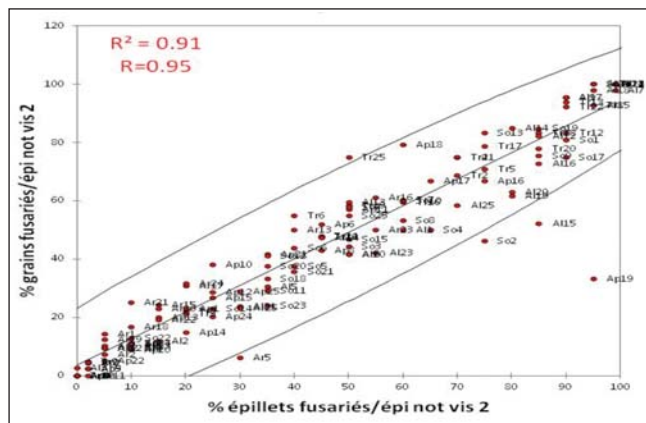


Figure 7 : Corrélation entre le taux de grains fusariés par le Videometer et les notations visuelles du taux d'épislets fusariés au GEVES de l'Anjouère

4.2.2 Matériel et méthodes

Deux essais inoculés en 2013 (cf. 4.3.1) ont été retenus pour les analyses Videometer, Maule (78) récolté à 450°C après floraison (lot étuvé), et Verneuil l'Etang (77) récolté à maturité. Un troisième lieu (hors projet) et récolté à maturité a été également analysé (5 variétés CTPS à l'Anjouère). Pour chaque essai, 30 épis par répétition et par variété ont été analysés. Les notations visuelles exprimées en pourcentage d'épislets fusariés ont été comparées aux analyses réalisées par le vidéomètre exprimées en pourcentage de grains fusariés suivant l'algorithme mis au point par le GEVES (hors projet) et aux analyses qPCR réalisées par Arvalis (cf. 4.3.1).

Des analyses microbiologiques supplémentaires ont été menées par le GEVES-SNES sur 400 grains pour détecter *Fusarium Section discolor* (*F. graminearum* et *culmorum*) et *Microdochium spp* afin de définir la flore fongique présente sur les grains après récolte.

4.2.3 Résultats

• Analyses microbiologiques

Dans les essais inoculés à Maule et à Verneuil l'Etang, soit par du *Fusarium*, soit par du *Microdochium*, les analyses microbiologiques ont montré un mélange de *Microdochium spp* et de *Fusarium Section Discolor* (*F. graminearum* ou *culmorum*), indiquant une contamination naturelle par du *Microdochium* dans les essais inoculés par du *Fusarium*, et inversement ; confirmant les résultats obtenus par qPCR (4.3.1).

Sur le site de l'Anjouère inoculé par *Fusarium*, les analyses microbiologiques ont révélé uniquement du *Fusarium Section Discolor* (*F. graminearum* ou *culmorum*).

• Corrélation Videometer- notations visuelles :

De par la présence simultanée des deux agents fongiques sur les 2 sites inoculés de Verneuil l'Etang et de Maule, l'analyse des résistances variétales de chaque essai par notation visuelle s'est avérée délicate pour différencier visuellement *F. graminearum* de *Microdochium spp.* sur épis.

De ce fait, les corrélations entre les notations visuelles et le Videometer se sont révélées variables, selon le site et la souche de *Fusarium* (R^2 variant de 0.21 à 0.73, Figure 8).

• Corrélation Videometer-qPCR :

Les corrélations entre les mesures du Videometer et la qPCR pour les deux souches de *Fusarium* et celle de *Microdochium* se sont révélées variables selon les souches et le site : faibles à Maule (R^2 variant de 0.1 à 0.2) et moyennes à Verneuil l'étang (R^2 variant de 0.5 à 0.6, Figure 9).

Cette corrélation moyenne à Verneuil peut s'expliquer par le fait que le programme actuel du Videometer est destiné à reconnaître

uniquement des grains fusariés par *Fusarium graminearum* ou *culmorum* et n'a pas encore été conçu pour différencier les symptômes attribuables à du *Microdochium* ou à du *Fusarium graminearum*, lorsque les deux sont en mélange. La faible corrélation à Maule peut en plus s'expliquer par le fait que le programme du Videometer est à perfectionner pour les lots étuvés qui ne présentent pas la même signature spectrale.

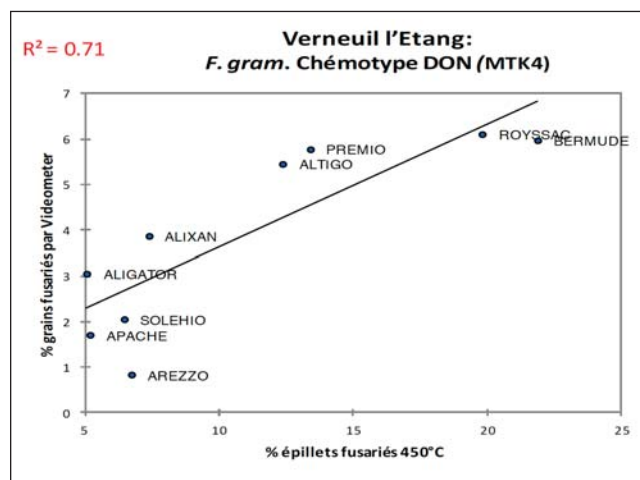


Figure 8 : Corrélation entre le taux de grains fusariés par le Videometer et les notations visuelles du taux d'épislets fusariés à Verneuil l'Etang

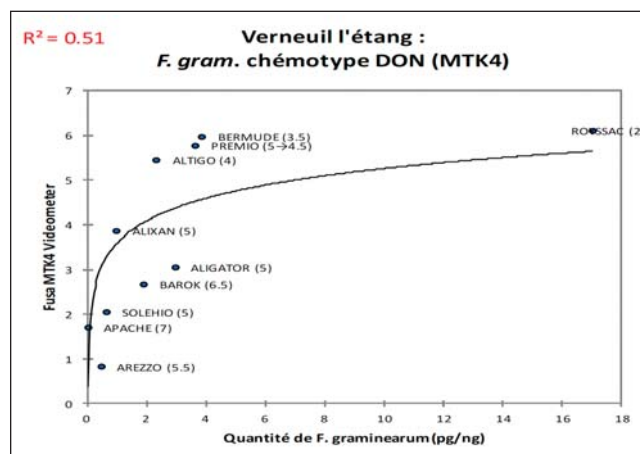


Figure 9 : Corrélation entre le taux de grains fusariés par le Videometer et la qPCR de *F. graminearum* à Verneuil l'Etang

Sur le site de l'Anjouère, les mesures du Videometer se sont montrées fortement corrélées avec les notations visuelles ($R^2=0.91$) (Figure 10) ainsi qu'avec les mesures de qPCR ($R^2=0.82$) (Figure 11).

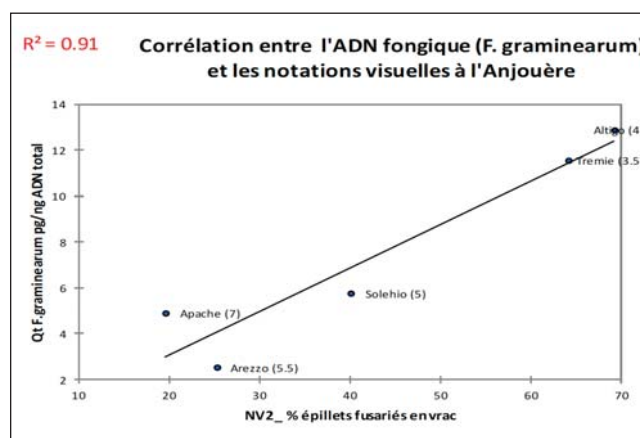


Figure 10 : Corrélation entre la notation visuelle du taux d'épislets fusariés et les mesures de qPCR de l'essai CTPS de l'Anjouère en 2013

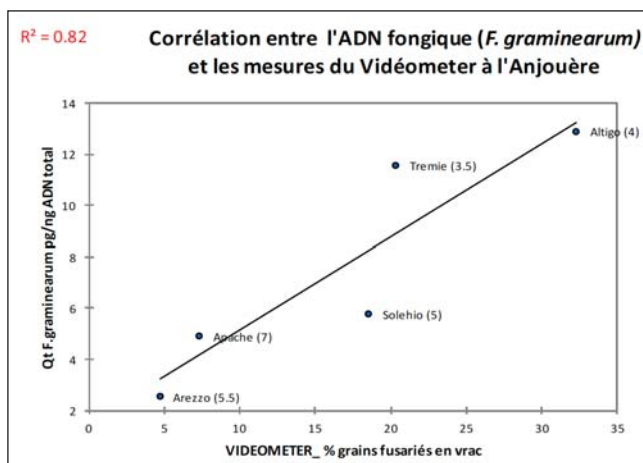


Figure 11 : Corrélation entre le % grains fusariés par le Vidéomètre avec la bande transporteuse et les mesures de qPCR de l'essai CTPS de l'Anjouère en 2013

Ces résultats indiqueraient que lorsque les notations visuelles de la fusariose ne sont pas perturbées par une contamination par du *Microdochium*, le Vidéomètre s'avère un bon prédicteur de la note de sensibilité variétale ; la qPCR ayant confirmé la bonne prédiction de l'imageur spectral. Ce constat nécessite néanmoins une confirmation sur un grand nombre de variétés.

4.2.4 Conclusion et perspectives :

Avec l'algorithme actuel, le phénotypage de la fusariose par le Videomètre s'annonce prometteur lorsque la fusariose des épis n'est pas en mélange avec d'autres agents pathogènes et sur des grains non étuvés. En 2014, l'étude des corrélations entre Videomètre et notations visuelles s'est poursuivie au GEVES de l'Anjouère avec succès sur un grand nombre de variétés de blé tendre inoculées par *Fusarium graminearum*, pour confirmer le classement variétal de la résistance. Des études ont également démarré sur d'autres espèces de céréales à paille.

Un programme de recherche a été initié pour définir de nouveaux algorithmes permettant au Videomètre de reconnaître *Microdochium* spp et de le différencier de *Fusarium graminearum* afin de pouvoir disposer d'un outil fiable de

quantification de la résistance variétale pour chacun des deux agents pathogènes (FSOV Microdochium 2014).

L'imagerie mutispectrale pourrait devenir prochainement un outil d'aide à la sélection et à l'inscription des variétés au Catalogue français pour évaluer la résistance variétale à la fusariose.

5. Conclusion générale

Ce projet financé par le FSOV et issu d'une collaboration entre différents partenaires (Arvalis – Institut du végétal, UFS, INRA UR Bioger-CPP, INRA UR MycSA, UMR GDEC, Biogemma et le GEVES) a permis des avancées significatives dans le développement d'outils utiles à la sélection variétale. La création d'une mycothèque pérenne, représentative des principaux agents pathogènes actuelles du blé tendre et accessible aux acteurs de la sélection génère à la fois une connaissance sur les souches de champignons pathogènes du blé tendre et une importante source d'inoculi pouvant être employée de manière concrète pour phénotyper les essais de sélection variétale vis-à-vis des résistances aux maladies ciblées. De plus, la caractérisation taxonomique, génotypique et du potentiel toxigène de ces isolats, grâce notamment à des outils développés dans le projet, permet de caractériser finement des variétés pour un critère donné (accumulation mycotoxines, gènes de résistance...). Ensuite, l'intérêt de l'utilisation des méthodes de quantification moléculaire pour phénotyper les variétés au champ a été démontré. En effet, ces méthodes spécifiques permettent de s'affranchir des risques de confusion avec d'autres maladies afin d'obtenir une caractérisation fine pour une maladie donnée et donc participer à la recherche de variétés tolérantes. En complément des méthodes moléculaires, un autre outil de phénotypage a été évalué pour diagnostiquer la fusariose de l'épi. Avec l'algorithme actuel, le phénotypage de la fusariose par le Videomètre s'annonce prometteur lorsque la fusariose des épis n'est pas en mélange avec d'autres agents.

Ainsi, ce projet renforce les moyens d'évaluation des variétés afin de permettre aux acteurs de la sélection de fournir des variétés de blé tendre de plus en plus tolérantes aux maladies.

Références bibliographiques

- ALEXANDER N. J., MC CORMICK S. P., HOHN T. M.** (1999). TRI12, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: gene isolation and expression in yeast. *Molecular and General Genetics MGG*. August 1999, Volume 261, Issue 6, pp 977-984.
- BOUTIGNY A-L., WARD T J., BALLOIS N., IANCU G. IOOS R.** (2014). Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. *Eur J Plant Pathol* 138: 133-148.
- CADOT V., VADAINÉ R., VALADE R., MAIGNIEL J-P.** (2014). Multispectral camera and imaging for assessment of resistance to *Fusarium graminearum*. EUCARPIA Cereals Section, Wernigerode, Germany, June 29 – July 4, 2014. (Poster)
- DUVERGER F., BAILLY S., QUERIN A., PINSON-GADAIS L., GUERRE., P. BAILLY.** (2011). Influence of culture medium and incubation time on the simultaneous synthesis of deoxynivalenol and zearalenone by *Fusarium graminearum*. *REVUE DE MEDECINE VETERINAIRE* Volume: 162, Issue: 2, Pages: 93-97.
- ELBELT S., SIOU D., GELISSE S., LANNOU C., LEBRUN M-H., LAVAL.** (2014). Efficient tools for molecular diagnostic of *Fusarium* head blight: a complex story. Submitted AEM.
- GAUTIER A., MARCEL T.C., CONFAIS J., CRAN C., KEMA G., SUFFERT F., WALKER A-S.** (2014). Development of a rapid multiplex SSR genotyping method to study populations of the fungal plant pathogen *Zymoseptoria tritici*.
- GREENHALGH R., NEISH G. A., MILLER J. D.** (1983). Deoxynivalenol, acetyl deoxynivalenol, and zearalenone formation by Canadian isolates of *Fusarium graminearum* on solid substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:625-629.
- GOUACHE D., HOURCADE D., LEBRUN M-H., MARCEL T., GOUT L., DUCASSE A., DELLER S., AUDEON C., GOYEAU H., SUFFERT F., MICHELET C., ROBERT O., CADOT V., GHAFFARY SMT., KEMA G.H.J.** Evaluation de la résistance du blé à la septoriose provoquée par *Mycosphaerella graminicola*. FSOV 2008.
- KIMURA M., TOKAI T., TAKAHASHI-ANDO N., OHSATO S., FUJIMUR M.** (2007). Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: Pathways, genes, and evolution *BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY* Volume: 71 Issue: 9 Pages: 2105-2123.
- KULIK T., PSCZCOTKOWSKA A., FORDORISKI G., OLSZEWSKI J.** (2007). PCR approach based on the *esyn1* gene for the detection of potential enniatin-producing *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology* 116 319–324
- KULIK T., JESTOI M., OKORSKI A.** (2011). Development of TaqMan assays for the quantitative detection of *Fusarium avenaceum* / *Fusarium tricinctum* and *Fusarium poae* *esyn1* genotypes from cereal grain. *FEMS Microbiol Lett* 314 49–56
- NICHOLSON P., SIMPSON D. R., WILSON A.H., CHANDLER E., THOMSETT M.** Detection and differentiation of trichothecene and enniatin-producing *Fusarium* species on small-grain cereals. *European Journal of Plant Pathology* 110: 503–514, 2004.
- PEPLOW A. W., MEEK, I. B., WILES M. C., PHILIPS T.D., BEREMAND M. N.** (2003). Tri16 is required for esterification of position C-8 during trichothecene mycotoxin production by *Fusarium sporotrichioides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5935–5940.
- SCHOCH C.L., SEIFERT K.A., SABINE HUHNDORF S., ROBERT V., SPOUGE J.L., LEVESQUES C.A., CHEN W.** and Fungal Barcoding Consortium Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* 2012 109 (16) 6241-6246
- YLI-MATTILA.** (2010). Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in Northern Europe and Asia. *Journal of Plant Pathology*, 92 (1), 7-18
- WANGJ-H., LI H-P., QU B., ZHANG J-B., HUANGT., CHEN F-F., LIAOY-C.** (2008). Development of a Generic PCR Detection of 3-Acetyldeoxynivalenol-, 15-Acetyldeoxynivalenol- and Nivalenol-Chemotypes of *Fusarium graminearum* Clade. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 2495-2504.
- ZHANG J-B., WANG J-H., GONG A-D., CHEN F-F., SONG B., LI X., LI H-P., PENG C-H., LIAO Y-C.** (2013). Natural occurrence of *Fusarium* head blight, mycotoxins and mycotoxin-producing isolates of *Fusarium* in commercial fields of wheat in Hubei. *Plant Pathology* 62, 92–102.

Fiche technique

Conservation des souches de *Fusarium spp.* dans du glycérol 20% à -80°C

Fusarium spp.

Matériel & milieu

- Boîte de pétri (diamètre 90mm)
- Milieu PDA (Potato Dextrose Agar, Acumedia Neogen ®, USA)
- Microtubes de 1,5 ou 2 mL
- Eau glycérolée stérile à 20%
- Scalpel stérile

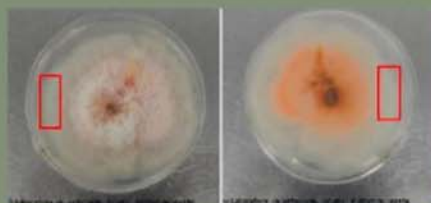
Conditions de culture

- Température : 19 – 20 °C
- Hygrométrie : 80%
- Alternance Jour/Nuit : 12 h

ETAPES

1 – Congélation du mycélium des souches de *Fusarium spp.*

- Faire pousser le mycélium sur le milieu PDA pendant 7 jours dans la chambre de culture.
- Après 7 jours, découper des petits carrés (environ 5mm/5mm) de mycélium avec un scalpel stérile, en évitant de prélever du mycélium trop vieux (centre de la boîte à proscrire, cf photos ci-dessous).



Culture de *F. graminearum* (Souche FU10008, Arvalis Institut du végétal) sur milieu PDA.

Le rectangle rouge indique la zone à prélever préférentiellement.

- Mettre les carrés de mycélium dans un microtube stérile contenant 1 mL d'eau glycérolée stérile à 20%.

Entre chaque souche, bien stériliser le scalpel à la flamme (ou utiliser un scalpel par souche) et attendre qu'il soit refroidi avant de découper de nouveaux carrés de mycélium.

La chaleur risque de tuer la souche (une vérification sur un coin de la boîte est préconisée).

- Placer les tubes directement à -80°C.

2 – Décongélation des souches de *Fusarium spp.*

- Décongeler les tubes contenant les carrés de mycélium à température ambiante.
- Placer un carré de mycélium sur une boîte de milieu PDA, le côté "mycélium" en contact avec le milieu PDA.
- Placer les boîtes dans une chambre de culture adaptée.



FSOV MYCOTEK

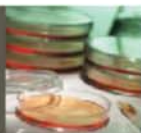


Fiche technique

Conservation des souches de *Septoria tritici* (= *Zymoseptoria tritici*, forme sexuée : *Mycosphaerella graminicola*) à sec à -80°C

Septoria tritici

Matériel & milieu



- Boîte de pétri (diamètre 90mm)
- Oeses stériles
- Microtubes de 1,5 ou 2 mL
- Milieu Malt Levure Agar
(20g/L Malt, 5g/L Bacto yeast extract, 15g/L Agar)

Conditions de culture



- Température : 18°C
- Hygrométrie : 70%
- Luminosité : Obscurité totale

ETAPES

1 – Congélation des souches de *M. graminicola*

- Faire pousser la souche sur du milieu Malt Levure Agar pendant 3 à 4 jours dans une chambre de culture appropriée.
La forme levure se développe (Photo A).

Après 3 ou 4 jours, la forme levure ne doit pas avoir noirci (apparition des stroma = noircissement, Photo B).

- Racler la boîte avec une oese stérile (une par souche), on obtient une sorte de pâte au bout de l'oese.
- Mettre la "pâte" dans un microtube stérile.
- Placer les tubes directement à -80°C.



2 – Décongélation des souches de *M. graminicola*

- Décongeler les tubes dans la glace afin d'éviter un choc thermique.
- Prélever à l'aide d'une oese un peu de "pâte" levuriforme.
- Ensemencer sur une boîte de milieu Malt Levure Agar.
- Placer les boîtes dans une chambre de culture adaptée.



FSOV MYCOTEK



Jacques LE GOUIS^{*1,2}, Vincent ALLARD^{1,2}, Jean-Louis JOSEPH^{1,2}, Frédéric HENRY^{1,2}, François TAULEMESSSE^{1,2}, Emmanuel HEUMEZ³, Katia BEAUCHENE⁴, David GOUACHE⁴, Volker LEIN⁵, Pascal GIRAudeau⁶, Stephen SUNDERWIRTH⁷, Jean-Michel DELHAYE⁸, Frank LACOUDRE⁹, Céline DUQUE⁹, Jérémy DERORY¹⁰, Clément DEBITON¹¹, Philippe LEREBOUR¹¹, Laure DUCHALAIS¹², Sylvie DUTRIEZ¹³

1 - INRA - UMR GDEC, Domaine de Crouelle, 5 chemin de Beaulieu, 63109 Clermont-Ferrand

2 - UBP - UMR GDEC, Campus des Cézeaux, 63177 Aubière Cedex

3 - UE - GCIE, 2 Chaussée Brunehaut, 80203 Péronne

4 - Arvalis Institut-du-Végétal, IBP- Rue de Noetzelin, 91405 Orsay

5 - Saaten-Union Recherche, 163 Avenue de Flandre, 60190 Estrées-Saint-Denis

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

7 - Momont, 154 Route Nationale, 28150 Allones

8 - Lemaire-Deffontaines, 108 Rue du Rossignol, 59310 Auchy-lès-Orchies

9 - Limagrain Europe, Ferme de l'Etang, 77 390 Verneuil l'Etang

10 - Limagrain Europe, Centre de Recherche, route d'Ennezat - Bâtiment 1 - CS 3911 - 63720 Chappes

11 - UNISIGMA, 2 Rue Petit-Sorri, 60 480 Froissy

12 - RAGT2n, Route d'Epincy, 28150 Louville-la-Chenard

13 - Caussade Semences, 24, rue Saint Pierre, 28150 Reclainville

* **Coordinateur** : Jacques LE GOUIS, jacques.legouis@clermont.inra.fr

1. Introduction

L'azote est un élément nutritif essentiel de la culture de blé tendre pour sa forte influence sur le rendement et sur la teneur en protéines. Les apports moyens sont de l'ordre de 162 kg ha⁻¹ (Agreste 2011) ce qui représente une large part des engrais azotés consommés annuellement en France. Cela se traduit par un coût relativement important pour l'agriculteur, environ 20-25% des charges opérationnelles. De plus, la production, le transport et l'application des engrais minéraux sont très consommateurs en énergie, le prix des engrais azotés a donc tendance à suivre le prix du pétrole. Ainsi leur prix a plus que doublé entre 2000 et 2013 (INSEE). Un des moyens de diminuer ces charges est d'améliorer l'efficacité d'absorption de la culture. En effet seuls environ 50-60% de l'azote disponible pour la culture sera réellement absorbé (Sylvester-Bradley et Kindred 2009). Une partie est perdue par lixiviation entraînant une pollution des eaux de surface et des nappes phréatiques. Une autre partie est volatilisée sous forme d'oxyde nitreux (N₂O), un gaz à effet de serre au pouvoir radiatif 310 fois plus fort que le CO₂. Ainsi, les engrais azotés seraient responsables d'environ 50% des émissions de gaz à effet de serre d'origine agricole et les émissions de N₂O en provenance des sols agricoles devraient encore augmenter de 35-60% (IPCC, 2007) à l'horizon 2030. Une stratégie pour améliorer ce bilan pourrait être de retarder les apports d'azote tout en associant des types variétaux ayant une forte capacité à absorber l'azote post-floraison.

L'efficacité d'utilisation de l'azote peut être définie comme la quantité de grains produits par unité d'azote disponible. Elle peut être décomposée en une efficacité d'absorption (quantité d'azote absorbée par rapport à l'azote disponible) et une efficacité de conversion (quantité de grains produits par unité d'azote absorbée). Il a été montré qu'il existait des différences génotypiques significatives pour ces caractères (e.g. Van Sanford et MacKown 1986 ; Fossati *et al* 1993). Il existe aussi une variabilité de comportement des génotypes de blé vis à vis d'une déficience en azote qui se traduit par des interactions génotype x niveau d'azote (Le Gouis *et al* 2000). Nous avons de plus montré dans un précédent projet FSOV (Bogard *et al* 2010) qu'il existait une variabilité génétique pour l'écart à la relation rendement teneur en protéines (dénommé GPD, pour *Grain Protein Deviation*, par Monaghan *et al* 2001) confirmant en ceci des résultats de Oury *et*

al (2003). L'ensemble de ces résultats tendent à démontrer l'existence d'une forte variabilité génétique quant à l'assimilation et l'utilisation des ressources azotées ce qui constitue donc une piste de recherche pour l'identification de caractères physiologiques ou génétiques permettant une utilisation optimale de l'azote par la culture.

Le coefficient d'utilisation de l'azote provenant de l'engrais dépend du stade auquel il est appliqué. Les apports d'azote précoces sont mal utilisés par la culture du fait d'une faible croissance et donc d'une demande limitée de la culture à ce stade. Très rapidement l'engrais non absorbé par la culture peut être lixivié, volatilisé ou immobilisé par la microflore du sol. Les apports d'azote tardifs, jusqu'à l'épiaison, sont donc souvent plus efficacement utilisés (Lopez-Bellido *et al* 2006) sans que le déficit azoté précédant l'apport ait un réel impact négatif sur le rendement. Il a de plus été montré que les différences variétales pour l'absorption d'azote post-floraison expliquaient environ 50% de la variabilité pour le GPD (Bogard *et al* 2010). Ainsi les variétés capables d'absorber plus d'azote après la floraison ont généralement une plus forte concentration en protéines pour un rendement équivalent. Il semble donc que des apports d'azote tardifs permettent non seulement d'optimiser en moyenne l'efficacité de l'utilisation de l'azote mais aussi de maximiser l'expression des caractères positifs de certains génotypes.

Néanmoins cette stratégie de report des apports d'azote repose sur deux conditions nécessaires. La première est que les conditions climatiques actuelles et futures, en particulier celles déterminant la disponibilité en eau pour la culture, soient favorables pour une absorption et utilisation efficaces de l'azote. Ceci doit particulièrement être considéré dans le cadre du changement climatique qui risque de se traduire par une augmentation concomitante des épisodes de sécheresse et des besoins en eau (élévation de la température moyenne) durant la fin du cycle de développement du blé (Gate *et al* 2008). Aucune étude prospective n'a pour l'instant été conduite pour estimer dans quelles situations et avec quelle fréquence une stratégie d'apport d'azote tardif serait efficace dans un contexte climatique donné. La deuxième condition est que les variétés soient toujours capables d'absorber l'azote après la floraison si les conditions sont favorables. Il est connu qu'il existe des différences variétales pour la quantité d'azote absorbée post-floraison (Löffler *et al* 1985 ; Van Sanford *et*

McKown 1986). Mais le déterminisme génétique de ces différences n'est pas connu. De plus, de fortes interactions avec la date de floraison existent, ce qui peut introduire des biais dans cette estimation. Les modèles de simulation sont généralement basés sur le calcul d'un besoin en azote par la plante et d'une offre par le sol pour déterminer la quantité d'azote absorbé et l'arrêt de l'absorption. Ils font souvent abstraction de la diminution de la capacité d'absorption au sens strict et dans tous les cas rendent difficile l'analyse de possibles différences variétales pour ce caractère. De ce fait les modèles sont relativement limités pour bien estimer des différences variétales pour l'azote absorbé après la floraison. Ceci est d'autant plus préoccupant que de relativement faibles différences peuvent se traduire par des effets importants sur la teneur en protéines. Ainsi 1 point de protéines à 80 q ha⁻¹ correspond seulement à une différence d'absorption de 15-20 kg N ha⁻¹.

L'objectif de ce projet est donc de mieux comprendre la dynamique d'absorption post-floraison et les variables qui la contrôlent dans le but (1) de tester des scénarios de gestion de l'azote optimaux pour des objectifs donnés et (2) d'explorer la variabilité génétique existante afin d'identifier le déterminisme génétique d'une forte valorisation des apports d'azote tardifs. Le programme est décomposé en quatre volets. Le premier volet a pour objectif d'analyser, notamment par simulation, les interactions pédo-climat x stratégie de fertilisation x précocité variétale. Le deuxième volet a pour objectif une analyse fine de la dynamique d'absorption d'azote post-floraison en conditions contrôlées. Le troisième volet a pour but d'analyser la variabilité génétique pour l'absorption post-floraison en contrôlant la date de floraison. Enfin le dernier volet aura pour objectif de fournir des données qui serviront à une première analyse du déterminisme génétique du GPD par étude d'association.

2. Matériel et méthodes

► Volet 1

Les données expérimentales regroupent d'une part le réseau des essais Arvalis dits « PMOD » et des essais mettant en œuvre des modalités plus contrastées (azotées, fongicides, écartements de semis, vernalisation...). Nous avons éliminé toutes les données dont la protection phytosanitaire, l'écartement de semis et la vernalisation ne correspondaient pas à une conduite standard. Dans un premier temps, les modalités sans ou à faible fertilisation azotée ont donc été conservées. Nous avons choisi de ne travailler que sur quatre variétés, bien représentées : Soissons, Apache, Charger et Caphorn. En tout, 373 essais ont ainsi été conservés, couvrant les années 1997 à 2011 et différents types de sols (limons, argilo-calcaires et argilo-calcaire superficiels, craie, graviers,...). Les données mobilisées ont été les biomasses mesurées à floraison et à la récolte (grains et pailles) et les teneurs azotées correspondantes. Ces mesures ont permis de calculer les quantités d'azote absorbées (et les indices de nutrition azotée, INN) à floraison (QNFlo) et à la récolte (QNRécolte), et, par différence, la quantité d'azote absorbée post-floraison (PANU). La quantité d'azote remobilisée (QNR) a été calculée comme la quantité d'azote à floraison moins la quantité d'azote dans les pailles à la récolte. Les droites de régression rendement – concentration en protéines ont été calculées selon la méthode proposée par Oury & Godin (2007). L'approche a été menée séparément pour chacune des quatre variétés.

D'autre part, le modèle SiriusQualityV1 (Martre *et al* 2003) a été utilisé pour des simulations. Le modèle permet de simuler sur une base journalière la croissance et le développement d'une culture de blé. La variété qui a servi de base aux simulations est la variété

Thésée dont nous avons fait varier les paramètres de réponse à la vernalisation et à la photopériode générant ainsi des génotypes couvrant une large gamme de précocité. En complément, plusieurs dates de semis ont aussi été simulées pour élargir encore cette gamme de précocité. Les scénarios climatiques envisagés correspondent à différentes situations géographiques du territoire français et à différents contextes socio-économiques futurs définis par le GIEC (Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat). Les trois scénarios climatiques retenus sont : B1 (modéré), A1B (médian), A2 (extrême). Ceux-ci se traduisent par des prédictions différentes en termes de concentration en CO₂ de l'atmosphère et d'impact sur le climat. Les données climatiques correspondantes à ces scénarios climatiques sont mises à disposition par Météo France sur le site www.drias-climat.fr/. Trois périodes de 30 ans ont été considérées pour les simulations : période de référence (1961-1990), futur proche (2021-2050) et futur lointain (2071-2100). Six lieux représentant la moitié nord de la France ont été choisis (Estrées-Mons, Pontivy, Etampes, Mirecourt, Niort, Clermont-Ferrand). Les six stratégies de fertilisation choisies couvrent deux aspects, à savoir la quantité d'azote totale apportée et sa répartition dans le temps sur la culture, apport classique vs apport tardif. Les apports sont effectués à quatre différents stades de développement.

► Volet 2

Des plantes de blé (cv Récital) ont été conduites en conditions contrôlées à quatre niveaux contrastés d'azote dans la solution de fertirrigation (1, 4, 7 et 10 mM ; modalités respectivement nommées N1, N4, N7 et N10) jusqu'à floraison. Un système de culture semi-hydroponique de plantes en tubes sur substrat neutre (perlite/sable) a été employé pour cela. Ce protocole pré-floraison a permis de disposer de plantes ayant des niveaux de nutrition azotée contrastés à floraison. Pendant la période post-floraison, l'ensemble des plantes a été soumis à un régime de fertirrigation unique et non-limitant (10 mM). Afin de mesurer finement l'absorption d'azote sur la phase post-floraison, des marquages ¹⁵N courts ont été réalisés en cinétique lors de huit prélèvements destructifs, positionnés approximativement tous les 100 °Cj (DJ) de floraison (Z65) à maturité. Des échantillons de quatre types d'organes (feuilles, tiges, racines et épis) ont parallèlement été congelés en vue de dosages d'ions et métabolites, ainsi que d'expression de gènes clés du métabolisme azoté. Des amorces qRT-PCR ont été développées pour dix gènes majeurs impliqués dans l'absorption, la réduction et l'assimilation de l'azote, comprenant deux transporteurs racinaires de nitrate à basse affinité (NRT1), deux transporteurs racinaires de nitrate à haute affinité (NRT2), la nitrate réductase (NR), la nitrite réductase (NiR), la glutamine synthétase 2 (GS2), la glutamine oxoglutarate aminotransférase (GOGAT), l'asparagine synthétase (ASN) et la glutamate déshydrogénase (GDH).

► Volet 3

Deux groupes de 20 variétés ont été constitués sur la base de la précocité d'épiaison. Les lignées ont été choisies parmi celles testées dans le projet FSOV 2008 « Caractérisation du rythme de développement du blé tendre pour des variétés adaptées aux risques climatiques » coordonné par Michel Rousset (INRA UMR GV Moulon). Dans l'ensemble, ces variétés sont des variétés récentes inscrites en France ou au catalogue européen. Les variétés ont été sélectionnées pour maximiser la différence de précocité à l'épiaison entre les deux groupes (de l'ordre de 7 à 10 jours) et minimiser les différences à l'intérieur de chacun des deux groupes (de l'ordre de deux à trois jours). Deux stratégies de fertilisation azotée ont été expérimentées, visant à estimer les

capacités des variétés à absorber de l'azote post-floraison avec des statuts azotés différents à floraison. Les apports sont calculés selon la méthode du bilan qui permet d'estimer une dose de référence (X). Les deux stratégies sont ensuite différenciées par les apports pré-floraison ($N^- = X - 50 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$, $N^+ = X + 50 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$), les dates du dernier apport à l'épiaison étant adaptées en fonction du groupe de précocité des variétés.

Chaque année, sept lieux d'essai ont été utilisés. Les expérimentations 2011 ont été réalisées entre Auchy dans le département du Nord et Clermont-Ferrand dans le Puy-de-Dôme. Celles de 2012 ont été réalisées entre Saultain dans le département du Nord et Clermont-Ferrand dans le Puy-de-Dôme. Les apports d'azote s'échelonnent de 100 à 150 $\text{kg ha}^{-1} \text{ N}$ pour le faible niveau d'azote et de 200 à 250 $\text{kg ha}^{-1} \text{ N}$ pour le fort niveau d'azote.

Une expérimentation complémentaire a été mise en place en 2011 à Clermont-Ferrand sur 10 variétés de la série précoce. Pour chacune des variétés, 4 microparcelles ont été semées, pour constituer deux traitements et deux répétitions. Les deux traitements se différencient par la date d'apport de 50 $\text{kg ha}^{-1} \text{ N}$ marqué à 1% ^{15}N (à floraison ou floraison + 250 °Cj). Sur chaque micro-parcelle une placette de 4 rangs de 0.5m (0.32 m^2) a été prélevée avant l'apport d'azote à floraison ou floraison + 250 °Cj et à maturité dans la partie ayant reçu l'azote marqué. La matière sèche aérienne totale a été estimée à floraison ou floraison + 250 °Cj et à maturité en séparant les grains des parties végétatives. Des échantillons de poudre des parties végétatives et des grains ont été envoyés à l'UC Davis Stable Isotope Facility (Davis, CA, USA) pour la détermination de la concentration en azote total et l'abondance ^{15}N .

► Volet 4

Le panel de lignées du projet BreedWheat est composé de 220 variétés de blé tendre pour la plupart inscrites (213/220) en France (161/220) ou dans d'autres pays européens, la majorité entre 2003 et 2012. Ces variétés ont été cultivées dans 10 lieux en 2013. Dans chaque lieu, sauf Clermont-Ferrand, un seul traitement azoté a été réalisé. Les essais étaient non répétés à l'exception de quatre témoins (Apache, Altigo, Bermude, Premio) répétés six fois dans un dispositif en sous-blocs. Les principales mesures réalisées ont

été : le rendement, la concentration en protéines, la date d'épiaison, le poids spécifique et la hauteur des plantes.

3. Résultats et discussion

► GPD dus à l'environnement et relation aux mécanismes de variation génotypique du GPD

En amont des simulations des interactions pédo-climat x stratégie de fertilisation x précocité variétale, les bases de données disponibles à Arvalis ont été ré-analysées pour rechercher des relations empiriques entre les différents processus régissant le fonctionnement azoté de la culture.

Les droites de régression rendement concentration en protéines ont été établies pour le calcul de GPD pour quatre variétés. Les relations sont significatives mais la relation apparaît nettement plus faible pour Soissons comparativement aux autres variétés. Les résultats obtenus sur ce cultivar seront donc sujets à caution.

L'analyse des corrélations des caractères estimés avec le GPD permet de mettre en évidence (Tableau 1) que (1) les corrélations sont très faibles pour Soissons (on suppose que c'est lié aux difficultés d'établir une relation rendement-protéines fiable sur ce cultivar avec nos données), (2) et hors Soissons, les deux variables les plus explicatives du GPD sont l'INN floraison et l'écart à la relation azote absorbé post-floraison (PANU) – azote remobilisé (QNR).

Tableau 1 : Relation entre le GPD et les caractères mesurés pour chacune des quatre variétés.

Corrélation avec GPD	Apache	Caphorn	Charger	Soissons
Quantité N floraison	0.53	0.60	0.37	0.04
INN floraison	0.58	0.68	0.52	0.05
PANU	0.12	0.05	0.10	0.10
Quantité N remobilisé	0.44	0.43	0.18	0.02
Ecart PANU-QNR	0.66	0.55	0.49	0.17

La relation GPD – INN floraison met en évidence que le statut azoté de la culture à floraison est un déterminant important des variations environnementales de GPD (Figure 1). On remarque

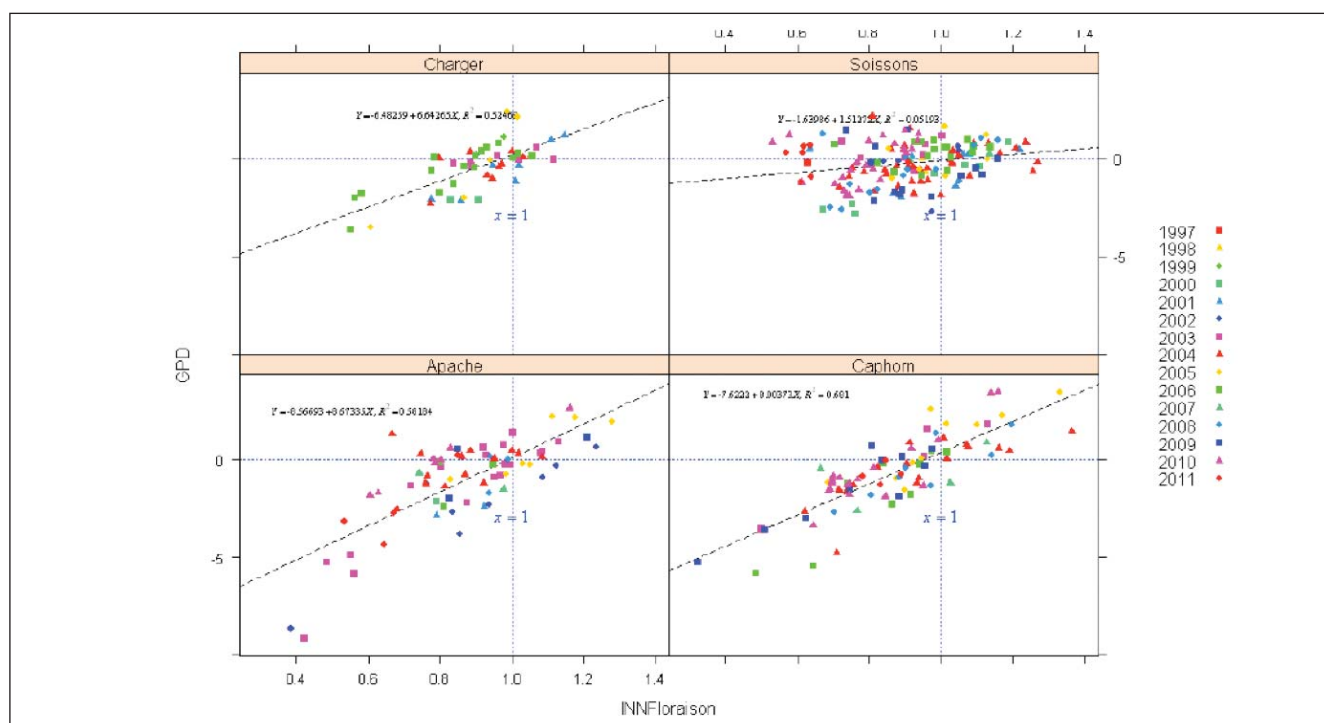


Figure 1 : Relation entre GPD et l'INN floraison pour chacune des quatre variétés (l'identification des points est faite selon l'année de campagne agricole).

aussi que l'INN floraison constitue un très bon indicateur du GPD : sur ces données un INN floraison supérieur à 1 conduit presque systématiquement à un GPD positif, et inversement.

La même chose peut être dite de l'écart absorption post-floraison - remobilisation (PANU-QNR) : dès que celui-ci est supérieur à la tendance, le GPD est positif. Autrement dit, tout surplus d'absorption post-floraison pour une même absorption pré-floraison augmente d'autant le taux de protéines. Ce dernier résultat est conforme à celui obtenu par Bogard *et al* (2010) pour expliquer les variations génotypiques de GPD. Parmi les hypothèses avancées lors de son travail, et dans celui sur le « stay green » du sorgho de Borrel *et al* (2001), l'idée avancée est celle d'un cercle vertueux entre absorption post-floraison et maintien de la durée de vie verte du couvert.

Cette hypothèse nous a conduit à observer la relation entre l'écart PANU-QNR et la biomasse produite par la culture lors de la phase de remplissage : si cette dernière est élevée, c'est que le fonctionnement du couvert a été bon pendant une longue durée. On retrouve effectivement une corrélation intéressante entre ces deux grandeurs.

► Analyse des interactions pédo-climat x stratégie de fertilisation x précocité variétale

La comparaison des trois scénarios climatiques considérés montre une augmentation de la teneur atmosphérique en CO₂ passant de 325 ppm à 650 ppm, une augmentation des températures moyennes annuelles d'environ 4°C, une diminution de la pluviométrie et une augmentation du rayonnement global sur la période. Globalement les évolutions seraient comparables entre les milieux pour les températures et les rayonnements. La diminution de la pluviométrie serait plus marquée à l'ouest que dans le reste des lieux. Les changements seraient plus marqués pendant la période estivale que la période hivernale.

Etant donné que le modèle SiriusQualityV1 ne simule pas complètement l'impact des stress thermiques (gel sur épi ou

échaudage thermique) sur les rendements ni sur la teneur en protéines, un préalable à l'analyse des résultats des simulations a été de déterminer une fenêtre de précocité à floraison permettant à la culture d'éviter ces stress. Considérant cette fenêtre de précocité, les simulations montrent que quel que soit le scénario climatique considéré, le rendement et le rendement en protéines augmenteraient avec le niveau de fertilisation azotée, que l'apport supplémentaire d'azote soit réalisé de manière classique (CL) ou en apport tardif (AT). Par contre, le fait de juste décaler les apports permettrait, comme attendu, une augmentation de la concentration en protéines mais qui se fait au détriment du rendement global, à fortiori pour les traitements où l'azote est le plus limitant ainsi que pour les génotypes tardifs. Des simulations complémentaires où nous avons fait varier la teneur en CO₂ atmosphérique en maintenant les autres paramètres climatiques constants indiquent que l'augmentation de rendement simulée dans le futur est très clairement due à cette augmentation de CO₂ dans l'atmosphère. Ces résultats sont très similaires à ceux obtenus dans le cadre du projet Climator (Bancal et Gate 2010) avec une méthodologie un peu différente (modèle CERES, une variété précoce (Soissons), une tardive (Arminda,...)). La compensation possible des conditions thermique et hydrique défavorables par un effet CO₂ est déjà soulignée. Une méta-analyse des études conduites en faisant varier la concentration en CO₂ (370 - 570 ppm) montre un effet moyen de ~+15% sur le rendement du blé (Ainsworth et Long 2005). Dans nos simulations, la comparaison des scénarios menés dans des conditions similaires de CO₂ (REF - FP-A2) donne des résultats très proches (+14%).

Alors que les simulations prédisent une augmentation des rendements moyens pour les scénarios futurs, les rendements en protéines restent stables signifiant une baisse de la teneur en protéines des grains. Dans le futur lointain et le scénario A2, même à forte fertilisation azotée avec apport tardif, la concentration en protéines du grain est en moyenne relativement faible (9%). Les différents scénarios climatiques ont peu d'impact sur la quantité d'azote absorbée en pré-floraison. En moyenne, les différences sont de l'ordre de 4-5 kg N ha⁻¹ entre les extrêmes. Les différences sont aussi très faibles entre scénarios pour la quantité d'azote absorbée en post-floraison. On remarque par contre une plus forte variabilité liée aux traitements azotés les plus forts.

Les impacts du changement climatique sur la concentration en protéines et sur l'absorption d'azote n'avaient pas été étudiés sur le blé tendre dans le cadre de l'ANR Climator (Bancal et Gate 2010). L'effet négatif sur la concentration en protéines via l'augmentation de rendement due à l'efficacité plus forte de la photosynthèse à forte concentration en CO₂ à déjà été rapporté dans des expérimentations (e.g. Hogg et al 2009). Mais plus récemment, il a été montré qu'il pourrait exister un effet direct d'inhibition de la concentration en CO₂ sur l'assimilation du nitrate par les plantes (Bloom *et al* 2010 ; 2014).

La dernière partie de l'analyse concerne la quantification des interactions entre la précocité à floraison, les traitements azotés et les scénarios climatiques. Les résultats présentés se focalisent sur l'absorption d'azote post-floraison. En moyenne sur les six lieux, les interactions entre date de floraison et scénarios climatiques et surtout traitements azotés sont fortes. Globalement pour les différents scénarios climatiques, l'absorption post-floraison est stable puis diminue pour les génotypes les plus tardifs. Pour les traitements azotés classiques (CL), l'absorption pos-floraison diminue assez fortement pour les génotypes tardifs, la majorité de l'azote étant absorbée en pré-floraison. Les traitements azotés tardifs (AT) permettaient de maintenir une absorption d'azote post-floraison sans risques accrues de mauvaises disponibilités pour les climats futurs par rapport au climat actuel (Figure 2).

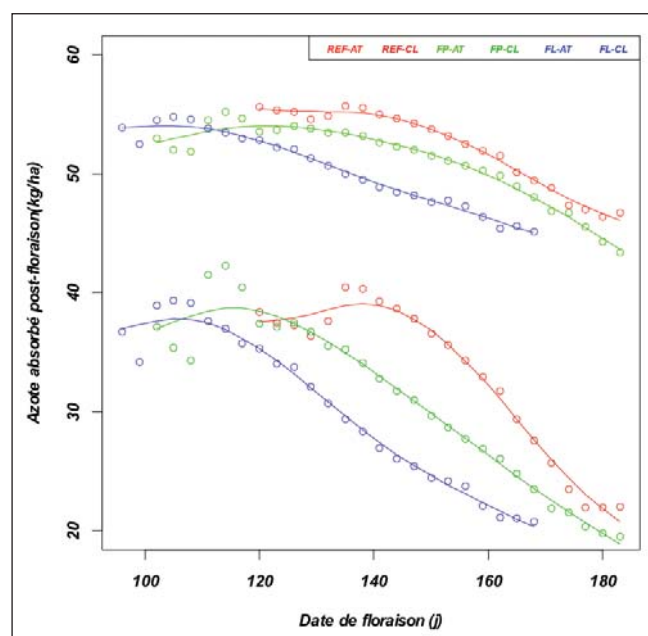


Figure 2 : Simulations de la quantité d'azote absorbée en post-floraison en fonction de la date de floraison (A) pour la période de référence (REF : 1961-1990), le futur proche (FP : 2021-2050) et le futur lointain (FL : 2071-2100) et pour les traitements azotés classiques (CL) et apport tardif (AT). Les valeurs représentent à chaque fois la moyenne des six lieux et la moyenne de trois traitements azotés et trois scénarios climatiques (B1, A1B, A2).

► Analyse de la dynamique d'absorption d'azote post-floraison en conditions contrôlées

Les objectifs principaux de l'expérimentation étaient de visualiser la dynamique d'absorption d'azote post-floraison, ainsi que de mesurer l'effet du niveau de nutrition azoté à floraison sur l'absorption en conditions azotées non-limitantes.

L'analyse des résultats de dosages d'absorption de nitrates par l'approche ^{15}N a permis d'établir que l'absorption d'azote n'était pas linéaire sur la phase post-floraison (Figure 3), révélant l'existence de mécanismes de régulation exercés par les plantes en conditions non-limitantes. Sur la base de ces résultats, deux types de régulations semblent intervenir dans le contrôle de l'absorption d'azote post-floraison.

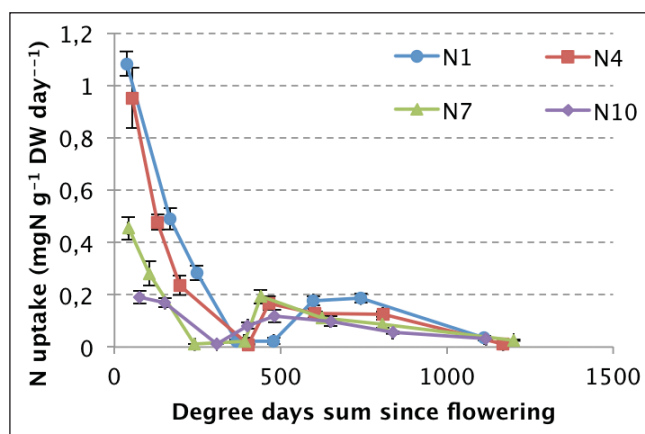


Figure 3 : Cinétique d'absorption d'azote post-floraison de la variété Réctal cultivée en conditions contrôlées à quatre niveaux de fertilisation pré-floraison (1, 4, 7 et 10 mM).

Le premier niveau de régulation est lié à la demande exercée par la croissance des plantes induisant une augmentation des puits d'azote. Elle est commune aux quatre modalités azotées et permet de distinguer trois phases d'absorption sur la période post-floraison. La première phase, de Z65 à Z65+300DJ ou Z65+400DJ selon les modalités, est marquée par une diminution de l'absorption qui coïncide avec une faible croissance et donc une réduction de la force de puits. En effet, à ce stade, les organes photosynthétiques ainsi que l'épi sont pleinement établis et les grains sont dans une phase de croissance relativement lente. Cependant, l'élongation des tiges qui se poursuit quelques jours après floraison (Bertheloot *et al* 2012) peut expliquer une part d'absorption. La seconde phase est caractérisée par un arrêt d'absorption entre Z65+300DJ et Z65+400DJ selon les modalités, qui intervient à un stade de quasi absence de puits d'azote, le remplissage azoté des grains n'ayant pas encore débuté. Enfin, la troisième phase est marquée par une reprise de l'absorption jusqu'à un stade proche de la maturité du grain sous l'effet de l'appel d'azote exercé par les grains en remplissage.

En parallèle des régulations d'absorption d'azote exercées par la croissance de la plante, un second mécanisme de régulation de l'absorption d'azote mis en évidence dans cette expérimentation est relatif au statut azoté à floraison. Dans nos conditions expérimentales, il intervient à floraison au moment du transfert des plantes dans des conditions azotées non-limitantes et se poursuit au cours de la première phase d'absorption décrite précédemment. Des différences marquées de niveaux d'absorption sont alors observées entre les modalités azotées (Figure 3). Plus les plantes sont carencées en azote à floraison, plus elles absorbent d'azote par unité de biomasse lors du passage en azote non-limitant.

L'analyse des résultats d'expression des gènes du réseau azote, portant sur deux modalités pré-floraison contrastées (4 mM et 10 mM), a mis en évidence la cohérence expressionnelle du réseau qui semble soumis à une régulation commune pour la réduction et l'assimilation de l'azote. Cependant, au niveau des transporteurs racinaires, les membres des deux grandes familles à basse (NRT1) et haute affinité (NRT2) semblent obéir à des mécanismes de régulation différents. En effet, leurs dynamiques d'expression ne sont pas corrélées, et seuls les NRT2 corréleront avec les autres membres du réseau azote. La corrélation positive observée entre NRT2 et Nitrate Réductase (NR) pour les deux modalités testées suppose un rôle prépondérant de NRT2 dans l'absorption d'azote post-floraison.

Les résultats de dosages de nitrates racinaires (également effectués pour les modalités 4 mM et 10 mM) mettent en évidence des différences de concentrations en nitrates des racines à floraison en fonction du statut azoté. En effet, la modalité 4 mM, en état de carence azotée relative, a une teneur en nitrate racinaire très inférieure à la modalité 10 mM. Durant la première phase d'absorption, les teneurs en nitrates racinaires des plantes carencées augmentent rapidement et demeurent ensuite dans une gamme relativement comparable à celles des plantes non carencées. Ces observations sont cohérentes avec les résultats de teneurs en azote des plantes entières. En revanche, une forte corrélation négative est observée entre la teneur en nitrate racinaire et l'expression de NRT2. Cette relation négative quelque peu contre-intuitive entre l'expression d'un transporteur racinaire et la concentration de son substrat dans le tissu laisse penser à une régulation du gène par le substrat. Selon cette hypothèse, le nitrate pourrait être un indicateur interne de l'état azoté de la plante. En absence de croissance, la demande azotée des parties aériennes est faible chez une plante non carencée et le nitrate s'accumulerait dans la racine, provoquant un ralentissement de l'absorption. A l'inverse, en situation de carence azotée, l'appel exercé par les parties aériennes diminuerait la teneur en nitrates racinaires et stimulerait de ce fait l'absorption.

► Analyse de la variabilité génétique pour l'absorption post-floraison

Pour limiter de possibles biais liés à des différences de précocité et des apports d'azote réalisés à la même date (et non au même stade), l'objectif était d'expérimenter deux séries variétales homogènes présentant entre elles une large différence de date d'épiaison. Un écart moyen entre séries d'environ 10 jours a été obtenu. A l'intérieur de chaque groupe les écarts moyens entre le plus précoce et le plus tardif sont de 4-5 jours.

A l'intérieur de chaque groupe et pour chacun des deux traitements azotés et chacun des lieux, la corrélation entre la date d'épiaison et la quantité d'azote absorbé en post-floraison n'est pas significative ($-0.43 < r < 0.36$, 3 essais x 2 traitements azotés x 2 séries). Restreindre l'étendue de variation de la date d'épiaison a donc bien permis de limiter ce biais potentiel.

La corrélation rendement – concentration en protéines a été calculée dans 52 conditions (13 essais x 2 traitements azotés x 2 séries). Comme attendu, toutes les corrélations sont négatives et 48/52 sont significatives au seuil de 5%. Le fait de travailler avec des séries très homogènes de précocité ne réduit donc pas la force de cette relation négative.

Les pentes et les coefficients de corrélation sont très proches entre les deux séries de précocité. La relation semble un peu plus forte à faible niveau d'azote que cela soit sur les moyennes des régressions ($r = -0.62$ en N+ et $r = -0.71$ en N-) ou sur la

régression réalisée à partir des moyennes des rendements et concentration en protéines (Figure 4). Cela pourrait traduire un effet de dilution de l'azote par le carbone dans le grain plus fort en situation de carence en azote. En moyenne, la pente de la régression est proche de 0.1 (Figure 4) ce qui signifie qu'une augmentation du rendement de 10 q ha⁻¹ se traduit par une baisse de 1 point de protéines. Cette valeur est très proche de celles déjà rapportées par Oury et Godin (2007) sur la base des données d'inscription et par Bogard et al. (2010).

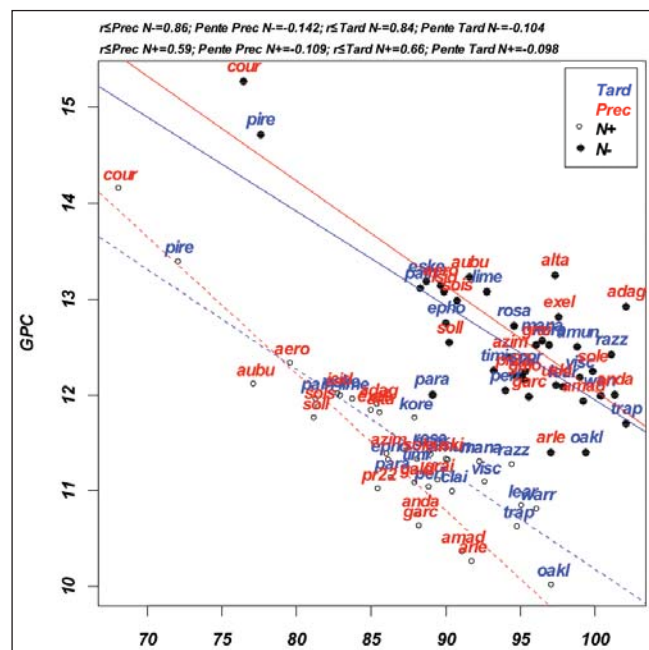


Figure 4 : Régression rendement (GY15, q ha⁻¹ à 15%) – concentration en protéines (GPC, %) pour la série précoce et la série tardive et les deux traitements azotés.

► Utilisation d'un marquage ¹⁵N pour estimer l'absorption post-floraison

Lors d'un précédent projet FSOV (2003), l'absorption post-floraison était significativement corrélée au GPD dans 9 essais sur 12 alors que la remobilisation de l'azote n'était jamais associée au GPD (Bogard et al 2010). Nous retrouvons globalement ce résultat avec 6 corrélations sur 12 significatives pour l'absorption post-floraison et aucune pour la remobilisation. En moyenne les corrélations GPD – absorption post-floraison sont très proches pour les séries tardives ou précoces ($r=0.48$ et $r=0.47$) et les traitements N+ ou N- ($r=0.46$ et $r=0.48$).

L'absorption d'azote pos-floraison reste difficile à estimer car elle nécessite des mesures de biomasse et de concentration en azote à floraison et maturité. L'utilisation d'azote marqué (isotope stable ¹⁵N) pourrait permettre une estimation plus facile. Pour tester cette méthode, 50 kg N ha⁻¹ marqués à 1% ont été appliqués soit à floraison, soit à floraison + 250°Cj, sur 10 variétés de la série précoce.

Environ 80% de l'azote apporté a été absorbé (83.5% pour l'apport floraison et 77.3% pour l'apport floraison + 250°Cj). Plus de 91% de cet azote se retrouve dans le grain à maturité, sans différence variétale significative. Cette valeur est identique à celle rapportée par Kichey et al (2007) qui par contre avait observé des différences variétales (de 90 à 93%).

La corrélation entre la quantité d'azote absorbé en post-floraison estimée par la différence de quantité d'azote à maturité et floraison et estimée par marquage ¹⁵N est forte ($r=0.79$, Figure 5). Elle est

supérieure à celle rapportée en moyenne par Kichey et al (2007) pour cinq variétés et deux traitements azotés ($r=0.40$ et $r=0.78$ pour deux années différentes). Cette différence peut sans doute s'expliquer en partie par la quantité d'azote marqué apportée dans chaque cas : 5 kg N ha⁻¹ pour Kichey et al (2007), 50 kg N ha⁻¹ dans notre cas. Cela s'est traduit par une quantité d'azote absorbé en post-floraison provenant de l'engrais marqué supérieure dans notre cas (environ 50 %) par rapport à l'étude précédente (environ 10%).

Les erreurs de mesures sont plus faibles pour la méthode utilisant le ¹⁵N par rapport à la méthode classique (CV=9.7% contre CV=27.6%). Enfin, la corrélation est significative entre l'estimation de l'absorption post-floraison par marquage ¹⁵N et le GPD ($r=0.41$).

Cet essai de marquage ¹⁵N est encourageant. Réalisé sur une seule expérimentation, il demande à être confirmé même si il est en accord avec des résultats précédents (Kichey et al 2007). Cette technique peut être une alternative intéressante à la méthode classique. Elle a déjà été employée à grande échelle sur le maïs pour quantifier la variabilité d'efficacité de remobilisation de l'azote (marquage au stade végétatif) de lignées recombinantes (Coque et Gallais 2007). Son coût reste toutefois élevé même si elle permet d'économiser un prélèvement et un dosage d'azote à la floraison.

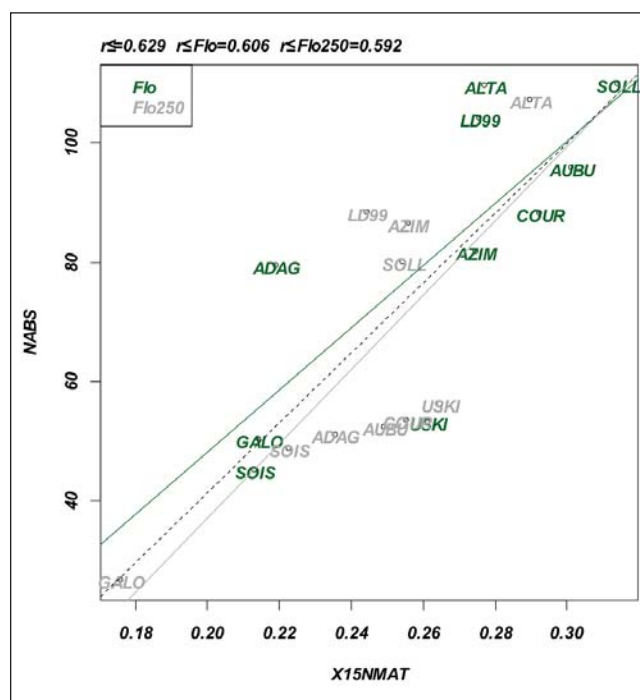


Figure 5 : Relation entre la quantité d'azote absorbé en post-floraison estimée par la différence de quantité d'azote en maturité et floraison (NABS, kg ha⁻¹) et estimée par marquage ¹⁵N (X15NMAT, g m⁻²).

► Déterminisme génétique de l'écart à la relation rendement – concentration en protéines

Ce volet a pour but d'analyser la variabilité génétique pour le GPD en utilisant un panel de génétique d'association. Cette approche requiert à la fois des données de phénotypage et des données de génotypage. Les données de phénotypage sont issues de ce projet et ont été obtenues sur la même collection de lignées que celle utilisée dans le projet BreedWheat. Cela permettra d'accéder aux données de génotypage du projet BreedWheat pour réaliser la détection de régions impliquées par génétique d'association.

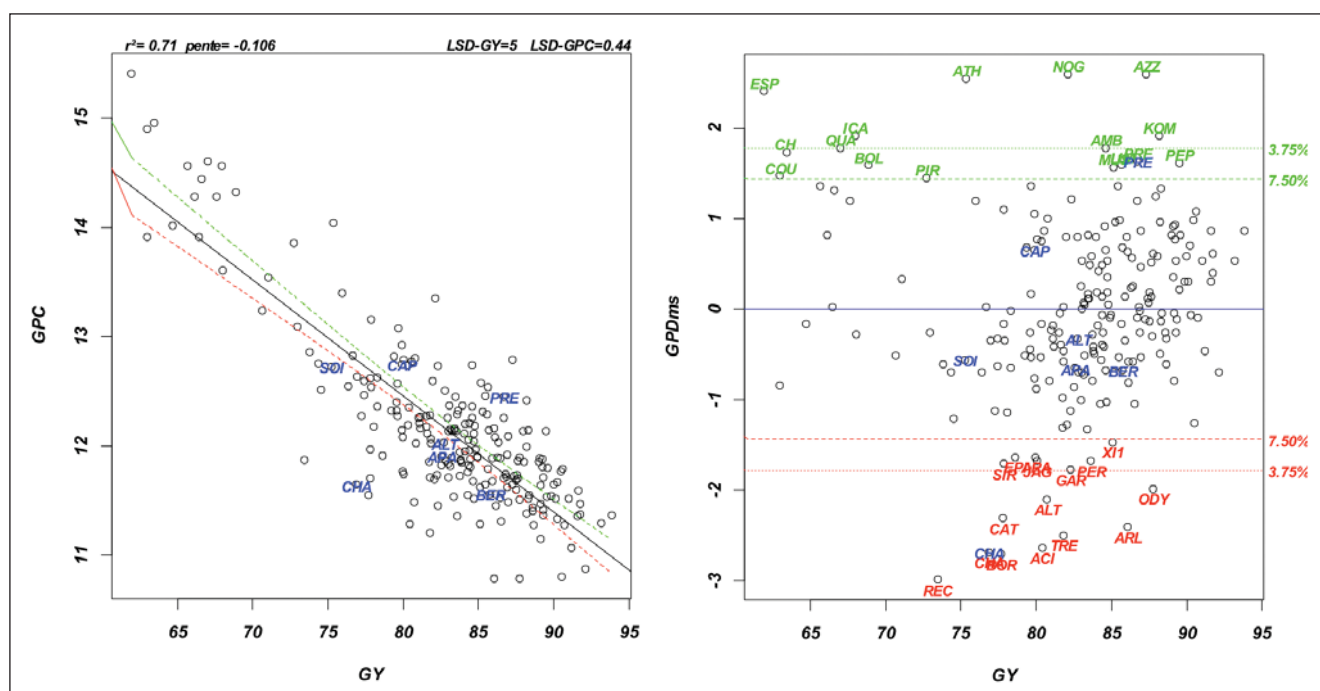


Figure 6 : (A) Régression rendement – concentrations en protéines sur les moyennes des 11 environnements. Les témoins sont en bleu. (B) GPD+ (vert) et GPD- (rouge) calculés sur la base de la régression précédente.

La régression rendement – concentration en protéines est toujours significativement négative quel que soit l'environnement. Les valeurs des coefficients de détermination s'étalent de 0.12 à 0.57. La moyenne des pentes égale à -0.072 est très proche de celle observée les années précédentes sur les groupes de lignées (Figure 4).

La régression moyenne est forte (Figure 6A), le fait de travailler sur les moyennes éliminant une partie des interactions génotype x milieu (Oury et Godin 2007). Si on applique les seuils statistiques utilisés lors de l'inscription sur les résidus standardisés (Figure 6B), 16 variétés sont déclarées GPD+ et 16 variétés GPD-. On retrouve les témoins Charger (GPD-) et Premio (GPD+) dont le comportement est déjà connu. A ces seuils statistiques correspondent un GPD de +/- 0.62 pour le bonus simple (seuil 7.50%) et de +/- 0.76 pour le bonus double (seuil 3.75%).

4. Conclusions

Ce projet a permis de confirmer plusieurs résultats concernant l'écart à la relation rendement – concentration en protéines (GPD), (1) l'importance de l'absorption post-floraison et (2) la corrélation forte entre GPD mesurés dans différentes conditions, en utilisant des séries variétales de précocité homogène. Il a permis de montrer que les mêmes processus expliquent probablement le GPD calculé pour une même variété cultivée dans différentes conditions. Il a aussi permis de décrire finement la dynamique d'absorption post-floraison et de proposer un contrôle par le statut azoté de la plante et la demande en azote des organes en croissance. Il ouvre enfin des perspectives intéressantes en termes de phénotypage, avec l'utilisation d'un apport d'engrais marqué, et en terme de génétique en ayant produit un jeu de données qui pourra être utilisé pour réaliser une étude de génétique d'association.

Références bibliographiques

- Bloom, A J, M Burger, J S R Asensio and A B Cousins** (2010). Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and Arabidopsis. *Science* 328: 899-903.
- Bloom, AJ, M Burger, BA Kimball and PJ Pinter, Jr.** (2014). Nitrate assimilation is inhibited by elevated CO₂ in field-grown wheat. *Nature Climate Change* 4: 477-480.
- Bogard, M, V Allard, M Brancourt-Hulmel, E Heumez, J-M Machet, M-H Jeuffroy, P Gate, P Martre and J Le Gouis** (2010). Deviation from the grain protein concentration – grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat. *Journal of Experimental Botany* 61: 4303-4312.
- Borrell, A K, G L Hammer and E Oosterom** (2001). Stay-green: a consequence of the balance between supply and demand for nitrogen during grain filling? *Annals of Applied Biology* 138: 91-95.
- Coque, M and A Gallais** (2007). Genetic variation for nitrogen remobilization and postsilking nitrogen uptake in maize recombinant inbred lines: Heritabilities and correlations among traits. *Crop Science* 47: 1787-1796.
- Fossati, D, A Fossati and B Feil** (1993). Relationship between grain yield and grain nitrogen concentration in winter triticale. *Euphytica* 71: 115-123.
- Gate, P, A Blondlot, D Gouache, O Deudon and L Vignier** (2008). Impacts of climate change on wheat growth in France. What solutions and actions to undertake? *Oléagineux Corps gras Lipides* 15: 332-336.
- Hogy, P, H Wieser, H Kohler, K Schwadorf, J Breuer, J Franzaring, R Muntiferer and A Fangmeier** (2009). Effects of elevated CO₂ on grain yield and quality of wheat: results from a 3-year free-air CO₂ enrichment experiment. *Plant Biology* 11: 60-69.
- Intergovernmental Panel on Climate Change** (2007). Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. In Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, eds. ML Parry, OF Canziani, JP Palutikof, PJ van der Linden and CE Hanson, 976: Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kichey, T, B Hirel, E Heumez, F Dubois and J Le Gouis** (2007). In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlate with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crops Research* 102: 22-32.
- Le Gouis, J, D Béghin, E Heumez and P Pluchard** (200). Genetic differences for nitrogen uptake and nitrogen utilisation efficiencies in winter wheat. *European Journal of Agronomy* 12: 163-173.
- Löffler, C M, T L Rauch and R H Busch** (1985). Grain and plant protein relationships in hard red spring wheat. *Crop Science* 25: 521-524.
- Lopez-Bellido, L, RJ Lopez-Bellido and FJ Lopez-Bellido** (2006). Fertilizer nitrogen efficiency in durum wheat under rainfed Mediterranean conditions: Effect of split application. *Agronomy Journal* 98: 55-62.
- Martre, P, J R Porter, P D Jamieson and E Triboï** (2003). Modeling grain nitrogen accumulation and protein composition to understand the sink/source regulations of nitrogen remobilization for wheat. *Plant Physiology* 133: 1959-1967.
- Monaghan, J M, J W Snape, A J S Chojecki and P S Kettlewell** (2001). The use of grain protein deviation for identifying wheat cultivars with high protein concentration and yield. *Euphytica* 122: 309-317.
- Oury, F X and C Godin** (2007). Yield and protein concentration in bread wheat: how to use the negative relationship between the two characters to identify favourable genotypes. *Euphytica* 157: 45-57.
- Oury, F-X, P Bérard, M Brancourt-Hulmel, C Depatureaux, G Doussinault, N Galic, A Giraud, E Heumez, C Lecomte, P Pluchard, B Rolland, M Rousset and M Trottet** (2003). Yield and grain protein concentration in bread wheat: a review and a study of multi-annual data from a French breeding program. *Journal of Genetics and Breeding* 57: 59-68.
- Sylvester-Bradley, R and D R Kindred** (2009). Analysing nitrogen responses of cereals to prioritize routes to the improvement of nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany* 60: 1939-1951.
- Van Sanford, D A and C T MacKown** (1986). Variation in nitrogen use efficiency among soft red winter wheat genotypes. *Theoretical and Applied Genetics* 72: 158-163.

Synthèse des programmes de recherche 2010



Retrouvez l'ensemble des informations
sur les programmes de recherches sur le site

www.fsov.org



Section Céréales et Protéagineux
44, rue du Louvre - 75001 Paris
Tél. : 01 42 33 79 09
E-mail : fsov@gnis.fr



ISBN : 978-2-36397-126-5



Janvier 2015 - D1289