



## 2010 E

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



### Objectifs



L'objectif dans les tentatives d'introgessions 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. Les translocations réalisées avec les bras du chromosome 1 du seigle doivent être mieux connues et exploitées tant au bénéfice de caractéristiques agronomiques (rendement et résistance aux maladies) que technologiques du blé tendre.

### Contexte

Le chromosome 1R porte une information génétique qui, une fois intégrée dans le génome du blé, permet d'aboutir à des lignées très productives. Malheureusement cette information génétique a été peu utilisée par les sélectionneurs français à cause d'effets délétères sur la valeur technologique et boulangère des farines. Nous proposons ici une nouvelle méthodologie pour surmonter cette difficulté. L'obtention de lignées transloquées sur les bras long et court des chromosomes 1A et 1B du blé par les bras long et court du chromosome 1R du seigle va donner aux sélectionneurs des possibilités d'amélioration agronomiques et technologiques non encore évaluées à ce jour. Ce matériel original, ainsi que les lignées recombinantes quasi-isogéniques obtenues, permet d'élargir la base génétique des blés cultivés. Il sera testé dans des conditions conventionnelles et en faibles intrants. L'impact de ces translocations sur la composition du grain (pentosanes, protéines, amidon) ainsi que sur les propriétés technologiques laisse entrevoir des innovations variétales qu'il convient de mieux connaître.

## Protocole, Matériel & Méthode

Les tâches à mettre en œuvre sont les suivantes :

**E**xtraction de la translocation 1AS.1RL

**P**roduction de lignées quasi-isogéniques (au total, pour l'ensemble des translocations x descendance, 110 plantes seront sélectionnées)

**V**érifier l'intégrité des bras des chromosomes transloqués à l'aide de marqueurs moléculaires

**A**nalyses moléculaires pour choix définitif des lignées quasi-isogéniques (au total, on ne gardera que 44 plantes quasi-isogéniques des parents blé récurrents)

**M**ultiplication en année 1 des lignées de substitution, de translocations dans Courtot, de Courtot et des 4 parents des lignées quasi-isogéniques soit 11 génotypes.

**M**ultiplication des lignées isogéniques

**E**valuation au champ des différentes lignées selon deux types d'essais (fertilisation raisonnée et faibles intrants) en plusieurs lieux. Cette production multi-locale sera conduite en année 1 et 2 pour les lignées transloquées et de substitution et seulement en année 3 pour les lignées quasi isogéniques. Des notations seront faites en cours de végétation (hauteur, précocité, résistance aux maladies...). Un échantillon de grains de chaque lignée sera envoyé à Clermont-Ferrand pour analyse technologique et boulangère

**E**tude de la stabilité chromosomique des plantes euploïdes des quatre translocations et de Courtot. Les chromosomes de 500 plantes de la descendance de chaque génotype seront dénombrées afin d'évaluer la proportion de plantes aneuploïdes, et par la suite à l'aide de GISH, il sera possible de savoir si le chromosome manquant ou le chromosome surnuméraire est le chromosome transloqué.

## Résultats escomptés et valorisations

**I**dentification de translocations apportant un net avantage sur des caractéristiques agronomiques et technologiques

**E**largissement de la base génétique des blés cultivés actuels tant pour la valeur agronomique que technologique

**I**dentification d'éventuels marqueurs à utiliser dans les descendance ayant l'une de ces translocations pour accroître la valeur agronomique et / ou technologique.

## Fonds engagés

Les fonds engagés pour ce programme de 3 ans sont de 478 284 € dont 200 000 € d'aide FSOV.



FSOV

JEUDI 8 JANVIER 2015

## EVALUATION ET EXPLOITATION DE TRANSLOCATIONS BLÉ-SEIGLE DANS LE BLÉ TENDRE

**Jahier Joseph**

PARTENAIRES – INRA, UMR IGEPP, Le Rheu  
UMR GDEC, Clermont-Ferrand  
- C.E.T.A.C. [ Centre d'Etudes Techniques pour  
l'Amélioration des Céréales]

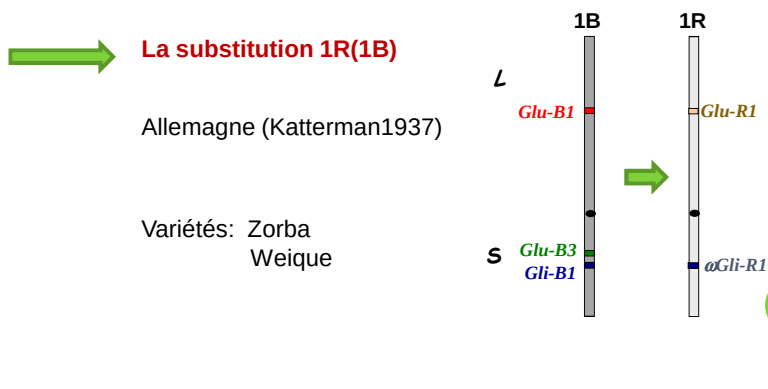


### Introduction

Transfert d'information génétique à partir d'espèces apparentées

Introgressions exploitables : segment transféré court

Exception: introduction du chromosome 1R du seigle et du bras chromosomique 1RS





### → La translocation 1BL.1RS

Origine: Allemagne, croisement lignée 1R(1B) × blé URSS

Diffusion: très large

Variétés: Kavkaz, Aurora, Veery...

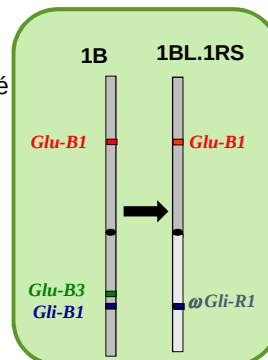
**Résistance aux maladies:** *Sr31*, *Lr26*, *Yr9*, *Pm8*

**Rendement et composantes du rendement**

- + Biomasse aérienne, fertilité/épillet, PMG, durée de la période de remplissage
- Blés de printemps

**Valeur technologique et boulangère**

- Diminution des propriétés rhéologiques des pâtes
- Collant des pâtes
- Importance du fonds génétique



Normal 1B 1BL1RS



### → La translocation 1AL.1RS

Origine: tritcale 'Gauchon' × blé (USA)

Variété: Amigo (1995)

Diffusion: USA

**Résistance aux maladies**

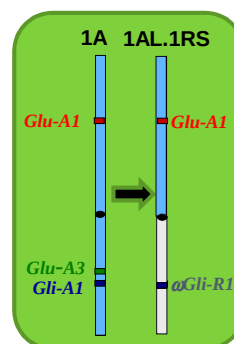
*Schizaphis graminum* (greenbug), *Pm17*, *Sr31*

**Rendement et composantes du rendement**

- Biomasse aérienne, PMG, durée remplissage
- Effet + sur le système racinaire: Pavon 1AL.1RS > Pavon 1BL.1RS > Pavon

**Valeur technologique et boulangère**

Moins d'effets négatifs que 1BL.1RS







### Comparaison des 2 translocations

Les 2 translocations ont un effet positif sur le rendement

1AL.1RS serait moins délétère que 1BL.1RS sur la valeur boulangère

Mais la comparaison manque de pertinence car l'origine du 1RS n'est pas la même pour les 2 translocations

### Notre projet

- 1 Revisiter l'intérêt du 1RS transloqué sur le 1A et sur le 1B

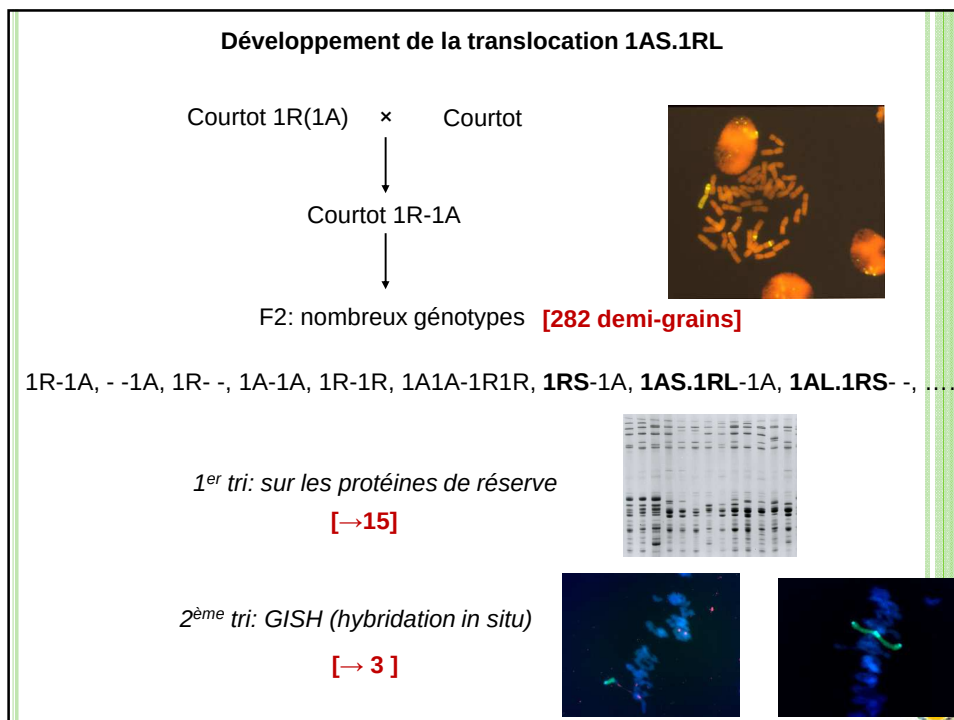
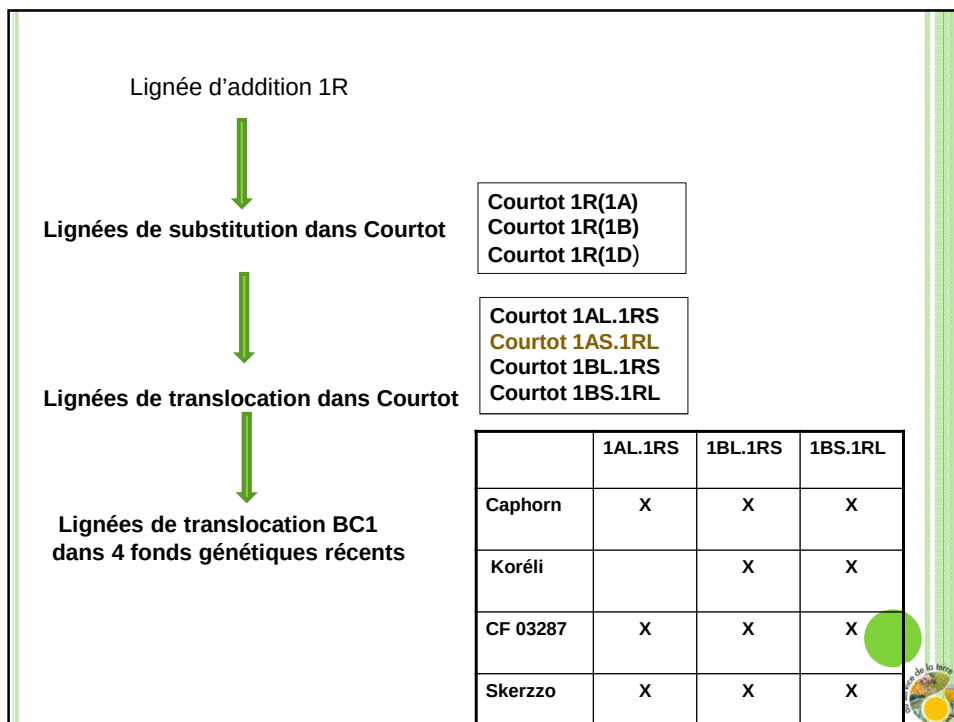
*Nous avons développé, à partir du même bras chromosomique 1RS les deux translocations 1AL.1RS et 1BL.1RS. La comparaison des deux translocations devient ainsi pertinente*

- 2 Évaluer l'intérêt du bras 1RL dans les translocations 1AS.1RL et 1BS.1RL



## Le matériel végétal

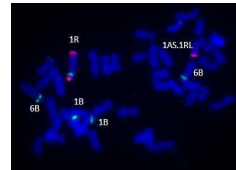






### Développement de la translocation 1AS.1RL

→ 3 plantes:      1AS.1RL + 1R      2n = 42  
                          1AS.1RL + 1R      "  
                          1AS.1RL              2n = 41



descendance: sélection de la lignée de translocation 1AS.1RL

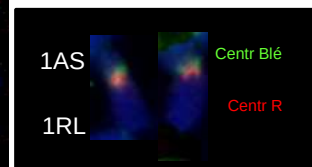
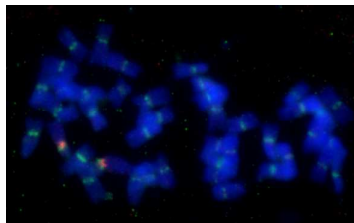


Évaluation en 2014-2015

Vérifier l'intégrité du bras chromosomique 1RS ou 1RL dans les translocations

#### Hybridation in situ:

hybrider des sondes  
détectant les  
centromères du blé  
et du seigle



### Evaluation des lignées de substitution et de translocation dans Courtot





### Stabilité des lignées transloquées de Courtot

|                | Plantes<br>dénombrées | Plantes<br>aneuploïdes | Fréquence<br>d'aneuploïdes |
|----------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|
| 1AL.1RS        | 461                   | 13                     | 2,8 %                      |
| 1BL.1RS        | 502                   | 10                     | 2,0 %                      |
| 1BS.1RL        | 507                   | 11                     | 2,2 %                      |
| <b>Courtot</b> | 475                   | 12                     | 2,5 %                      |

La présence des chromosomes transloqués n'induit pas d'instabilité chromosomique.  
De plus, la paire de chromosomes transloqués n'est pas plus affectée que les autres paires chromosomiques par l'aneuploïdie



### Evaluation des lignées de substitution et de translocation dans Courtot

#### ■ Rendement en CONVENTIONNEL

|             |                                                 |
|-------------|-------------------------------------------------|
|             | 2010 : Moyenne sur<br>2 essais en conventionnel |
| Cour 1R(1A) | 49,7                                            |
| Cour 1R(1B) | 71,4                                            |
| Cour 1R(1D) | 46,6                                            |
|             |                                                 |
| Courtot     | 79,7                                            |

#### ■ Résistance aux maladies: aussi sensibles que Courtot





### Evaluation des lignées de substitution et de translocation dans Courtot

#### ■ Caractéristiques technologiques

Récolte 2010 (Rennes, essai conventionnel)

| Lignées              | Protéines | Dureté | Viscosité<br>Pento | W     | P     | L     | P/L  |
|----------------------|-----------|--------|--------------------|-------|-------|-------|------|
| <b>Cour 1R (1A)</b>  | 17.6      | 93     | 1.87               | 461.5 | 128.7 | 112.2 | 1.15 |
| <b>Cour 1R (1B )</b> | 14.8      | 79     | 1.71               | 96.2  | 45.1  | 68.3  | 0.68 |
| <b>Cour 1R (1D)</b>  | 17.7      | 107    | 1.95               | 166.4 | 52.8  | 175.7 | 0.3  |
| <b>Cour 1AL-1RS</b>  | 14.1      | 101    | 2.08               | 180.7 | 92.4  | 56.1  | 1.65 |
| <b>Cour 1BS-1RL</b>  | 17.4      | 88     | 1.63               | 224.9 | 55    | 211.1 | 0.26 |
| <b>Cour 1BL-1RS</b>  | 14        | 76     | 1.92               | 167.7 | 60.5  | 106.1 | 0.57 |
| <b>Courtot</b>       | 14.5      | 82     | 1.98               | 300.3 | 92.4  | 122   | 0.76 |

- Les rendements faibles des lignées 1R(1A), 1R(1D) et 1BS-1RL ont augmenté de 3 points la teneur en protéines.
- Seule la lignée 1R(1A) a des caractéristiques rhéologiques qui répondent à cette augmentation.
- Toutes les lignées restent dans la classe de dureté de Courtot (Hard)
- La suppression du 1BL cause une diminution des pentosanes hydrosolubles
- On confirme que le 1RS a moins d'effet négatif sur la ténacité et la force avec la translocation 1AL-1RS que pour 1BL-1RS.

### Evaluation de la lignée de translocation 1AS.1RL dans Courtot

La lignée 1AS-1RL dans Courtot, obtenue au cours de ce programme, a été multipliée en 2014.

Les observations préliminaires montrent un effet favorable du 1RL sur plusieurs caractéristiques de qualité.

L'évaluation finale de la translocation 1AS-1RL ainsi que des trois autres dans Courtot sera obtenue à l'issue de l'essai conduit en 2015.





**Evaluation des lignées transloquées BC1F4  
dans 4 fonds génétiques: Caphorn  
Koréli  
CF03287  
Skerzzo**



**Lignées transloquées BC1F4 dans 4 fonds génétiques**

■ **Résistance aux maladies:** même constat que dans Courtot

■ **Rendement**

|         |                 | Fonds génétiques |        |         |         |
|---------|-----------------|------------------|--------|---------|---------|
|         |                 | Caphorn          | Koréli | CF03287 | Skerzzo |
| 1BS.1RL | 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      |

Effet délétère sur le rendement

Effet fonds génétique

Différence entre lignées au sein des familles: il aurait fallu atteindre le BC2





### ■ Rendement (suite)

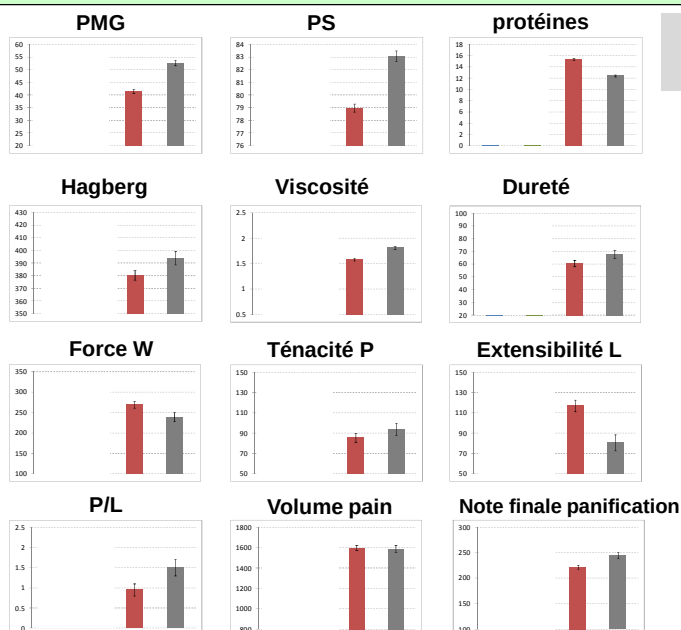
|         |                 | Fonds génétiques |        |         |         |
|---------|-----------------|------------------|--------|---------|---------|
|         |                 | Caphorn          | Koréli | CF03287 | Skerzzo |
| 1BL.1RS | lignées         | 1                | 3      | 7       | 4       |
|         | %Rdt /récurrent | 82.1             | 78.8   | 73.4    | 85.2    |
|         | max             |                  | 88.7   | 84.8    | 88.1    |
|         | mini            |                  | 71     | 57.5    | 83.3    |

Aucune lignée n'atteint 90% du parent récurrent



### ■ Caractéristiques technologiques des lignées BC1F4

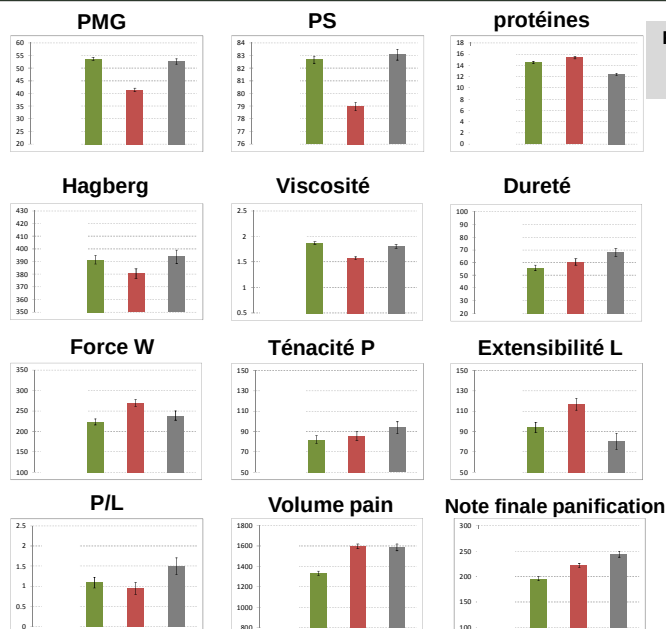
les lignées 1BS.1RL (rouge) et leurs parents récurrents (gris)





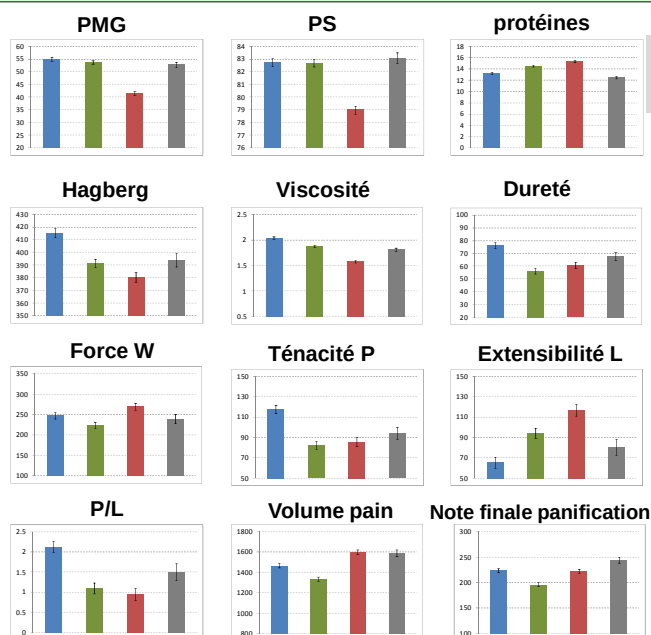
### ■ Caractéristiques technologiques des lignées BC1F4

les lignées 1BL.1RS, les lignées 1BS.1RL et leurs parents récurrents



### ■ Caractéristiques technologiques des lignées BC1F4

Les lignées 1AL.1RS, les lignées 1BL.1RS, les lignées 1BS.1RL, et leurs parents récurrents







## Conclusions

**Cette étude constitue la 1<sup>ère</sup> comparaison pertinente des translocations blé-seigle impliquant le chromosome 1R**

### **1BS.1RL**

Rendement: effet négatif de la translocation

L'élimination du 1BL a un effet pléiotropique sur des caractéristiques de développement et aussi de remplissage du grain qui ne sont pas compensés par le 1RL

PMG et PS très faibles → Teneur en protéines élevée

Technologie: Le volume de pain est égal celui des parents et la note finale en panification est un peu inférieure au parent témoin

### **1BL.1RS**

Rendement: effet négatif sauf dans Courtot

Technologie: Le 1BS porte des gènes très importants dans la construction du réseau protéique du gluten. Les sècalines du 1RS ne compensent qu'imparfaitement l'élimination du 1BS.

Les lignées obtenues ne se différencient pas des variétés 1BL.1RS existantes



### **1AL.1RS**

Rendement: Cette translocation a révélé d'importantes différences variétales. Elles est apparue intéressante dans Courtot et Caphorn

Technologie: Le 1AS apporte une contribution moins importante dans le réseau polymérique que le 1BS. L'élimination du 1AS et son remplacement par 1RS est favorable à plusieurs caractéristiques de la valeur technologique. La sélection devrait aboutir à des variétés transloquées satisfaisantes.

## Perspectives

- Préciser l'intérêt de 1AL.1RS et 1BL.1RS par l'évaluation des BC2 dans les 4 fonds génétiques Caphorn, CF03287, Koréli et Skerzzo
- Publications
  - en 2015: les translocations dans Courtot
  - en 2016: comparaison 1AL.1RS vs 1BL.1RS
- Recombiner 1RS avec 1AS et 1BS





## Remerciements

Comité scientifique du FSOV

GNIS

Partenaires du projet

INRA, UMR GDEC à Clermont-Ferrand: Branlard G., Faye A.

CETAC: Caussade Semences : Dutriez S.  
Lemaire-Deffontaines: Delhay J.M.  
Momont et fils: Momont Ph.  
R2n: Duchalais L.  
Saaten Union: Lein V.  
Secobra: Giraudeau P.  
Unisigma: Lerebour Ph.



## 2010 H

# Etablissement d'une base de données de marqueurs liés à des gènes d'intérêt pour la sélection assistée chez le blé tendre



## Objectifs

L'objectif de ce projet est de créer et de maintenir une base de données structurée pour le blé tendre regroupant un maximum de l'information disponible dans la littérature scientifique afin de la rendre plus facilement exploitable par les sélectionneurs.

## Contexte

L'amélioration des espèces cultivées dans les années à venir est devenue un enjeu mondial compte tenu de l'accroissement des besoins aussi bien pour répondre à la nécessité de nourrir l'humanité, que de pallier la réduction des ressources industrielles, le pétrole en particulier. Cet accroissement passe par une amélioration significative du potentiel agronomique des espèces cultivées par le biais de la sélection. Jusqu'à présent, les méthodes conventionnelles ont permis de maintenir des rendements susceptibles de couvrir la consommation, mais les contraintes nouvelles de l'agriculture telles que la réduction des intrants et des surfaces arables, impliquent la mise en place de nouveaux schémas de sélection plus performants et plus courts. L'apparition des nouveaux outils de génomiques lors des deux dernières décennies a entraîné une augmentation de la quantité de données de liaison entre marqueurs moléculaires et gènes d'intérêt, conduisant parfois au clonage de ces derniers. Cette nouvelle information doit être maintenant exploitée par les programmes de sélection. Dans la réalité, ces données de liaison entre marqueurs moléculaires et gènes d'intérêt sont difficiles d'accès pour les sélectionneurs en raison de l'absence de base de données centralisée et exhaustive et en raison de leur dispersion dans les articles scientifiques, en langage naturel, non structuré.

## Protocole, Matériel et Méthode

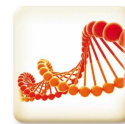
Les informations visées sont toutes celles nécessaires à l'exploitation optimale des marqueurs en sélection à haut débit (soient *nom des marqueurs, conditions de révélation, variétés de référence*) pour tous les gènes impliqués dans la réponse à quatre thématiques majeures (résistances aux (1) stress biotiques et (2) abiotiques, (3) développement de la plante et (4) qualité boulangère). Les marqueurs seront ensuite validés au moyen d'une plate-forme de génotypage à haut débit afin que leur pertinence et leur aptitude à être utilisés dans les schémas de sélection puissent être mesurées. Au final, toutes ces informations seront transférées vers les laboratoires partenaires pour exploitation sur du matériel agronomique et que leur efficacité soit mesurée en terme d'association avec les gènes considérés dans le matériel de sélection européen.

## Résultats escomptés et valorisations

Les résultats attendus consistent en un jeu de marqueurs expertisés et validés permettant soit le diagnostic (marqueur dans le gène d'intérêt) soit une estimation (marqueur à proximité du gène d'intérêt) de la valeur de caractères d'intérêt agronomique suivis régulièrement dans les programmes de sélection français ou européens. Ces marqueurs seront directement valorisés par une exploitation dans les schémas de sélection des semenciers afin d'améliorer les programmes de sélection assistée. Les résultats pourront également être valorisés par les études de génétique d'association qui seront réalisées dans le cadre de ce projet, ce qui augmentera leur valeur.

## Fonds engagés

Les fonds engagés pour ce programme de 3 ans sont de 548 481 € dont 383 937 € d'aide FSOV.



**FSOV** JEUDI 8 JANVIER 2015

## 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.

### SOURDILLE Pierre

### INRA GDEC

Marion RANOUX, Claire NEDELLEC, Emmanuelle CARIOU-PHAM, Robert BOSSY, Claude de VALLAVIEILLE-POPE, Marc LECONTE, Dialekti VALSAMOU, Delphine HOURCADE, Laurent GUERREIRO

PARTENAIRES : INRA (GDEC CLERMONT-FERRAND, MIG JOUY, BIOGER GRIGNON), ARVALIS INSTITUT DU VÉGÉTAL, UFS



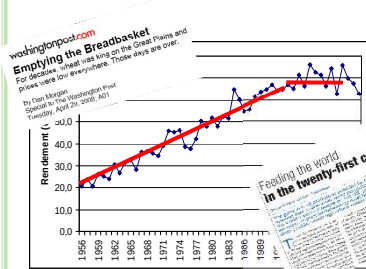


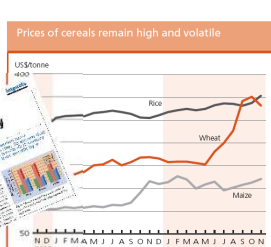





## LES DÉFIS DE L'AMÉLIORATION DU BLÉ

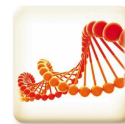
- Un seul objectif : fournir de façon régulière une production suffisante et de bonne qualité au travers d'un système agricole durable







## LES DÉFIS DE L'AMÉLIORATION DU BLÉ



### ○ Un contexte unique dans l'histoire de l'humanité

- Demande accrue : hausse de production de 2%/an jusqu'en 2050 (0.9% actuellement)
- Stagnation des rendements sur les 10 dernières années
- Compétition accrue entre utilisations alimentaires et non alimentaires (surfaces et production)
- Changement climatique rapide ; réduction et distribution des ressources en eau ; réduction des terres arables



## POUR RELEVER CES DÉFIS...

### ○ Une deuxième révolution verte...

- Exploiter au mieux les ressources génétiques cultivées ou exotiques
- Améliorer les connaissances de celles-ci (phénotypiques et alléliques)
- Améliorer les schémas de sélection (durée, précision)

**Utiliser les outils de génomique  
=  
Sélection Assistée par Marqueurs**

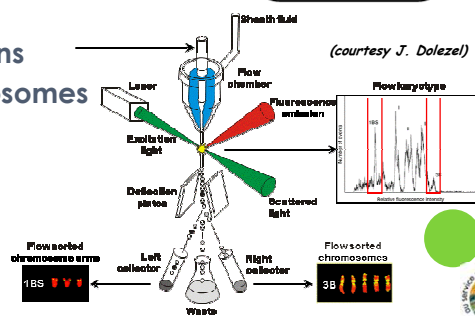
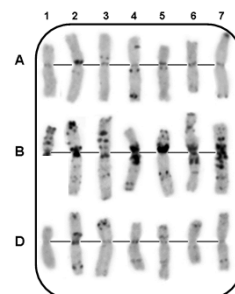






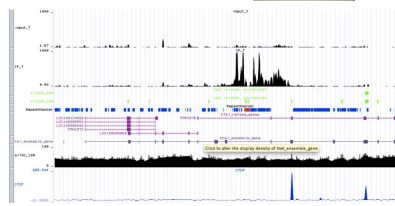
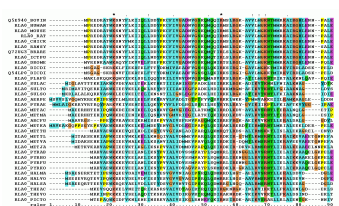
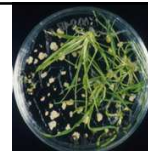
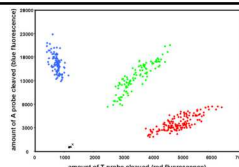
## GÉNOMIQUE DU BLÉ

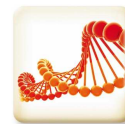
- Un génome complexe...
  - Polyploïde ( $2n = 6x = 42$ )
  - 17 Gb = 5 fois le génome humain
  - 85% de séquences répétées
- Mais des avantages
  - Aneuploïdes
  - Tolérance des mutations
  - Tri des bras de chromosomes



## GÉNOMIQUE DU BLÉ

- Depuis 10 ans, développement des outils moléculaires chez le blé tendre :
  - 100aines K marqueurs moléculaires (cartes génétiques)
  - EST (>1.1M, puces d'expression) + RNASeq
  - Banques de grands fragments
  - Cartes physiques (par chromosome)
  - Validation fonctionnelle
  - Séquences (WGS, 3B, IWGSC)

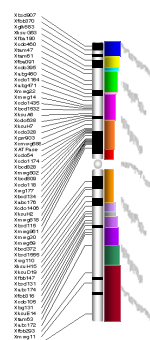
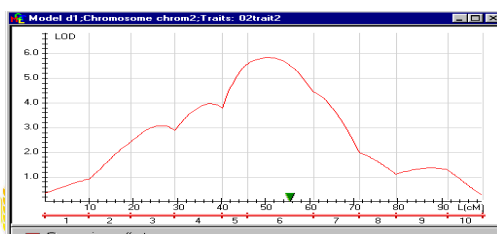




## GÉNOMIQUE DU BLÉ

### Capacité d'identifier des gènes impliqués dans des caractères d'intérêt agronomique :

- Liaison avec des marqueurs (QTL, association)
- Identification de gènes candidats (expression, bio-analyse)
- Clonage positionnel
- Analyse de la variabilité

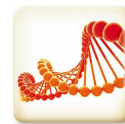


## PROBLÉMATIQUE

- Cette information est :
  - Dispersée dans la bibliographie et sur les sites internet (>3000 articles en 10 ans)
  - Incomplète et non validée
  - Pas adaptée au haut débit
  - Pas adaptée aux variétés élités actuelles
- Il faut donc rassembler, structurer et valider toute cette information = **base de données**







## OBJECTIFS DU PROJET



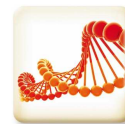
- Développement et incrémentation de la base de données
- Validation des protocoles moléculaires
- Validation sur collections
- Étude d'association



## DÉVELOPPEMENT ET INCRÉMENTATION DE LA BASE DE DONNÉES

- Recherches automatisée des informations (INRA>250 revues)
- Quatre thématiques
  - stress biotiques
  - stress abiotiques
  - développement
  - qualité boulangère





## DÉVELOPPEMENT ET INCRÉMENTATION DE LA BASE DE DONNÉES

- Développement de corpus
  - Entités simples « figées » : gènes, marqueurs, variétés
  - Entités complexes « non-figées » : caractères : problèmes d'ambiguïté et de diversité des termes = WheatPhenotype
- Développement d'un panel d'entraînement
  - Annotation manuelle d'articles
  - Relations entre entités
- Développement d'un moteur de recherche

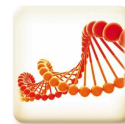


## DÉVELOPPEMENT ET INCRÉMENTATION DE LA BASE DE DONNÉES

### ○ Résultats sur les entités figées

|                 | Comparaison exacte |           |      | Recouvrement partiel |             |             |
|-----------------|--------------------|-----------|------|----------------------|-------------|-------------|
|                 | Rappel             | Précision | F1   | Rappel               | Précision   | F1          |
| Gène            | 0,61               | 0,49      | 0,54 | <b>0,73</b>          | <b>0,61</b> | <b>0,66</b> |
| Marqueur        | 0,58               | 0,65      | 0,61 | 0,59                 | 0,66        | 0,62        |
| Type            | 0,54               | 0,62      | 0,58 | 0,56                 | 0,64        | 0,60        |
| Taille d'allèle | 0,39               | 0,49      | 0,43 | 0,46                 | 0,50        | 0,48        |





## DÉVELOPPEMENT ET INCRÉMENTATION DE LA BASE DE DONNÉES

### ○ Résultats sur les entités non-figées

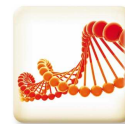
|                       | Sans désambiguïsation |                | Avec désambiguïsation |                |
|-----------------------|-----------------------|----------------|-----------------------|----------------|
| Validation            | # de termes           | Proportion (%) | # de termes           | Proportion (%) |
| <b>Exemples &gt;0</b> | <b>245</b>            | <b>81</b>      | <b>212</b>            | <b>95</b>      |
| Précis                | 227                   | 76             | 176                   | 79             |
| Généraux              | 18                    | 5              | 36                    | 16             |
| <b>Exemples &lt;0</b> | <b>54</b>             | <b>19</b>      | <b>11</b>             | <b>5</b>       |
| Erreur AL             | 5                     | 1,7            | 4                     | 2              |
| Erreur M              | 16                    | 5,4            | 7                     | 3              |
| Erreur P              | 33                    | 11             | 0                     | 0              |



## VALIDATION DES PROTOCOLES MOLÉCULAIRES

- Rechercher des marqueurs automatisables (SSR, SNP, STS)
- Rechercher des lignées de référence (+/-)
- Validation protocoles :
  - Vérifier que toutes les étapes sont OK
  - Rechercher si validation par ailleurs
- Adaptation au haut débit :
  - Rechercher d'autres marqueurs voisins si besoin





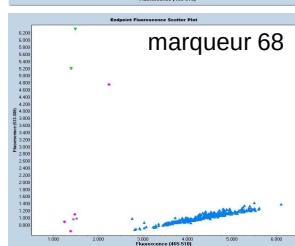
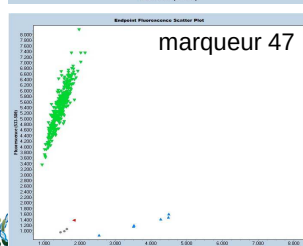
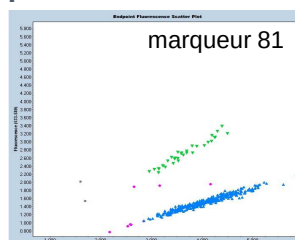
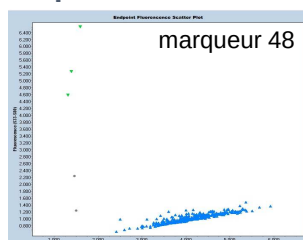
## VALIDATION DES PROTOCOLES MOLÉCULAIRES : EXEMPLE DE *VRNA1*

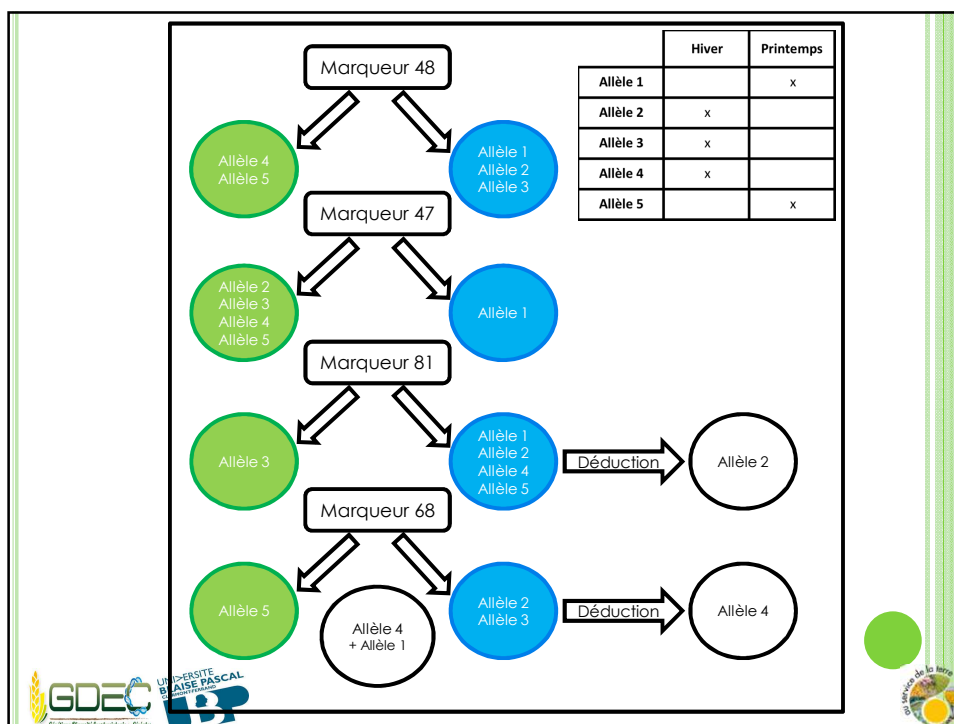
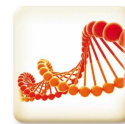
- Contrôle de la vernalisation chez le blé
- 10 allèles : 5 hiver et 5 printemps
  - 5 dans promoteur (3+2)
  - 3 dans intron 1 (1+2)
  - 2 dans exon 7 (1+1)
- 7 marqueurs SNP pour différencier tous les allèles



## VALIDATION DES PROTOCOLES MOLÉCULAIRES : EXEMPLE DE *VRNA1*

- Exemple des 5 allèles du promoteur

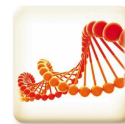




## VALIDATION DES PROTOCOLES MOLÉCULAIRES : BILAN

| Thématiques        | # de gènes | # de gènes avec un marqueur lié | # marqueurs testés sur panel référence | # de marqueurs testés sur panel élite |
|--------------------|------------|---------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|
| Qualité boulangère | 16         | 10                              | 31                                     | 20                                    |
| Stress biotiques   | 91         | 63                              | 158                                    | 115                                   |
| Stress abiotiques  | 6          | 3                               | 9                                      | 2                                     |
| Développement      | 13         | 13                              | 100                                    | 47                                    |
| Total              | 126        | 101                             | 298                                    | 184 (75 gènes marqueurs HD)           |





## ÉTUDE D'ASSOCIATION

- Évaluation de collections de 30 variétés au champ
  - Focalisation sur résistances
    - Septoriose
    - Fusariose
    - Oïdium
    - Rouille brune
    - Rouille jaune
    - Mosaïque
- Évaluation rouille jaune en conditions contrôlées
- Génétique d'association entre données de génotypage et de phénotypes

ARVALIS  
Institut du végétal

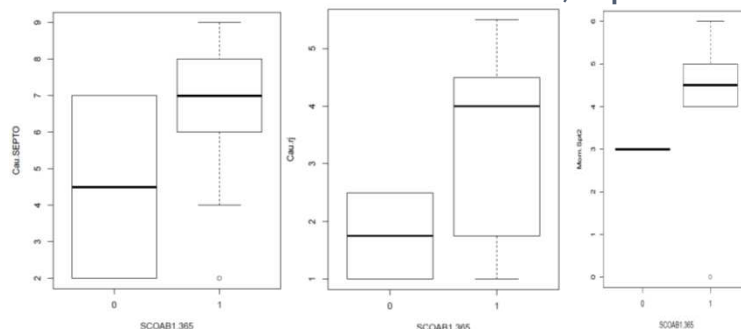
ufs  
Unité de  
Fonctionnement  
Scientifique

BIOGE  
R  
E



## ÉTUDE D'ASSOCIATION : QUELQUES RÉSULTATS

- Rouille brune : *Lr24*, marqueur SCOAB
  - Aucune variété avec l'allèle 0 (Rés) phénotypée pour rouille brune
  - Effet relatif sur les autres maladies RJ, Septoriose

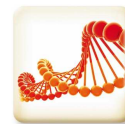


ARVALIS  
Institut du végétal

ufs  
Unité de  
Fonctionnement  
Scientifique

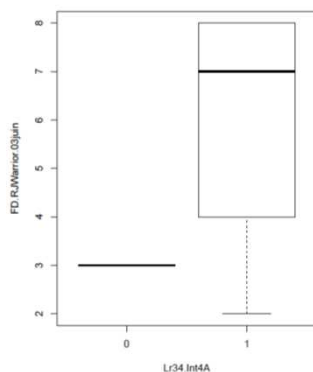
BIOGE  
R  
E





## ÉTUDE D'ASSOCIATION : QUELQUES RÉSULTATS

- Rouille brune : *Lr34*, marqueur Int4A ; allèle 0 (Rés)
  - Effet sur RJ ! Co-localisation avec *Yr18*



ARVALIS  
Institut du végétal

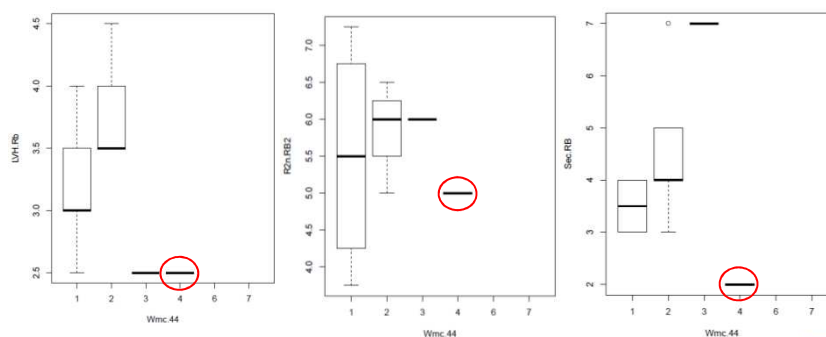
ufs  
Unité de Formation Supérieure

BIOGE  
R



## ÉTUDE D'ASSOCIATION : QUELQUES RÉSULTATS

- Rouille brune : *Lr46*, marqueur WMC44 ; allèle 4 (Rés)
  - Toisonдор et Arkeos portent l'allèle

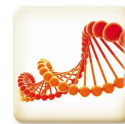


ARVALIS  
Institut du végétal

ufs  
Unité de Formation Supérieure

BIOGE  
R

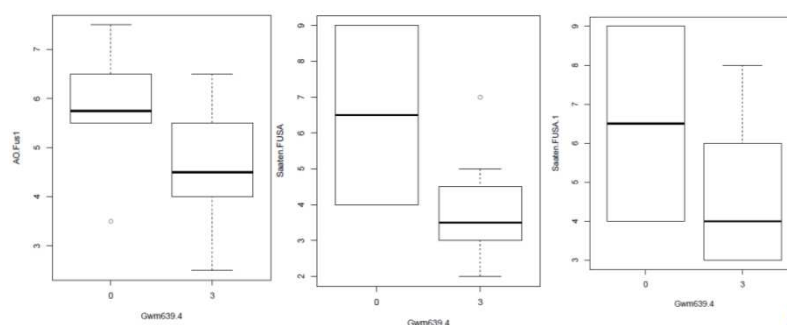




## ÉTUDE D'ASSOCIATION : QUELQUES RÉSULTATS

### ○ Fusariose: *FHB3*, marqueur GWM639 ; allèle 3 (Rés)

- 10 variétés portent l'allèle : Altigo, Apache, Barok, Haussman, JB Diego, Musik, Pakito, Paledor, Sokal, Solehio



ARVALIS  
Institut du végétal



BIOGE  
R



## ÉTUDE D'ASSOCIATION : QUELQUES RÉSULTATS

### ○ Septoriose: *STB8*, marqueur GWM611 ; allèle 4 (Rés)

- Maxwell porte l'allèle 4



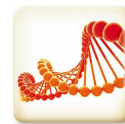
ARVALIS  
Institut du végétal



BIOGE  
R

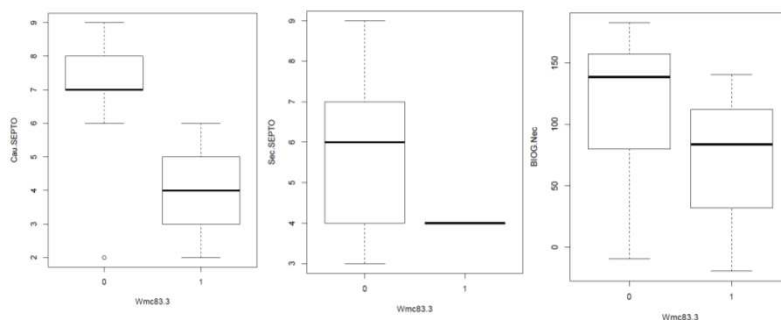






## ÉTUDE D'ASSOCIATION : QUELQUES RÉSULTATS

- Septoriose: *STB3*, marqueur WMC83 ; allèle 1 (Rés)
  - 7 variétés portent l'allèle 1 : Allez-y, Ambition, Boregar, Koreli, Maxwell, Renan, Tulip



ARVALIS  
Institut du végétal

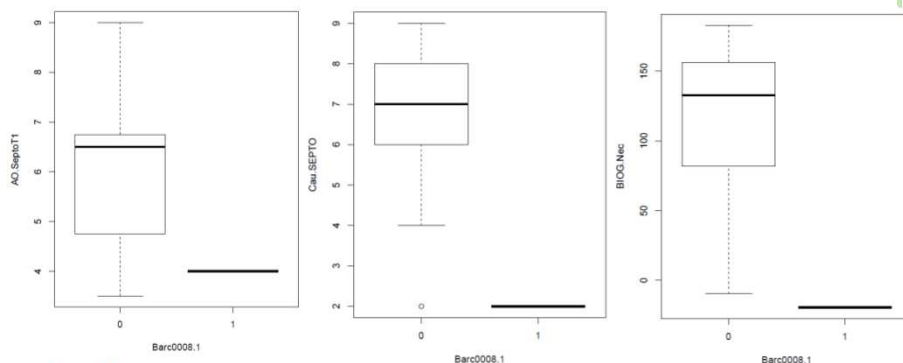
ufs  
Unité de Formation  
Supérieure

BIOGE  
R



## ÉTUDE D'ASSOCIATION : QUELQUES RÉSULTATS

- Septoriose: *STB2*, marqueur BARC8 ; allèle 1 (Rés)
  - 3 variétés portent l'allèle 1 : Camp-Rémy, Maxwell, Sokal
  - Regarder allèle à 283 bp au stade adulte

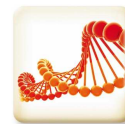


ARVALIS  
Institut du végétal

ufs  
Unité de Formation  
Supérieure

BIOGE  
R





## ÉTUDE D'ASSOCIATION : QUELQUES RÉSULTATS

- Rouille jaune: Yr32, marqueur WMC170 ; allèle à 208 bp (Rés)
  - Sur 19 variétés évaluées comme Yr32+, 18 sont 208+

| Variété   | Knowledge C.Pope | Yr32    |
|-----------|------------------|---------|
|           |                  | Wmc 170 |
| ALIAN     | Yr32             | 208     |
| ALZED     | Yr32             | 208     |
| ARKEOS    | Yr32             | 242     |
| ATLASS    | Yr32             | 208     |
| Barok     | Yr32             | 208     |
| BOREGAR   | Yr32             | 208     |
| CARRE     | Yr32             | 208     |
| EPIDOC    | Yr32             | 208     |
| EUCLIDE   | Yr32 ?           | 208     |
| GARCIA    | Yr32             | 208     |
| OAKLEY    | Yr32             | 208     |
| ORATORIO  | Yr32             | 208     |
| PERFECTOR | Yr32             | 208     |
| PIERROT   | Yr32             | 208     |
| ROBIGUS   | Yr32             | 208     |
| SCOR      | Yr32             | 208     |
| TOSONDO   | Yr32             | 208     |
| TRAPEZ    | Yr32             | 208     |
| TULIP     | Yr32             | 208     |

ARVALIS  
Institut du végétal



BIOGE  
R



## CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

- Extraction automatisée
  - Outils ~OK
  - Besoin d'articles expertisés pour entraînement
  - Mise à jour régulière de la base de données d'articles
- Validation des marqueurs
  - Besoin de lignées de référence
- Analyse de liaison
  - Besoin de données phénotypiques
- Incrémentation de la base
  - Exploitation des données BW et autres

GDEC  
Génétique des Céréales  
Environnement - Clermont

ARVALIS  
Institut du végétal

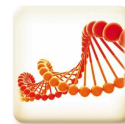


M I G  
Mathématiques  
Informatique  
& Génome



BIOGE  
R





## REMERCIEMENTS



- GDEC : M Ranoux, L Georges (GENTYANE)
- MIG : C Nédellec, R Bossy, D Valsamou, W Golik
- Arvalis : D Hourcade, E Cariou-Pham (L Guerreiro)
- UFS : Tous les partenaires pour les essais et les analyses d'articles !
- BIOGER : C de Vallavieille-Pope, M Leconte



## MERCI DE VOTRE ATTENTION !



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

genome.jouy.inra.fr/~rbossy/cgi-bin/FSOV/SAM.cgi

ministère Les plus visités Débuter avec Firefox

**FSOV SAM Marker Annotations**

Welcome to the FSOV SAM annotations database. Here you can search for knowledge gathered by the FSOV SAM Blé project about wheat phenotypes and genetic markers. Start the search by selecting an entity as a starting point.

**Select Entity**

|       |           |        |            |
|-------|-----------|--------|------------|
| Gene  | Marker    | Allele | AlleleSize |
| Trait | Phenotype | Type   | Variety    |

Copyright © INRA 2014

FSOV 2010 H



## 2010 P

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



#### Objectifs

Ce projet a pour objectif d'aborder cette question particulièrement complexe sous deux angles :

- celui de l'élaboration de la productivité pure
- et celui de l'élaboration de la productivité sous diverses contraintes.

#### Contexte

« Produire plus et produire mieux ». Ces quelques mots issus des conclusions du Grenelle de l'Environnement résument à eux seuls le défi majeur auquel l'agriculture doit faire face aujourd'hui et dans les années à venir. L'amélioration de la productivité restera toujours un objectif essentiel de la sélection et de la culture de céréales, mais ce dernier doit se conjuguer avec un objectif d'économie d'intrants et d'adaptation à des situations de contraintes multiples (température, disponibilité en eau, nutrition azotée, pression parasitaire, etc...).

## Protocole, Matériel & Méthode

Concernant l'élaboration de la productivité sous diverses contraintes, ce projet choisi deux situations agronomiques différentes : l'apport limité en eau en situation de températures moyennes élevées, et l'apport limité en azote minéral en situation de pression maladies moyennement contrôlée.

Associé à un phénotypage précis réalisé au champ, ce projet propose de mettre clairement en évidence les facteurs génétiques impliqués dans l'élaboration du rendement (marqueurs moléculaires) sous ces deux angles en développant des approches innovantes mettant en jeu les outils modernes de la génomique que sont le génotypage dense, ainsi que des analyses statistiques menant à la mise en évidence d'association génétique entre marqueurs moléculaires et variations phénotypiques ainsi que la validation de QTL.

## Résultats escomptés et valorisations

Les principaux résultats attendus sont les suivants :

- I**dentification de marqueurs moléculaires associés aux mécanismes d'élaboration du rendement y compris sous contraintes hydrique, thermique ou d'azote limitant en interaction avec une pression maladies. Ces marqueurs seront directement utilisables en sélection ou pour l'évaluation variétale ;
- A**cquisition d'une matrice de génotypage dense sur un panel commun utile pour toute analyse d'association génétique dans le projet mais aussi valorisable pour toute autre thématique de recherche hors projet ;
- V**alidation de QTL associés à l'élaboration du rendement ;
- E**tude des interactions génotypes/environnements permettant d'appréhender les caractères génétiques nécessaires à la création des idéotypes de demain.

## Fonds engagés

Les fonds engagés pour ce programme de 3 ans sont de 598 120 € dont 350 000 € d'aide FSOV.



*FsoV* JEUDI 8 JANVIER 2015

**IDENTIFICATION DES DÉTERMINISMES  
GÉNÉTIQUES PERMETTANT UNE ÉLABORATION  
OPTIMALE DU RENDEMENT SOUS  
CONTRAINTES (CLIMATIQUE, AZOTE ET  
MALADIES)**

**Laure DUCHALAIS**



**CONTEXTES ET OBJECTIFS**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>« Produire plus et produire mieux »</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>→ Objectif d'économie d'intrants</li> <li>→ Adaptation à des situations de contraintes multiples (température, disponibilité en eau, nutrition azotée, pression maladies...)</li> </ul> | <p><b>Développement d'outils</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>→ Génotypage haut-débit</li> <li>→ Développement d'outils statistiques tels que la génétique d'association</li> </ul> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|



**Mise en évidence des facteurs génétiques impliqués dans l'élaboration du rendement**  
 (avec ou sous contraintes de stress hydrique, azoté ou maladies)

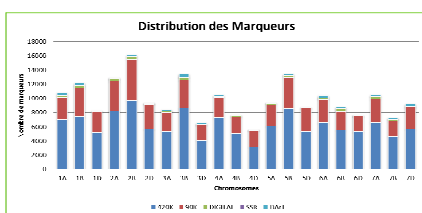




## MATÉRIEL ET MÉTHODES

## Matériel végétal

- Panel de 206 lignées
  - 148 variétés issues d'un panel «élite» Arvalis
  - 58 lignées issues des programmes de sélection Bioplante et R2N



## Génotypage

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



## MATÉRIEL ET MÉTHODES - PHÉNOTYPAGE

- 2 années de phénotypage: 2011 et 2012
- Évaluation en parcelles d'essai
- 2 répétitions par essai et par modalité
- Divers caractères mesurés (épiaison, hauteur, composantes de rendement, rendement, teneur en protéines, poids spécifique...)



## Contrainte hydrique

- 2 modalités IRR et SEC
- Site de Gréoux-les-Bains (04)

## Contrainte azotée et faible pression maladies

- 2 modalités N+F+ et N-F-
- 2 sites/an:
  - Prémesques (59) et Louville la Chenard (28) en 2011
  - Cappelle (59) et Louville la Chenard (28) en 2012





## MATÉRIEL ET MÉTHODES ANALYSE DES DONNÉES

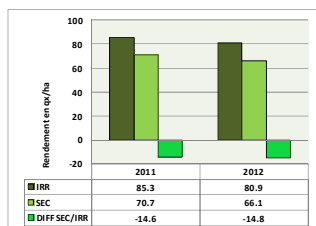
- Ajustement des données phénotypiques
  - Utilisation d'un modèle mixte linéaire pour estimer et corriger les effets terrains + répétitions
- Traitement des données de géotypage
  - Suppression des allèles rares (MAF < 5%)
  - Suppression des marqueurs ayant plus de 20% de données manquantes
- Analyses de génétique d'association
  - Utilisation d'un modèle mixte linéaire type K+Q avec introduction d'une matrice kinship et d'une matrice structure
  - Introduction de l'épiaison en covariable pour les caractères présentant une forte interaction avec la précocité



## RÉSULTATS – CONTRAINTES HYDRIQUE

### Evaluation phénotypique du matériel végétal

Rendements moyens obtenus pour les essais « contrainte hydrique »:



→ Potentiels de rendement et différentiels de rendement équivalents pour les 2 années

Coefficients de corrélation entre les différentes années et modalités pour le rendement:

|           | SEC_11GRE | IRR_11GRE | SEC_12GRE | IRR_12GRE |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| SEC_11GRE | 1.000     |           |           |           |
| IRR_11GRE | 0.292     | 1.000     |           |           |
| SEC_12GRE | 0.009     | 0.024     | 1.000     |           |
| IRR_12GRE | 0.263     | 0.370     | 0.412     | 1.000     |

→ Faibles corrélations entre les années  
→ Très faibles corrélations entre les 2 modalités

Impact du stress hydrique sur les composantes de rendement:

|                  | GREUX 2011 |      |         | GREUX 2012 |      |        |
|------------------|------------|------|---------|------------|------|--------|
|                  | SEC        | IRR  | DIFF    | SEC        | IRR  | DIFF   |
| Nb d'épis/m²     | 495        | 497  | -2      | 479        | 523  | -44**  |
| Nb de grains/épi | 40         | 44   | -4***   | 42         | 41   | 1      |
| PMG              | 36         | 39.2 | -3.2*** | 33.8       | 38.2 | 4.4*** |

→ PMG fortement impacté par le stress hydrique  
→ Stress hydrique qui n'a pas le même impact sur les composantes de rendement pour les 2 années

### ○ Très fort impact de l'environnement

- Effet année
- Effet du climat sur la gestion et l'impact du stress hydrique





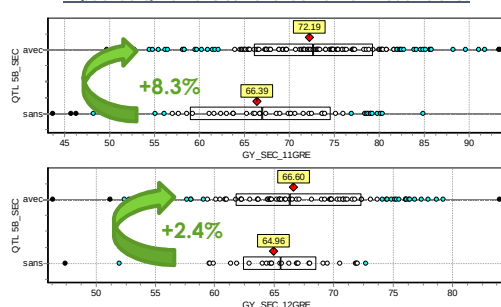


## RÉSULTATS – CONTRAINTES HYDRIQUE

## Analyses de génétique d'association

- Aucun QTLs rendement détecté dans les 4 environnements testés
- Une multitude de QTLs de rendement « environnement spécifiques » identifiés
- 1 seul QTL identifié sur le chromosome 5B ayant un impact significatif en modalité SEC pour les 2 années de phénotypage

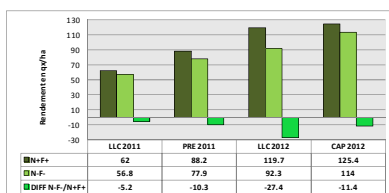
Impact du QTL 5B SEC sur le rendement en modalité SEC:



Le phénotypage réalisé sous contrainte hydrique dans le cadre de ce projet ne permet d'identifier que des QTLs dits « environnement spécifiques »

RÉSULTATS  
CONTRAINTES AZOTÉE ET FAIBLE PRESSION MALADIES

## Evaluation phénotypique du matériel végétal

Rendements moyens obtenus pour les essais  
« contrainte azotée et faible pression maladies »:

→ Potentiels de rendement et différentiels de rendement différents en fonction de l'environnement mais impact toujours significatif du stress sur le rendement

Coefficients de corrélation entre les différentes années et modalités pour le rendement:

|            | N-F- 11MOY | N-F+ 11MOY | N-F- 12MOY | N-F+ 12MOY |
|------------|------------|------------|------------|------------|
| N-F- 11MOY | 1.000      |            |            |            |
| N-F+ 11MOY | 0.813      | 1.000      |            |            |
| N-F- 12MOY | 0.645      | 0.630      | 1.000      |            |
| N-F+ 12MOY | 0.508      | 0.517      | 0.757      | 1.000      |

→ Corrélations relativement élevées entre les 2 modalités  
→ Corrélations assez élevées entre les 2 années

Impact du stress azoté sur les composantes de rendement:

|                  | LLC 2011 |       |         | PRE 2011 |       |         | LLC 2012 |       |         | CAP 2012 |       |         |
|------------------|----------|-------|---------|----------|-------|---------|----------|-------|---------|----------|-------|---------|
|                  | N-F+     | N-F-  | DIFF    | N-F+     | N-F-  | DIFF    | N-F+     | N-F-  | DIFF    | N-F+     | N-F-  | DIFF    |
| Nb d'épis/m²     | 328      | 317   | 11*     | 354      | 342   | 12*     | 402      | 491   | 111***  | 628      | 486   | 142***  |
| Nb de grains/épi | 45       | 38    | 7***    | 47       | 43    | 4***    | 44.4     | 43.5  | 0.9     | 52       | 57    | -5*     |
| Nb de grains/m²  | 14424    | 11725 | 2699*** | 16332    | 14462 | 1870*** | 26167    | 20503 | 5664*** | 32088    | 27366 | 4722*** |
| PMG              | 43.2     | 48.8  | -5.4*** | 54.3     | 54.2  | 0.1     | 46.2     | 45.5  | 1.7*    | 39.4     | 41.9  | -2.5**  |

→ Nb de grains/m² est la composante impactée  
→ en 2011: impact sur le nb de grains/épi  
→ en 2012: impact sur le nb d'épis/m²

- Effet modéré de l'environnement
- Effet année sur la composante de rendement impactée par le stress





## RÉSULTATS

## CONTRAINTE AZOTÉE ET FAIBLE PRESSION MALADIES

## Analyses de génétique d'association

- Une multitude de QTLs de rendement « environnement spécifiques » identifiés
- Une quantité importante de QTLs de rendement identifiés soit pour la modalité N-F- soit pour la modalité N+F+



Identification des QTLs les plus intéressants : ceux qui se sont exprimés dans tous les environnements testés, c'est-à-dire, pour les 2 modalités et dans les quatre « sites » testés

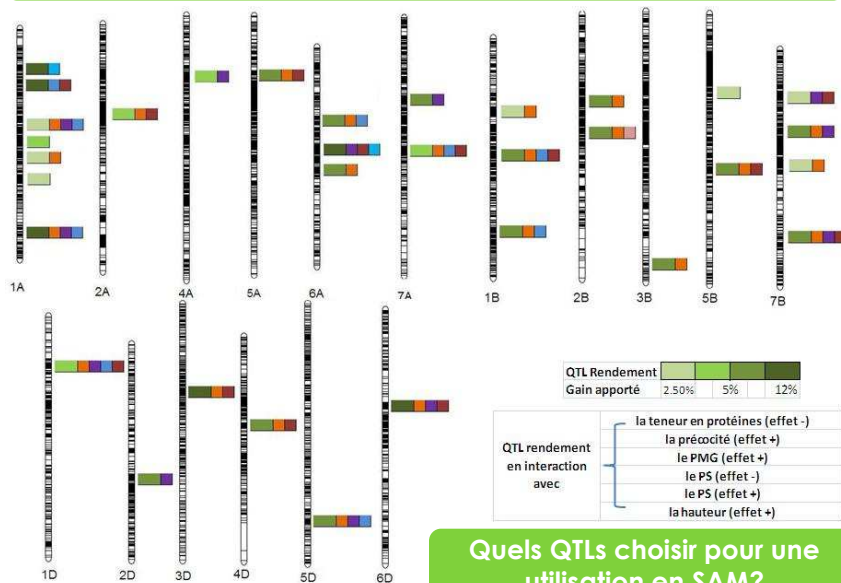


33 QTLs rendement identifiés



## RÉSULTATS

## Cartographie des QTLs rendement identifiés en conditions optimales ou de stress azoté et de faible pression maladies

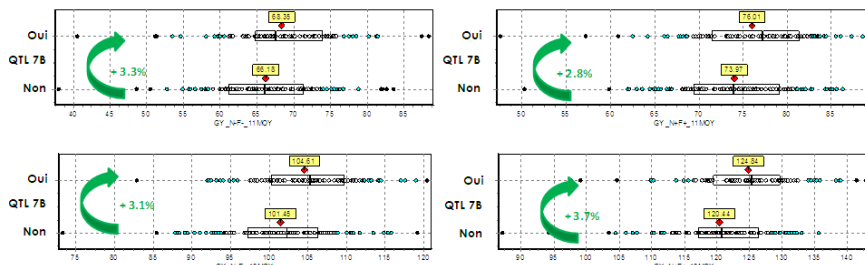




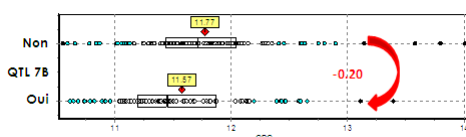
## RÉSULTATS – QUELS QTLs CHOISIR POUR UNE UTILISATION EN SAM?

Des QTLs ayant un effet faible sur le rendement avec peu d'interaction avec les autres caractères – Exemple du QTL 7B

Impact du QTL 7B sur la moyenne ajustée du rendement pour les modalités N-F- et N+F+ en 2011 et en 2012



Impact du QTL 7B sur la moyenne ajustée de la teneur en protéines

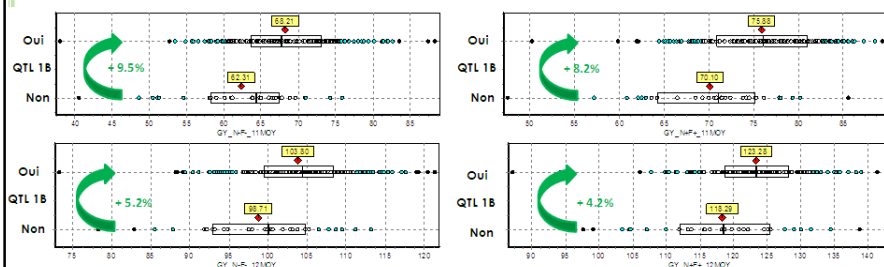


→ Ce QTL permet d'apporter un gain sur le rendement variant de +2.8% à 3.7% quel que soit l'environnement testé en n'apportant qu'une simple petite pénalité sur la teneur en protéines

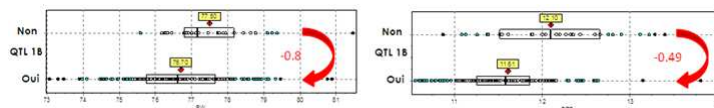
## RÉSULTATS – QUELS QTLs CHOISIR POUR UNE UTILISATION EN SAM?

Des QTLs ayant un effet fort sur le rendement avec des interactions avec d'autres caractères – Exemple du QTL 1B

Impact du QTL 1B sur la moyenne ajustée du rendement pour les modalités N-F- et N+F+ en 2011 et en 2012



Impact du QTL 1B sur la moyenne ajustée de la teneur en protéines et le poids spécifique



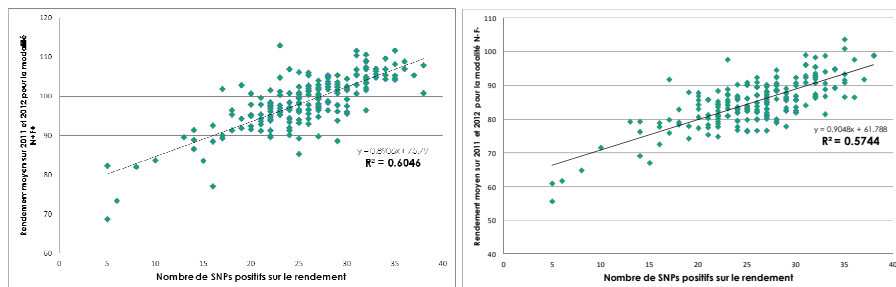
→ Ce QTL permet d'apporter un gain considérable sur le rendement variant de +4.2% à 9.5% quel que soit l'environnement testé **MAIS** il implique également une baisse importante de la teneur en protéines et du poids spécifique



## RÉSULTATS – QUELS QTLs CHOISIR POUR UNE UTILISATION EN SAM?

- Comment se comportent-ils en combinaison?

Distribution du rendement moyen pour la modalité N+F+ et N-F- en fonction du nombre de SNPs ayant un impact positif sur le rendement présent dans les lignées du panel étudié



→ Le potentiel de rendement des lignées augmente linéairement en fonction du nombre de SNPs positifs qu'elles possèdent → Part importante de la variabilité génétique expliquée par ces 33 QTLs



→ Il faudrait développer un modèle prédictif prenant en compte les effets de chacun de ces 33 QTLs pour se rapprocher de la valeur moyenne du rendement



## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

- Importance de l'effet de l'environnement dans les travaux de détection de QTLs
- Trente trois QTLs stables de rendement ont pu être identifiés sous conditions optimales ou sous contrainte de stress azoté et de faible pression maladies
- Attention aux interactions entre QTLs de rendement et autres caractères d'intérêt (précocité, hauteur, PS, PMG, teneur en protéines....) rendant leur utilisation en SAM complexe



+ nombre croissant de marqueurs moléculaires disponibles

**Le développement de modèles de sélection génomique prenant en compte les interactions avec l'environnement serait intéressant pour améliorer la productivité de nos variétés**  
→ Nouveau programme FSOV 2014





## PARTENAIRES - REMERCIEMENTS



- Ellen GOUEMAND
- Olivier ROBERT
- Denis BEGHIN



- Delphine HOURCADE
- Xavier LACAZE
- Katia BEAUCHENE
- Stéphane JEZEQUEL



- Christophe MICHELET
- Bruno CLAUSTRES
- Laure DUCHALAIS





## 2010 C

# Interaction stimulateurs de défense des plantes /génotypes de blé tendre dans la lutte contre la septoriose



## Objectifs



L'objectif du projet est d'apprécier et de caractériser l'amplitude de la réponse de différents cultivars de blé à la stimulation des réactions de défense par une gamme d'inducteurs présélectionnés.

## Contexte

La septoriose, provoquée par le champignon *Mycosphaerella graminicola* (anamorphe *Septoria tritici*), est actuellement la maladie la plus dommageable sur le blé en France. Sa nuisibilité moyenne interannuelle est proche de 15 q/ha sur la presque totalité des surfaces en blé de l'hexagone, soit plus de 5 Millions d'ha. Les dégâts peuvent aller jusqu'à atteindre 50 q/ha dans les situations les plus extrêmes (Arvalis institut du végétal).

Le défi relevé par les sélectionneurs est multiple et consiste à combiner dans une même variété plusieurs paramètres : une résistance durable aux bioagresseurs (et en particulier aux maladies), un rendement du meilleur niveau et une qualité sanitaire et technologique adaptée aux exigences du marché. Cette démarche est d'autant plus nécessaire, que le contexte l'impose. Le recours aux intrants chimiques est de plus en plus sévèrement réglementé voire remis en question par l'apparition de résistances des bioagresseurs aux traitements fongicides utilisés.

L'amélioration génétique ne pourra pas répondre seule à ce défi et en particulier aux objectifs du plan Ecophyto 2018, qui vise à réduire de 50% les utilisations de produits phytosanitaires à horizon 2018. Les SDP peuvent constituer une lutte complémentaire (1) dont les interactions avec les résistances génétiques doivent être étudiées pour permettre d'optimiser leur emploi.

## Protocole, Matériel & Méthode

**Valider** l'efficacité des SDP sélectionnés (criblages de différentes molécules) sur la septoriose du blé. Ce criblage concernera des SDP déjà commercialisés, des SDP en cours de développement et éventuellement des produits se situant plus en amont.

**Rechercher** des interactions SDP-génotype à partir de molécules qui se sont révélées efficaces lors du criblage précédent, comparer les aptitudes de réponses aux traitements par les SDP des principaux génotypes de blé cultivés en France (essais PRECOM) en évaluant la résistance induite à la septoriose. Cette étape a pour but de révéler des couples « SDP-génotype de blé » assurant une réponse optimale.

**Pour** les couples « SDP-génotype de blé » mis en évidence précédemment, identifier les activités biologiques des SDP en décryptant leur mode d'action sur la physiologie de la plante ou sur le processus infectieux du champignon, mettre en évidence des différences de mode d'action des SDP en fonction des génotypes de blé.

**Mettre** au point des outils de sélection permettant d'identifier des variétés répondant bien à ces stimulateurs (marqueurs, protocole en serre, protocole au champ, ...).

## Résultats escomptés et valorisations

**Evaluation** sur septoriose du blé et sélection d'un inducteur de défense parmi 12 candidats en conditions contrôlées, semi contrôlées et au champ.

**Caractérisation** des réponses de deux séries de variétés (2 x 15 à 30 variétés) en pré-commercialisation pour leur réponse à l'induction de défense au champ.

**Mode d'action** des inducteurs de défense testés sur 1 à 2 couples variétés/inducteurs retenus.

**Publication** des résultats dans des revues internationales à comité de lecture et dans des revues techniques de vulgarisation, communication de résultats en congrès nationaux ou internationaux et à l'échelle des acteurs de terrain.

**Transfert** des outils et méthodologies élaborés dans le projet vers les utilisateurs potentiels partenaires du projet.

## Fonds engagés

Les fonds engagés pour ce programme de 3 ans sont de 447 312 € dont 300 000 € d'aide FSOV.





*FsoV*

JEUDI 8 JANVIER 2015

ulco Club5 LaSalle ISA GROUPE ARVALIS Institut du végétal *FsoV*

**INTERACTION ENTRE STIMULATEURS DE DÉFENSE  
DES PLANTES ET GÉNOTYPES DE BLÉ TENDRE DANS  
LA LUTTE CONTRE LA SEPTORIOSE**

C. MAUMENE, A. SIAH, M. ORS, G. COULEAUD, B. RANDOUX,  
P. RIGOLLE, S. SELIM, P. HALAMA, Ph. REIGNAULT

Arvalis-Institut du Végétal (Coordinateur : Claude MAUMENE)  
ISA Lille  
ULCO  
Lasalle-Beauvais  
GIE CLUB 5

LES STIMULATEURS DE DÉFENSE DES PLANTES (SDP) : DES  
INDUCTEURS DE RÉSISTANCE CONTRE LA SEPTORIOSE DU BLÉ ?

- o *Mycosphaerella graminicola*
- o Ascomycète hémibiotrophe
- o Jusqu'à 40% de pertes de rendement
- o Pas de cultivar totalement résistant
- o Souches résistantes aux fongicides
- o Durabilité et efficacité de la lutte compromises
- o Plan Ecophyto

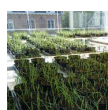
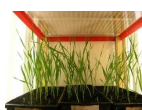
- o SDP : moyens de lutte innovant et alternatifs/complémentaires ?





## OBJECTIFS DU PROJET « SDP-SEPTO » :

- SDP : agissent sur la physiologie de la plante  
Impact du génotype ?  
Interactions SDP-cultivar ?
- Criblage initial de 14 SDP potentiels au laboratoire et en serre  
Mesure de l'efficacité : conditions contrôlées, serre, champ  
Etude du mode d'action au laboratoire



## MATERIELS ET METHODES :

- 1 souche (T01193) de *M. graminicola* (résistante aux triazoles et strobilurines) **au laboratoire**
- 3 cultivars de blé (*Triticum aestivum*) **au laboratoire et au champ**
- 14 SDPs testés (FSOV1 à FSOV14)

ALTIGO (7)  
PREMIO (5.5)  
ALIXAN (4)

9  
résistant  
↑  
1  
sensible



| NOM   | CARACTERISTIQUES | D4              | CHAMP                                                         |
|-------|------------------|-----------------|---------------------------------------------------------------|
| FSOVX | Origine          | x L/ha ou kg/ha | T1 : D4 + 0.7-0.8 L/ha Cherokee®<br>(35-40% dose recommandée) |





### MATERIELS ET METHODES : SDP UTILISÉS

| PRODUIT    | NOM COMMERCIAL/PRINCIPE ACTIF | DOSE PRÉCONISÉE |
|------------|-------------------------------|-----------------|
| FSOV1      | Acibenzolar-S-Methyl (Bion®)  | 0,06 Kg/ha      |
| FSOV2      | Nutri-phite® Excel            | 3 L/ha          |
| o FSOV2Bis | LBG01F34®/Etonan®             | 2 L/ha          |
| FSOV3      | SDP de synthèse               | 1 L/ha          |
| FSOV3Bis   | SDP de synthèse               | 1 L/ha          |
| o FSOV4    | Iodus® 2 Céréales             | 0,5 L/ha        |
| o FSOV6    | SDP de synthèse               | 1 L/ha          |
| o FSOV7    | Nectar®                       | 5 L/ha          |
| o FSOV8    | Extrait de microorganismes    | 6,75 L/ha       |
| o FSOV8Bis | Extraits de microorganismes   | 3,75 L/ha       |
| o FSOV9    | Acides organiques             | 3 L/ha          |
| o FSOV10   | Polysaccharide de paroi       | 15 L/ha         |



### MATERIELS ET METHODES : ESSAIS AU CHAMP

#### o 3 campagnes d'essais :

- 2011 (7 : FSOV1, FSOV2, FSOV6, FSOV7, FSOV8, FSOV 8Bis et FSOV10) ;
- 2012 (10 : FSOV2, FSOV2Bis, FSOV7, FSOV8, FSOV8Bis, FSOV9, FSOV10, FSOV12, FSOV4+FSOV2 et FSOV4+FSOV10) ;
- 2013 (6 : FSOV2, FSOV2Bis, FSOV7, FSOV8, FSOV10 et FSOV4+FSOV2Bis) ;
- + 2011 : FSOV7
- + 2012 & 2013 : FSOV2bis

Boigneville  
(Arvalis)

Testés sur une 30aine de cultivars sur les sites de :

- Florimond Desprez (Cappelle-en-

Pévèle) ;

- Limagrain (Verneuil l'Etang) ;

- RAGT (Prémesques) ;

- Syngenta (Orgerus).

#### o Répétitions sur les sites de :

- Florimond Desprez (Cappelle-en-Pévèle) ;
- Limagrain (Verneuil l'Etang) ;
- RAGT (Prémesques) ;
- Syngenta (Orgerus).

#### o Références fongicides (sauf 2011 : pas de T2) :

- Haute : Cherokee® à T1 et Viverda® à T2
- Intermédiaire : Cherokee® à T1 et ½ Viverda® à T2
- Basse : ½ Cherokee® à T1 et ½ Viverda® à T2





## EFFICACITÉ DE PROTECTION DES SDP EN CONDITIONS DE LABORATOIRE

- Comportement des cultivars vis-à-vis de T01193 conformes en conditions non-traitées à leurs niveaux de résistance
- Aucune efficacité à D4
- Efficacité à D1 de FSOV2, FSOV7, FSOV8, FSOV8Bis, FSOV9 et FSOV10
- Phytotoxicité et effet biocide de FSOV9
- Effet dose pour les différents SDP, moindre efficacité pour FSOV8 & FSOV8Bis
- Pourcentage de réduction des symptômes après traitement avec 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 (1/2)

- Pression septoriose significative en 2013
- Test des efficacités & des interactions SDP/cultivar
- Niveaux de signification statistique des effets variété, 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     | -             | -                | -                          |





## CARACTERISATION DES INTERACTIONS SDP-CULTIVAR AU CHAMP (2/2)

- 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  $P = 0,05$ ).

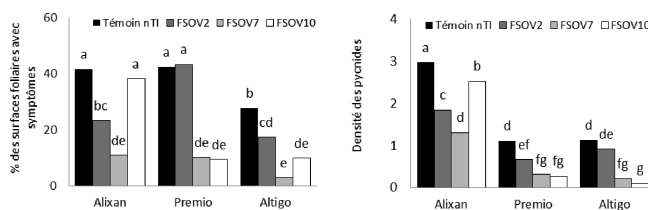
|        |     | FSOV2      | FSOV2Bis   | FSOV7      | FSOV8      | FSOV10     | FSOV2Bis + FSOV4 |
|--------|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------------|
| Alixan | F1  | -11        | +8         | -2         | +2         | <b>-30</b> | <b>+44</b>      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

- Réponses les plus fortes avec Altigo
- Efficacité la plus régulière avec FSOV10 (Altigo et Alixan)
- Pas d'effet sur le rendement



## EFFICACITÉ DE PROTECTION DES SDP SOUS SERRE

- Sélection de FSOV2, 7 & 10 utilisés à la dose D3
- Efficacité de protection en serre de FSOV2, FSOV7 et FSOV10 sur les symptômes et la sporulation à 21 jpi sur les trois cultivars.

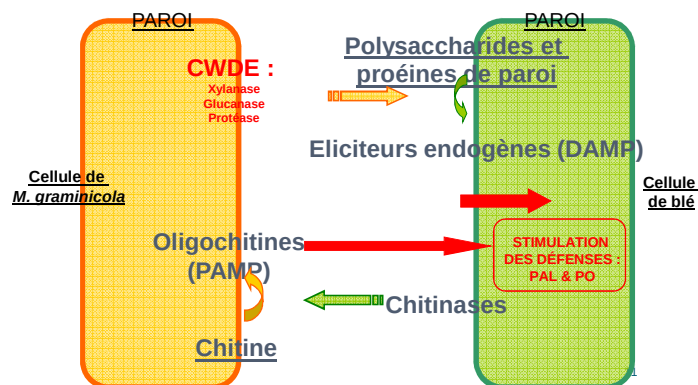


- Confirmation d'interactions SDP/cultivar (Ex : FSOV7/FSOV10)
- Même tendance d'effets sur les symptômes et la sporulation pour les 3 SDP





# LES MARQUEURS DE COLONISATION FONGIQUE ET DE RÉSISTANCE DE LA PLANTE ÉTUDIÉS ICI



## L'EFFICACITÉ DE PROTECTION EST LIÉE À LA COLONISATION

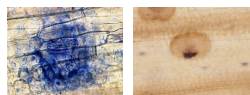
- Effet de FSOV2, FSOV7 et FSOV10 sur le processus infectieux du champignon sur les trois cultivars.

SG : spores germées;

SGP : spores germées et pénétrantes ;

CC : cavités stomatiques colonisées;

CCP : cavités stomatiques colonisées avec pycnides;



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

- Aucun effet direct sur le champignon sauf pour FSOV10
- Même tendance d'effets sur les symptômes et la sporulation pour les 3 SDP
- Corrélation entre % de colonisation et protection uniquement !

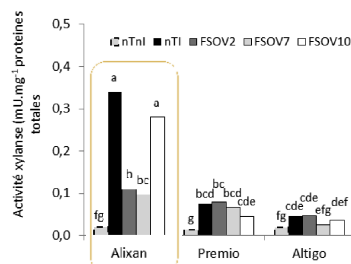


FSOV 2010 C



### L'EFFICACITÉ DE PROTECTION EST LIÉE À LA RÉDUCTION DES ACTIVITÉS CWDE FONGIQUES

- Effet de FSOV2, FSOV7 et FSOV10 sur l'activité xylanase à 21 jpi sur les trois cultivars. nTnl, témoin non traité non inoculé. nTi, témoin non traité inoculé.

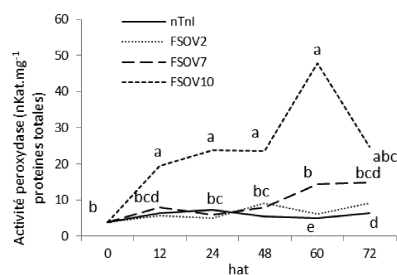


- Production forte chez Alixan
- Réduction d'activité avec Alixan
- Même tendance pour les activités glucanase et protéase



### ABSENCE DE CORRÉLATION ENTRE LES ACTIVITÉS PÉROXYDASE (PO) ET PHÉNYLALANINE AMONIA-LYASE (PAL) ET L'EFFICACITÉ DE PROTECTION

- Elicitation de l'activité peroxydase chez les trois cultivars après traitement avec FSOV2, FSOV7 et FSOV10 en conditions non inocuées. nTnl, témoin non traité non inoculé.



- Seuls FSOV7 et 10 induit la PO
- Pas de corrélation avec l'efficacité de protection
- Même résultats pour Altigo et Premio et l'activité PAL





ABSENCE DE RELATION ENTRE LE NIVEAU D'INDUCTION DES DIX GÈNES DE DÉFENSE ÉTUDIÉS ET L'EFFICACITÉ DE PROTECTION (1/2)

- Effet cultivar sur l'expression relative des dix gènes de défense étudiés en conditions non traitées non inoculées.

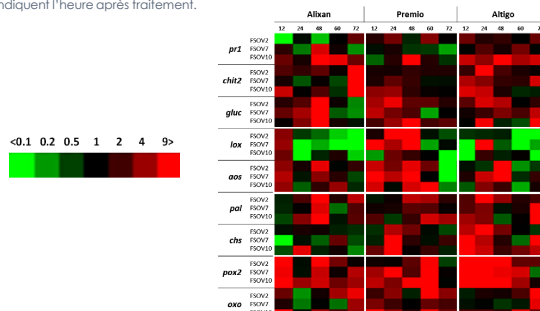
|              | Alixan           | Premio            | Altigo            |
|--------------|------------------|-------------------|-------------------|
| <i>pr1</i>   | 1 <sup>b</sup>   | 10.9 <sup>a</sup> | 9.1 <sup>a</sup>  |
| <i>chit2</i> | 1.0 <sup>b</sup> | 2.1 <sup>a</sup>  | 1.4 <sup>b</sup>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

- Premio et dans une moindre mesure Altigo présentent des niveaux d'expression plus élevés comparativement à Alixan
- Les différences de niveau d'expression entre Premio et Altigo varient en fonction du gène considéré.



ABSENCE DE RELATION ENTRE LE NIVEAU D'INDUCTION DES DIX GÈNES DE DÉFENSE ÉTUDIÉS ET L'EFFICACITÉ DE PROTECTION (2/2)

- 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.



- Tous les produits induisent l'expression des gènes étudiés sur les trois cultivars
- Le niveau d'expression et le moment de l'induction, dépendent du SDP et du cultivar
- Les profils d'expression des gènes *pox2* et *pal* ne semblent pas suivre les profils d'activité enzymatique PO et PAL
- Aucune liaison entre profil d'expression des gènes et l'efficacité de protection





## CONCLUSIONS

- **Première étude de SDP** sur le pathosystème Blé-*M. graminicola*
- Six SDP sur 14 présentent des **efficacités significatives** et dose-dépendantes
- Seuls les SDP **associés à un traitement fongicide** ont apporté un complément d'efficacité (le plus souvent non significatif)
- **Interactions SDP-cultivar significatives** pour FSOV2 et FSOV10 **en serre** et pour FSOV2, FSOV2Bis, FSOV7 et FSOV8 **au champ** (étage foliaire F1).
- Efficacité fortement **corrélée à certains paramètres du développement** du champignon (colonisation du mésophile, production de CWDE).
- Efficacité **pas associée à l'éllicitation des activités et à l'expression des gènes testés**
- 
- L'utilisation des SDP ne peut être envisagée au champ que dans le cadre d'une insertion dans un programme conventionnel.
- 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.







## FSOV 2010 K

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



PLANT RESEARCH INTERNATIONAL  
WAGENINGEN UR

### Objectifs



Le laboratoire PRI a identifié la première toxine (MgTox1) produite par un isolat (IPO323) de septoriose (*M. graminicola*). 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 4 semaines sont nécessaires pour interpréter le test de résistance classique. Outre la rapidité d'obtention des résultats, 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 ne semblent pas être spécifiques de chaque isolat : L'utilisation des toxines devrait permettre d'estimer la résistance des futures variétés de manière plus globale et donc d'obtenir du matériel végétal avec une résistance plus durable.

### Contexte

La septoriose est une maladie du blé qui peut être provoquée par deux champignons : *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) et *Stagonospora nodorum* (*Septoria nodorum*). *M. graminicola* 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 15 gènes de résistance et leur application potentielle en sélection, la lutte contre la maladie est actuellement réalisée principalement par des fongicides. Toutefois, seuls les azoles et les strobilurines sont disponibles et leur efficacité pour les populations naturelles au champ se réduit. La chute de l'efficacité de ces matières actives représente une menace pour l'agriculteur qui veut maintenir durablement un bon rendement en blé. Il est probable que l'amélioration génétique de la résistance sera la principale réponse à l'évolution de cette maladie.

## Protocole, Matériel & Méthode

Pour atteindre ses objectifs, ce projet propose :

**D**e valider la toxine MgTox1 sur un panel de génotypes résistants et sensibles choisis à partir des résultats précédemment obtenus (en particuliers dans deux programmes FSOV 2004 et 2008C).

**D**'identifier de nouvelles toxines d'autres isolats de *M. graminicola* afin de couvrir un plus large spectre d'isolats.

**D**e tester et de valider la toxine sur une ou plusieurs populations ségrégeant pour la résistance. Comme ces populations ont déjà été étudiées (génotypage et phénotypage aux stades adulte et jeune plante) dans deux programmes FSOV avec PRI et Arvalis, il nous sera facile d'identifier des QTL de sensibilités à la toxine.

**D**e regrouper les isolats produisant les mêmes toxines et de voir leur répartition géographique.

Ainsi, dans ce projet, nous démontrerons l'intérêt d'utiliser des toxines pour évaluer la résistance à la Septoriose des lignées de blé. Nous identifierons des marqueurs moléculaires des QTL de sensibilité à ces toxines. Ces deux types d'outils (tests avec toxine et marqueurs moléculaires) seront des outils efficaces que le sélectionneur pourra utiliser pour obtenir plus facilement des variétés résistantes à la septoriose.

## Résultats escomptés et valorisations

Les principaux résultats attendus sont les suivants :

**L**a toxine MgTOX1 de *S. tritici* est validée comme outil de sélection à haut débit.

**D**es QTL de sensibilité aux toxines de Septoriose ont été identifiés.

**D**es génotypes sensibles ou résistants à MgTOX1 ont été caractérisés.

**U**ne représentation géographique partielle des races (isolats) de *M. graminicola* qui produisent cette toxine.

**D**e nouvelles toxines de Septoriose ont été identifiées.

## Fonds engagés

Les fonds engagés pour ce programme de 3 ans sont de 383 066 € dont 268 146 € d'aide FSOV.



FsoV
JEUDI 8 JANVIER 2015

## DÉVELOPPEMENT D'UN NOUVEL OUTIL D'AIDE À LA SÉLECTION DE VARIÉTÉS DE BLÉ RÉSISTANT À LA SEPTORIOSE

# Olivier ROBERT

### LES OBJECTIFS DU PROJET

- Obtenir un test prédictif de la résistance à la septoriose
- Pourquoi s'intéresser aux toxines de *Z. tritici* ?
  - Pas de manipulation de champignon ou spores,
  - Pas de contamination
  - Résultat en 3 à 5 jours !
- Résistance variétale moins spécifique aux toxines qu'avec les races de septoriose ?



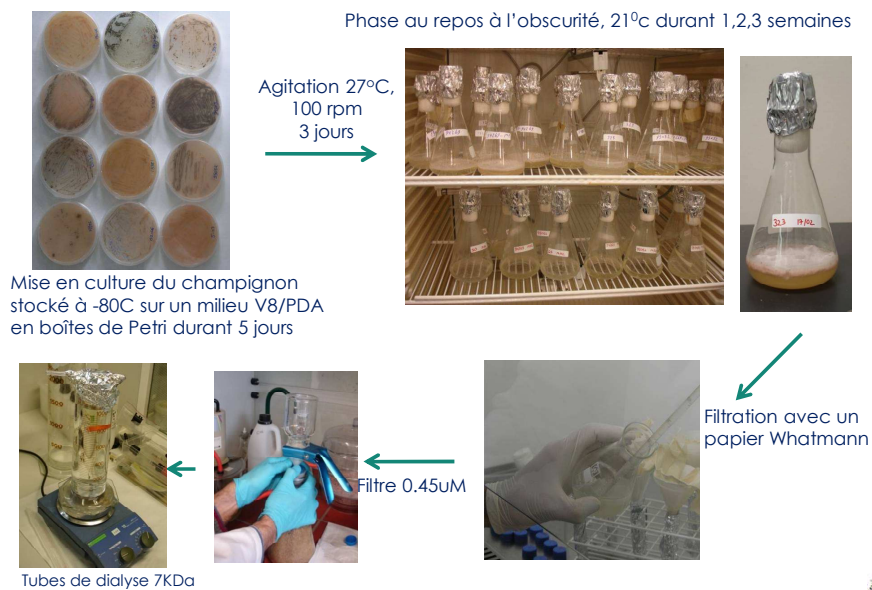


## ÉTAT DES LIEUX DES CONNAISSANCES AU DÉBUT DU PROJET

- Il existe des toxines produites par des septorioses qui nécrosent les feuilles de blé
  - *Septoria nodorum* (ToxA – Tsn1 ; J. Faris, USDA)
  - *Zymoseptoria tritici* (MgTox1 ; G. Kema, PRI)
    - Isolement d'un substrat (filtrat de culture) qui est un mélange de protéines (toxines - effecteurs) responsables de la nécrose des feuilles (lumière dépendant)



## PRODUCTION DU FILTRAT DE CULTURE





## INFILTRATION DU FILTRAT DE CULTURE



Notation des symptômes : 3 à 4 jours après infiltration



## INFILTRATION DU FILTRAT DE CULTURE (CF) DE IPO323 SUR LA VARIÉTÉ OBELISK



CF IPO323



Témoin négatif

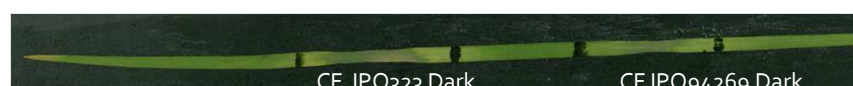


CF 2x

CF 4x

CF 6x

CF 8x



CF IPO323 Dark

CF IPO94269 Dark





## LES ENJEUX DU PROGRAMME FSOV

### o Les toxines de *Z. tritici*

- Quelles sont la ou les protéines SSP (Small Secreted Protein) qui provoquent la nécrose (la mort cellulaire) des feuilles de blé ?
- Quelles sont la ou les protéines SSP qui permettent de différencier les génotypes résistants des sensibles ?

### o Le protocole d'application

- Quel protocole d'inoculation peut être appliqué au champ ?



## IDENTIFICATION DES PROTÉINES DU FILTRAT DE CULTURE DE L'ISOLAT IPO232



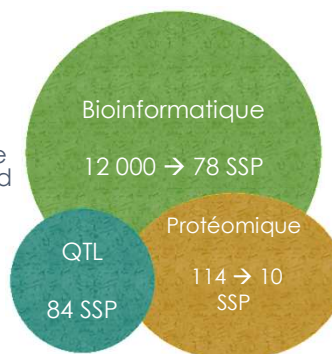
Pectate lyase (Bsp165PelA) de *Bacillus*





## DIFFÉRENTES APPROCHES POUR IDENTIFIER DES PROTÉINES SSP CANDIDATES

- Analyse Bioinformatique
  - Petite protéine sécrétée (<300aa)
  - Pas de signature GPI
  - Pas de domaine trans-membranaire
  - Riche en cystéines
- Analyse Protéomique
  - Protéines sécrétées *in vitro* (filtrat de culture)
  - Chromatographie liquide à échange d'ion de type Fast Performance liquid Chromatography (FPLC)
  - LC-MS
- Analyse QTL
  - Focus sur le QTL majeur du chromosome 5

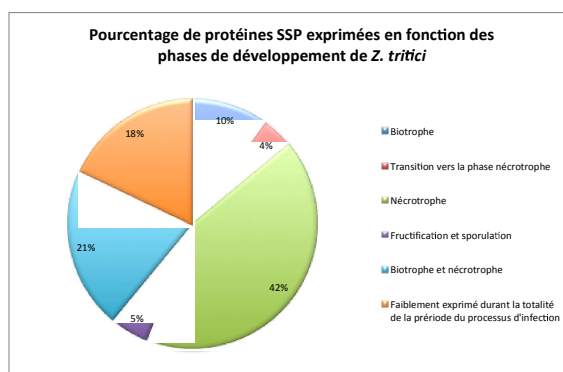
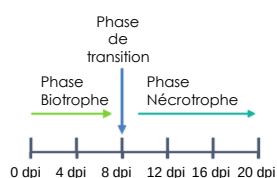


→ 115 protéines SSP (toxines potentielles) identifiées



## IDENTIFICATION DES PROTÉINES PRÉSENTES DANS LE FILTRAT DE CULTURE

- 115 protéines (toxines potentielles) identifiées

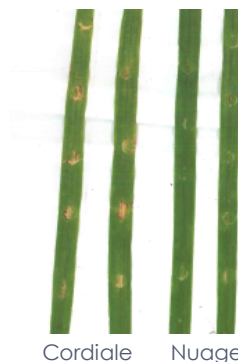
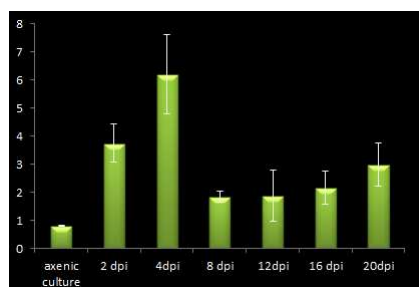






## PROTÉINES SSP15, SSP18 ET SSP127

### ○ Protéine SSP127



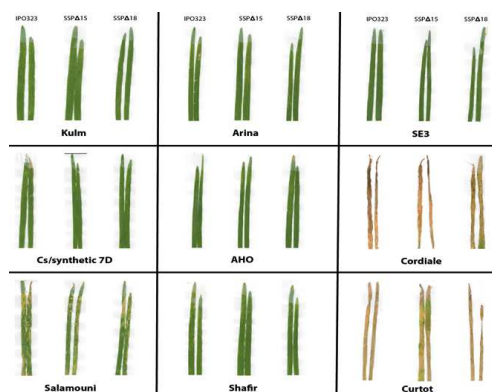
Cordiale Nuage

→ SSP127 est surexprimée durant la phase biotrophe et provoque des nécroses sur Cordiale mais pas sur Nuage



## VALIDATION DES PROTÉINES SSP15 ET SSP18 PAR MUTATION DE GÈNE

○ Infiltration des filtrats de culture de IPO232, IPO323ΔSSP15 et IPO323ΔSSP18 sur 12 lignées de blé



→ Pas de différences : Ces 2 protéines ne jouent pas de rôle clé dans l'apparition de nécroses







## MISE EN PLACE D'UN PROTOCOLE D'ÉVALUATION AU CHAMP



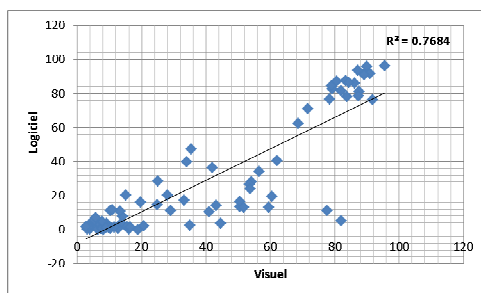
## MISE EN PLACE D'UN PROTOCOLE D'ÉVALUATION AU CHAMP

- Matériel Végétal
  - 13 géotypes
  - 10 feuilles par géotypes
  - 2 modalités : toxine vs eau
  - 2 répétitions et 2 dates d'inoculations
  - 3 lieux (F. Desprez, R2n et Arvalis), 2 années
- Toxine
  - Substrat de culture (ensemble de toxines)
  - Protéine SSP127
  - Témoin avec de l'eau
- Méthode d'inoculation
  - Infiltration
  - Pinceau (avec ou sans pliure transversale de la feuille)
  - Abrasion (avec de la célite)
- Notation des symptômes
  - Pourcentage de surface nécrosée / surface inoculée
  - Numérisation des feuilles avec logiciel SCANAREA





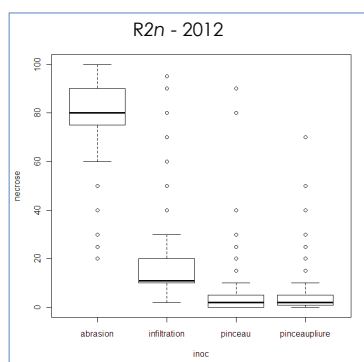
## CORRÉLATION ENTRE LA NOTATION VISUELLE ET LA MESURE LOGICIELLE DES NÉCROSES



- Corrélation satisfaisante  $R^2=0,77$
- La numérisation ne fait pas réellement gagner de temps
- La numérisation permet de conserver les images des symptômes



## QUELLE EST LA MEILLEURE MÉTHODE D'INOCULATION ?

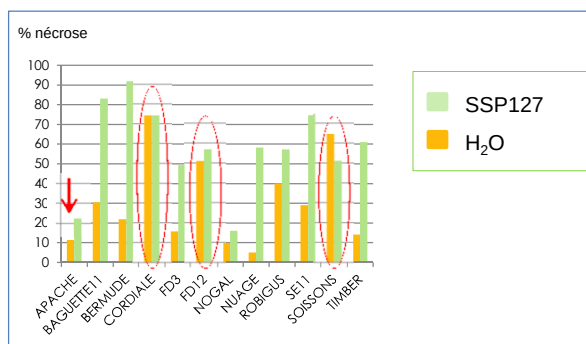


- L'abrasion est la méthode qui donne un maximum de nécroses
- Le badigeonnage de la toxine au pinceau n'est pas efficace





## RÉSULTATS AVEC ABRASION (ARVALIS -2012)



- Il existe un polymorphisme variétal
- Mais les résultats ne sont pas corrélés à la résistance (exemple : Apache)
- Dans certains cas, la protéine n'a pas d'effet significatif comparé à l'eau



## CONCLUSION

- Mise au point d'un protocole au stade juvénile avec le substrat de culture et certaines protéines qui permet une expression différente du phénomène de nécrose selon les variétés
- Identification de 115 protéines SSP susceptibles d'être des toxines impliquées dans le mécanisme de nécrose foliaire
  - Identification des protéines SSP exprimées par le champignon durant sa phase biotrophe et/ou nécrotrophe (et de transition)
  - Mais, les protéines SSP responsables de la nécrose foliaire n'ont pas clairement été identifiées
- Tests au champ : Les résultats ne sont pas satisfaisants
  - Problème d'inoculation (symptômes différents en fonction de la méthode et de l'expérimentateur)
  - La protéine choisie n'est pas discriminante et ne permet pas de prédire le niveau de résistance variétale





## PARTENAIRES - REMERCIEMENTS



- Valérie LAURENT
- Laure DUCHALAIS
- Denis BEGHIN
- Ellen GOUDEMANT



PLANT RESEARCH INTERNATIONAL

- Gert KEMA
- Amir Mirzadi GOHARI



- Delphine HOURCADE





## FSOV 2010 L

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



#### Objectifs



L'objectif de ce projet est donc de fournir de nouveaux outils au sélectionneur (marqueurs liés à de nouveaux facteurs de résistance) qui lui permettront d'être plus efficace dans l'obtention de nouvelles variétés résistantes à la cécidomyie.

#### Contexte

La cécidomyie est un insecte qui parasite l'épi du blé et provoque des chutes de rendement et de qualité du grain. Le sélectionneur qui cherche à obtenir des variétés résistantes à ce parasite est confronté à plusieurs problèmes :

- la résistance à ce parasite est difficile à évaluer sur son matériel en sélection car la pression parasitaire est rarement uniforme et les symptômes (nombre de larves) ne sont pas facilement observables,
- il n'a pas d'outils d'aide à la sélection comme des marqueurs moléculaires, mis à part un marqueur lié au seul gène (*Sm7*) de résistance identifié jusqu'à présent, mais qui n'est pas fiable...

## Protocole, Matériel & Méthode

Ainsi dans ce projet, notre premier objectif est d'identifier les variétés résistantes à la cécidomyie et de vérifier si cette résistance est due à la présence du gène *Sm1*. Pour ce faire, les variétés seront testées avec plusieurs marqueurs liés au gène *Sm1* (marqueurs publiés ou développées en interne par le JIC). Nous espérons ainsi identifier des variétés résistantes qui n'ont pas ce gène de résistance. C'est ce matériel qui fera l'objet d'une étude génétique pour identifier des marqueurs moléculaires liés à de nouveaux gènes ou QTL de résistance.

Comme Bioplante et la RAGT ont déjà développé des populations HD ou RIL avec des variétés résistantes (par exemple : Boregar, Altigo, Robigus) et d'autres pour lesquels nous n'avons pas de données sur la résistance à la cécidomyie. Les résultats obtenus avec les marqueurs de *Sm1* permettront de sélectionner la population la plus pertinente pour une étude génétique de la résistance à la cécidomyie. Cette population sera testée au champ dans un maximum de lieux (en Angleterre et en France - 4 lieux) afin d'acquérir des données de phénotypage suffisamment précises pour identifier des marqueurs moléculaires liés à des QTL de résistance.

## Résultats escomptés et valorisations

Les principaux résultats attendus sont les suivants :

**I**dentification des variétés ayant le gène de résistance *Sm1*

**V**alidation de nouvelles sources de résistance pour la cécidomyie (*i.e.* sans *Sm1*)

**P**roduction d'une population HD pertinente pour de futures études génétiques sur la résistance à la cécidomyie

**I**dentification de marqueurs liés à des QTL de résistance à la cécidomyie

## Fonds engagés

Les fonds engagés pour ce programme de 3 ans sont de 427 146 € dont 298 999 € d'aide FSOV.



FSOV

JEUDI 8 JANVIER 2015

## ÉTUDE ET IDENTIFICATION DE FACTEURS DE RÉSISTANCE À LA CÉCIDOMYIE CHEZ LE BLÉ TENDRE

Olivier ROBERT



Photo : Bob Lamb, AAC

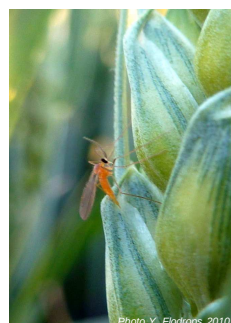


Photo Y. Fladrops 2010



### LES DOMMAGES PROVOQUÉS PAR LA CÉCIDOMYIE

- Diminution du rendement
  - Avortement floral lorsque plusieurs larves attaquent la même fleur
  - Grains déformés (remplis de façon asymétrique), plus petits ou présentant des dommages au péricarpe
- Altération de la qualité du grain
  - Altération de la qualité boulangère de la farine causée par les enzymes produites par les larves pour digérer le grain
  - Réduction de la dormance du grain provoquant une augmentation des risques de germination sur l'épi
  - Transmission des spores de *Fusarium graminearum* par les femelles

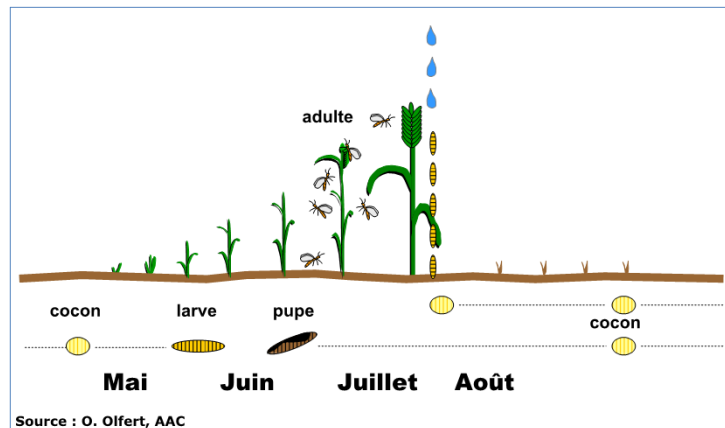


Photo Jean Philippe Lègare, MAPAQ





## CYCLE DE VIE DE LA CÉCIDOMYIE (*SITODIPLOSION MOSELLANA*)



## CONDITIONS FAVORABLES POUR UNE BONNE INFESTATION

- Sol contaminé de larves
- Précipitations régulières et augmentation de la température : larves → pupes
- Humidité, chaleur et absence de vent → Vol de cécidomyies et ponte des œufs dans les épillets

→ Ces conditions favorables ne sont pas toujours réunies !





## LES OBJECTIFS DU PROJET

- Obtenir un test prédictif de la résistance à la cécidomyie orange
  - **Test de résistance au champ ?**
    - Dépend des lieux, des conditions climatiques
    - Phénotypage difficile et coûteux en main d'œuvre
  - **Test de résistance en conditions contrôlées ?**
    - Permet de s'affranchir des aléas climatiques
  - **Utilisation de marqueurs moléculaires ?**
    - Il existe un marqueur (Wm1) lié au principal gène de résistance Sm1
    - Le marqueur Wm1 n'est pas fiable...
- Identifier des nouveaux marqueurs du gène Sm1



## MATÉRIEL VÉGÉTAL

- 98 lignées ou variétés
- 40 lignées NILs (BC4F3) homozygotes pour Sm1 issues du rétrocroisement de Robigus (Sm1) par Shamrock





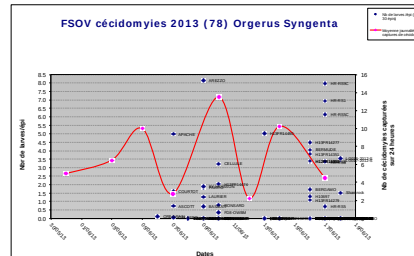
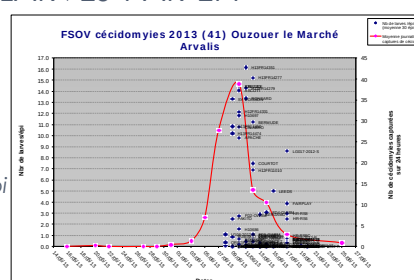
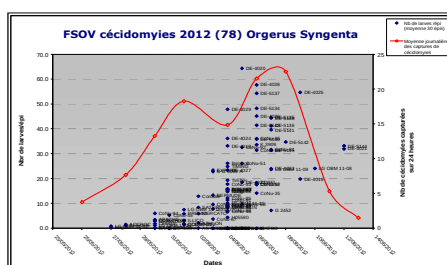
## TESTS DE RÉSISTANCE AU CHAMP

- Au moins 3 sites avec 3 répétitions durant les 3 années : Orgerus (Syngenta), Allemagne (Limagrain) et Rothwell, Lincolnshire (JIC, UK), Cobrieux (F. Desprez), Ouzouère le Marché (Arvalis) et Louville la Chenard (R2n)
- Comptage des cécidomyies dans les pièges (tous les 2 jours)
- Comptage des larves (30 épis / lignée) pour les deux sites les mieux infestés



## RÉSULTATS : PRESSION PARASITAIRE / PRÉCOCITÉ DES PLANTES / NOMBRE DE LARVES PAR ÉPI

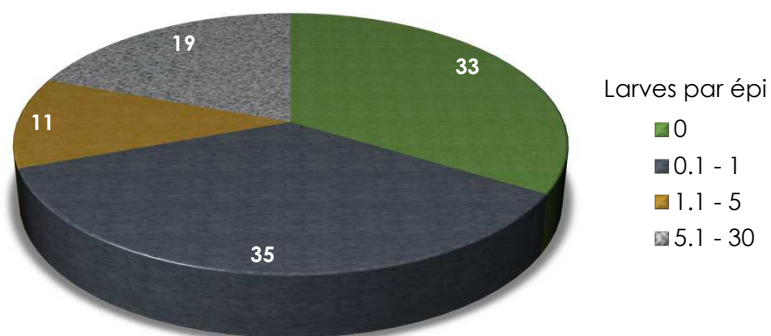
- Pression parasitaire peut être différente selon les lieux et les années
- Selon les lieux et les années le nombre de larves maximum observé va de 7 larves/épi à plus de 60 larves/épi





## RÉSULTATS DES TESTS DE RÉSISTANCE

### Répartition des lignées par classes de résistance

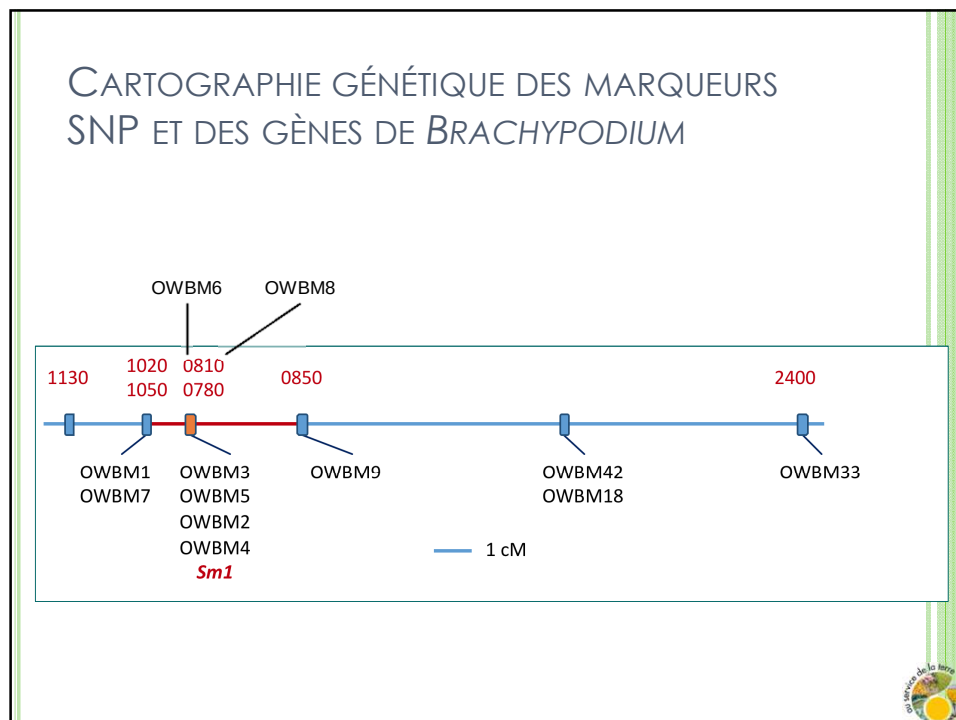
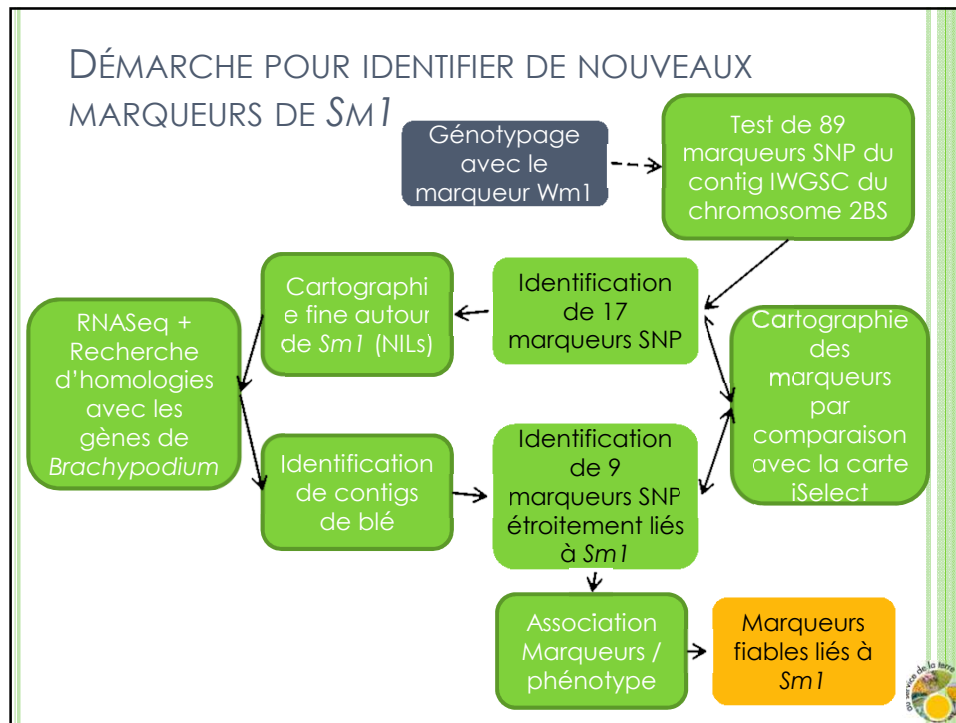


## 3 CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES ÉTUDIÉS

- Extrusion d'anthères
- Hauteur
- Précocité à l'épiaison / floraison

|                 | 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              |

→ Pas de corrélation entre ces caractères morphologique et la résistance à la cécidomyie





## RÉSULTATS DE L'ASSOCIATION MARQUEUR / PHÉNOTYPE

- 48 lignées résistantes avec *Sm1* ont été identifiées avec les 3 marqueurs (OWBM6, OWBM7 et OWBM9)
- 31 lignées sensibles sans *Sm1* ont été identifiées avec au moins un (OWBM6) des trois marqueurs
- 2 lignées (faux positifs) avec l'haplotype de *Sm1*, mais sensibles ont été identifiés.
- 3 lignées ayant une autre source de résistance que *Sm1* (Oxebo, LG OWBM 11-05 et 11-06)



## CONCLUSION : PRINCIPAUX RÉSULTATS

- Identification d'une région chromosomique d'environ 5.68 cM qui porte le gène *Sm1* (qui correspond à environ 20 gènes chez *Brachypodium*)
- 9 marqueurs SNP KASPar sont étroitement ou totalement liés au gène *Sm1*
- 3 marqueurs permettent de prédire la résistance ou la sensibilité des lignées ou variétés testées (90% des cas). Seulement 3.5% des lignées avec l'allèle *Sm1* du marqueur OWBM6 sont sensibles (contre 38% avec *Wm1*) → **Marqueurs utilisables en sélection**
- Les lignées Oxebo, LG OBM 11-05 et LG OBM 11-06 sont résistantes sans avoir le gène *Sm1* → **Autres gènes de résistance à la cécidomyie ?**
- Quelques faux positifs ont encore été détectés : identification du gène *Sm1* pour obtenir des marqueurs 100% fiables → **Nouveau programme FSOV**





## PARTENAIRES - REMERCIEMENTS



- Olivier ROBERT
- Denis BEGHIN



- Cristobal UAUY
- James SIMMONDS



- Pierre TAUPIN
- Raphaël DUCERF
- Delphine HOURCADE



- Christophe MICHELET
- Laure DUCHALAIS



- Patrice SENELLART



- Jayne STRAGLIATI
- Simon BERRY





## 2010 I

### Evaluation de la résistance variétale du blé tendre à la septoriose par génétique d'association



#### Objectifs



Ce projet a pour objectif de mettre en évidence les loci impliqués dans la résistance à la septoriose dans des fonds génétiques français et européens à partir d'un panel constitué de 200 variétés commerciales et de 40 lignées proposées par les sélectionneurs. En effet, l'analyse fine de la génétique des variétés française et européenne par la génétique d'association semble être un levier pour disposer d'outils efficace pour l'évaluation variétale.

#### Contexte

La mise à disposition de variétés tolérantes aux maladies devient un enjeu majeur pour l'agriculture actuelle. En effet, suite au Grenelle de l'environnement, une volonté réglementaire de diminuer l'utilisation des produits phytosanitaires met l'accent sur la nécessité de développer des génotypes plus tolérants. La recherche de sources de résistance s'effectue généralement dans des variétés exotiques par des études génétiques intégrant l'utilisation d'outils de séquençage et de génotypage de plus en plus rapides et sensibles.

## Protocole, Matériel & Méthode

Afin de générer des données pertinentes pour l'évaluation de la résistance à cette maladie, le panel de variétés et lignées étudiées sera inoculé par une souche ou un cocktail de souches représentatives des souches présentes en France. L'inoculation artificielle nous permettra de générer des données robustes pour les études d'association. Des notations fines seront réalisées sur l'ensemble des variétés du stade plantule (en serre, PRI) au stade adulte (champs ARVALIS, RAGT, BIOPLANTE). Parallèlement, et afin de compléter le phénotypage visuel, la biomasse fongique de *M. graminicola* sera mesurée par PCR quantitative dans les tissus infectés à différents moments du cycle infectieux, en particulier dans les étapes précoces de l'infection sans symptômes (Beauchell et al 2005 ; Guo et al 2006).

Les marqueurs utilisés pour le génotypage seront issus d'un projet ambitieux qui a été mis en place entre l'INRA et six sociétés privées de semenciers dont ARVALIS, RAGT et BIOPLANTE (projet DIGITAL, coordonnateur E. Paux, INRA). L'objectif de ce projet est de développer des marqueurs (ISBP et SNP) et de valider leur pertinence pour des études de génétique à venir. Le génotypage du panel sera en partie réalisé dans le projet DIGITAL, et le complément de génotypage nécessaire le sera dans le cadre de ce projet FSOV.

Les études d'association seront menées, soit avec a priori en ciblant sur les marqueurs liés aux gènes *Stb* bien identifiés, soit sans a priori (génomique large) en scannant l'ensemble du génome pour identifier de nouveaux loci de résistance.

## Résultats escomptés et valorisations

**E**valuation du comportement variétal vis-à-vis de la sensibilité à la septoriose

**M**atrice de génotypage dense du panel valorisable pour toute autre thématique

**V**alidation d'un outil sensible de quantification de la biomasse fongique de *Mycosphaerella*

**I**dentification de marqueurs moléculaires associés soit aux gènes *Stb* soit à de nouvelles régions impliquées dans la résistance

**O**utils de sélection assistée par marqueurs pour l'évaluation et la caractérisation variétale

**C**e projet permettra de valoriser directement les méthodes et outils développés dans le projet FSOV 2008 et profitera de l'expertise des partenaires déjà tous impliqués dans ce même projet.

## Fonds engagés

Les fonds engagés pour ce programme de 3 ans sont de 568 732 € dont 398 112 € d'aide FSOV.





*FsoV* JEUDI 8 JANVIER 2015

## EVALUATION DE LA RÉSISTANCE À LA SEPTORIOSE PAR GÉNÉTIQUE D'ASSOCIATION

Delphine HOURCADE



**PARTENAIRES**

ARVALIS Institut du végétal

bioplante

PLANT RESEARCH INTERNATIONAL

R2n



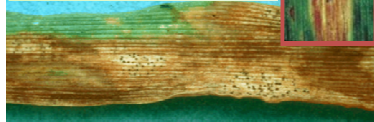
## LA SEPTORIOSE

- Maladie la plus dommageable
- Nuisibilité importante

*Zymoseptoria tritici*  
*Septoria tritici*

F. sexuée = *Mycosphaerella graminicola*





Moyens de lutte

- Traitement chimique
- Résistance variétale

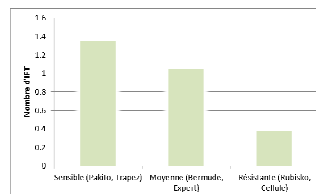
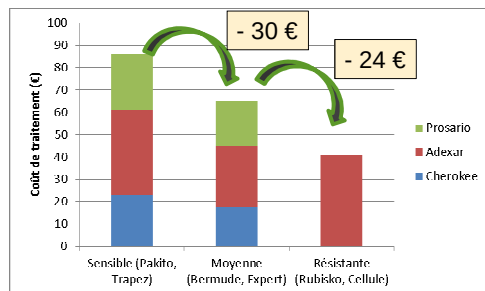



Source : ARVALIS 2014 – JY Maufrais  
\* Nuisibilité rouille jaune exclue

| Année | BTH nuisibilité | BTH NS Trait |
|-------|-----------------|--------------|
| 2007  | 24.2            | 2.1          |
| 2008  | 27.1            | 2.1          |
| 2009  | 20.1            | 2.0          |
| 2010  | 9.4             | 2.0          |
| 2011  | 8.4             | 1.9          |
| 2012  | 24.6            | 2.2          |
| 2013  | 17.1            | 2.2          |
| 2014  | 21.7            | 2.4          |



## LA LUTTE AVEC LA RESISTANCE VARIETALE



Source : ARVALIS 2014 JY Maufrais  
Programme type

- ✓ Retarder les dates d'interventions
- ✓ Diminuer les doses / nombre / coût des traitements
- ✓ Limiter l'expression des symptômes et donc réduire le risque d'apparition des souches résistantes aux fongicides



## LES OBJECTIFS DU PROJET

Etudier la diversité de la génétique française et européenne pour identifier des loci impliqués dans la résistance à la septoriose

- ✓ caractériser le potentiel de résistance
- ✓ améliorer les programmes de sélection



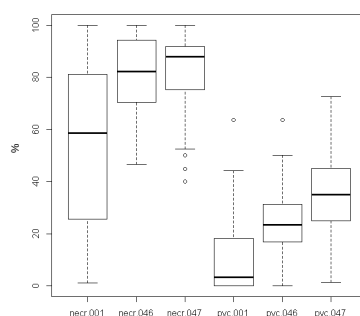


## LES DONNEES PHENOTYPIQUES

Panel de 206 variétés (146 variétés inscrites + 60 lignées en sélection)

### Stade plantule

- ✓ Inoculation avec les souches IPO98001, 98046, 98047
- ✓ 2 répétitions
- ✓ Notations des nécroses et des pycnides sur F1 et F2
- ✓ Quantification de la biomasse fongique par qPCR (gène EF1 $\alpha$ )



Quantité de nécroses et de pycnides induites avec les 3 souches

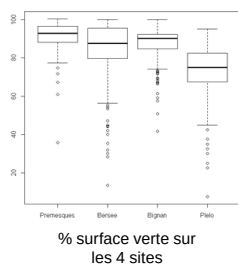


## LES DONNEES PHENOTYPIQUES

### Stade Adulte :

- ✓ 4 essais au champ chacun inoculé avec IPO98046 ou 98047 (Bersée, Bignan, Plélo, Premesques)
- ✓ Notations visuelles des symptômes (cinétique)
- ✓ Photos numériques
- ✓ Quantification de la biomasse fongique par qPCR
- ✓ Notations Rendement, PMG, nb grain/m<sup>2</sup> (Plélo), PMG (Bignan), Précocité, Rouille jaune

Calcul d'AUC entre l'épiaison et la sénescence pour les notations et les photos → % surface verte



% surface verte sur les 4 sites

|                           | auc.notations. bersée | auc.notations. bignan | auc.notations. plélo | auc.notations. premesques | auc.photo.bi gnan |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|---------------------------|-------------------|
| auc.notations. bersée     |                       |                       |                      |                           |                   |
| auc.notations. bignan     | 0.784055937           |                       |                      |                           |                   |
| auc.notations. plélo      | 0.703195209           | 0.508724937           |                      |                           |                   |
| auc.notations. premesques | 0.74445082            | 0.748913297           | 0.454424841          |                           |                   |
| auc.photo. bignan         | 0.480247496           | 0.598631083           | 0.483744485          | 0.421783063               |                   |
| auc.photo. plélo          | 0.651809834           | 0.54592331            | 0.839679382          | 0.50432514                | 0.536172682       |

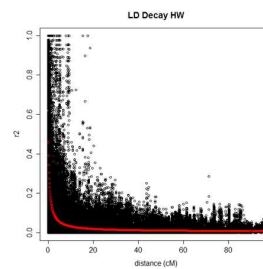
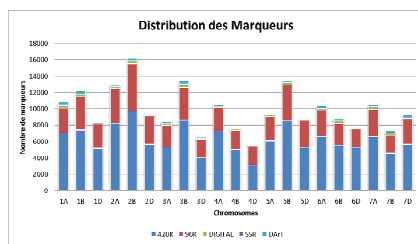
Très bonnes corrélations entre essais mais corrélation nulle avec les notations plantules





## LES DONNES GENOTYPIQUES

- ✓ 439 SSR publics (INRA GDEC)
- ✓ 1572 DArT (Triticarte)
- ✓ 1734 SNP issus du projet DIGITAL (INRA GDEC)
- ✓ 35857 SNP issus de la puce 90K (Illumina Infinium)
- ✓ 104727 SNP issus de la puce TaBW420K élaborée dans le projet BREEDWHEAT (INRA GDEC)



Gamme de LD : 0.2 à 3.9 cM

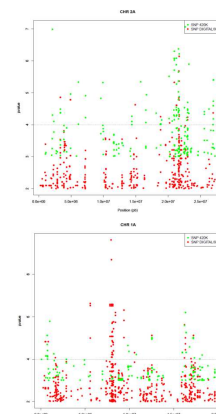


## GENETIQUE D'ASSOCIATION

- ✓ Modèle linéaire mixte :  $P = G + K + \epsilon$   
P=phénotype, G=génotype, K=kinship,  $\epsilon$ =résiduelle
- ✓ Utilisation du package ASReml dans R
- ✓ Elimination des marqueurs ayant une MAF<5% et un taux de données manquantes > 15%

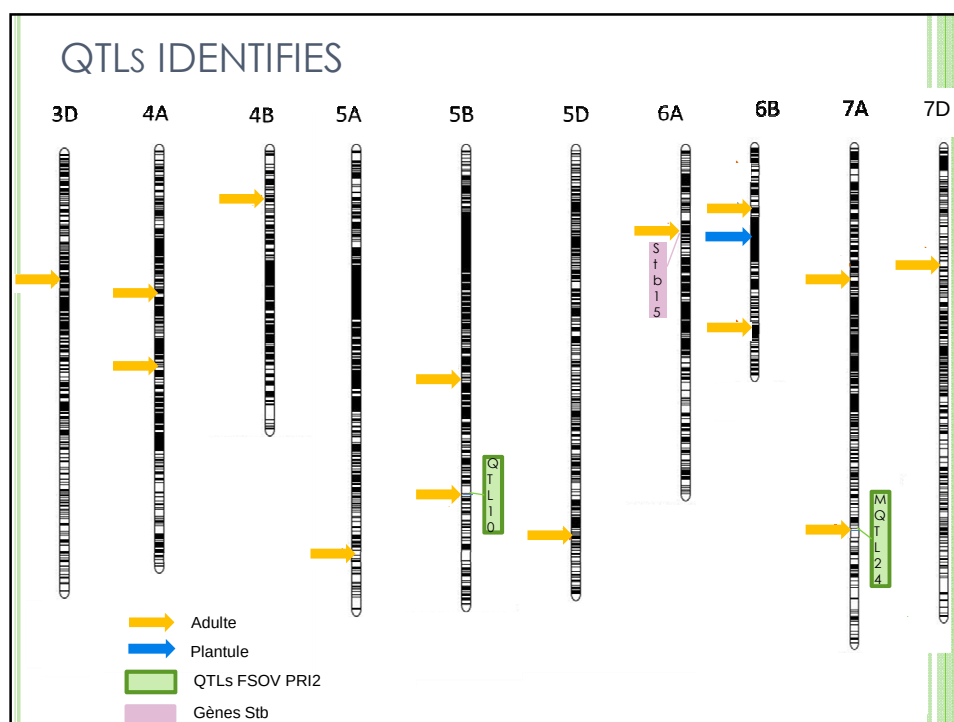
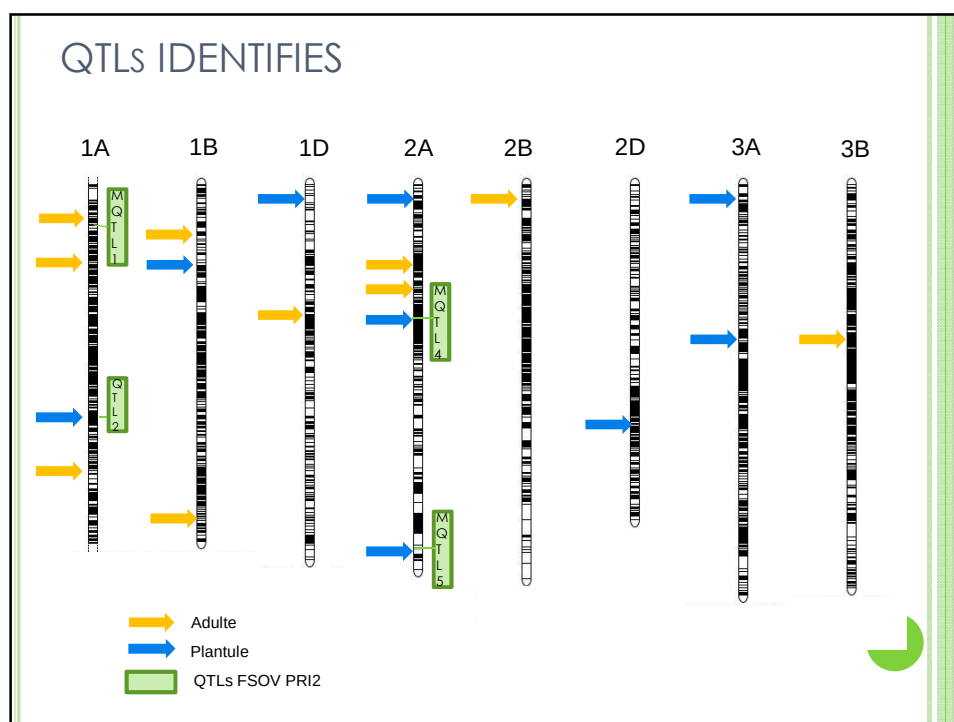


- 34 QTLs identifiés
- 10 QTLs spécifiques du stade plantule
- Aucun QTL souche spécifique
- Part génétique expliquée :  $3\% < R^2 < 20\%$
- Impact sur la surface verte : Gain de 4% à 20%
- Colocalisation :
  - faible avec les gènes Stb
  - intéressante avec des études récentes



Exemples de Manhattan Plot

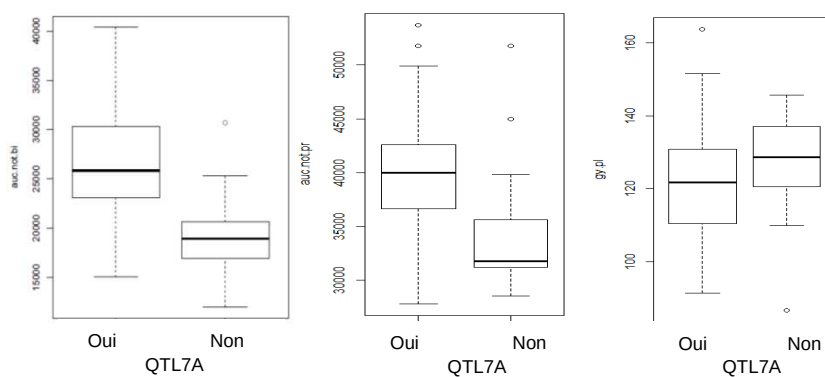






## EXEMPLES DE QTLs

La majorité des QTLs identifiés semble avoir un effet négatif sur le rendement

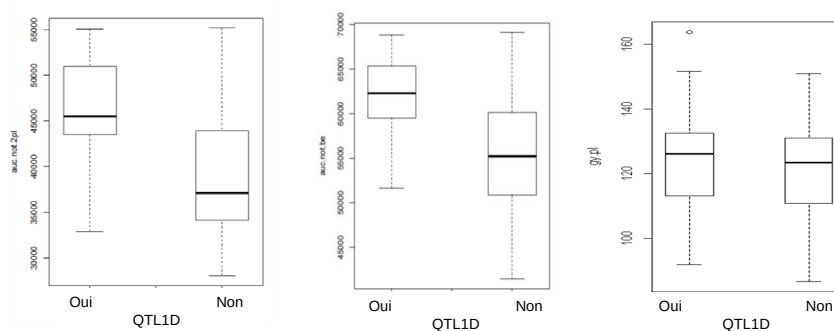


Le QTL 7A permet de réduire de 15 % la surface nécrosée mais induit une perte de rendement de 6%



## EXEMPLES DE QTLs

Tous les QTLs ne pénalisent pas le rendement: cas du QTL1D



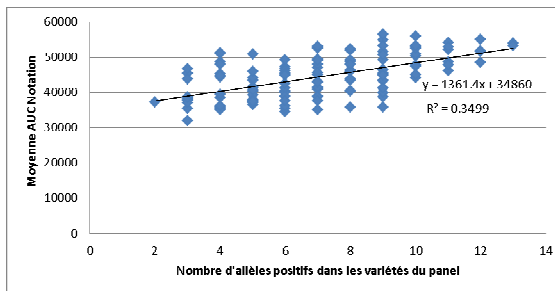
Ce QTL permet diminuer de 8 % la surface nécrosée





## APPORT DES QTLs

Quelle part de résistance est expliquée par la présence de ces QTLs dans les variétés étudiées ?



Corrélation entre le nombre d'allèles positifs et la résistance

|                          |      |
|--------------------------|------|
| 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 |

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



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

- Acquisition d'une base de données Septoriose conséquente
- Pas de distinction de QTLs souche spécifique. Nécessité d'appliquer des souches très contrastées pour cibler les détections
- Gain en surface verte significatif grâce à la présence de ces QTLs, ceux-ci doivent être exploités à la lumière des impacts sur le rendement  
Possibilité de construire des modèles de prédiction
- Nécessité d'une étude de méta-analyse pour isoler les QTLs à effets forts identifiés dans diverses études récentes
- Multiples QTLs qui confirment une résistance polygénique et complexe et l'intérêt de recourir à la sélection génomique





## PARTENAIRES - REMERCIEMENTS



- Delphine HOURCADE
- David GOUACHE
- Katia BEAUCHENE
- Les équipes régionales



- Olivier ROBERT
- Ellen GOUEMAND
- Denis BEGHIN



- Christophe MICHELET
- Laure DUCHALAIS



- Gert KEMA
- Mahmod Seyed TABIB GHAFARY







## 2010 M

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



### Objectifs



L'objectif de ce projet est d'obtenir de nouveaux outils pour le sélectionneur, qui faciliteront l'obtention de variétés de blé tendre résistantes à la production de mycotoxines de fusarioses dans les grains.

### Contexte

La fusariose du blé est une maladie qui peut conduire à des pertes de rendement allant de 30 à 70 % quand les conditions environnementales sont favorables au développement de cette maladie (précédent maïs, humidité élevée et pluie pendant la période de floraison). Cette maladie est également responsable de l'accumulation de mycotoxines dans le grain. Pour les céréales à paille, les mycotoxines les plus fréquentes sont les trichothécènes de type B (surtout DON et NIV), mais les trichothécènes de type A comme les toxines T2 et HT2 peuvent être également produites par plusieurs espèces de fusariose. Ces mycotoxines provoquent des fièvres, nausées, maux de tête, diarrhées, vomissement chez l'homme et chez l'animal, ces symptômes sont accompagnés d'une perte de poids. Parmi ces mycotoxines, toutes n'ont pas la même toxicité : Ainsi, la Nivalenol et la toxine T2 sont 20 fois plus toxiques que la DON. La toxicité de ces mycotoxines a conduit la communauté européenne à fixer des concentrations limites en DON et zearalénone dans les lots de grain destinés à la commercialisation. Pour les toxines T2 et HT2, une limite sera très probablement fixée à 100 µg/kg dans un très proche avenir. Actuellement, aucune information n'est connue sur l'existence de variétés résistantes à la production de ces 2 mycotoxines et le nombre de variétés résistantes à la production de DON reste encore trop limité.

## Protocole / Matériel & Méthode

Afin d'obtenir ce résultat, le projet se décompose en plusieurs étapes qui consisteront à :

**D**éterminer s'il existe ou non une corrélation entre la teneur en trichothécènes A (T2 et HT2) et celle en trichothécènes B (DON et NIV) dans le grain, selon les variétés de blé tendre et les espèces de fusarioses testées.

**E**valuer la répartition et la fréquence des différentes espèces de fusariose dans de nombreux lieux d'essais en France, afin d'obtenir une carte partielle de la représentativité de chaque espèce de fusariose.

**P**hénotyper, par la notation des symptômes visuels, une trentaine de variétés ainsi qu'une population (constituée d'une centaine de lignées) contaminées artificiellement par des espèces de fusarioses productrices des mycotoxines T2, HT2, NIV et DON.

**I**dentifier les lignées capables de détoxifier ces mycotoxines (résistance de type 3).

**G**énotyper ces lignées avec un grand nombre de marqueurs moléculaires (DArT, SNP, ISBP...)

**I**dentifier des marqueurs moléculaires liés aux QTL de résistance à la production de mycotoxines (DON, NIV, T2 et HT2).

**V**alider le FTNIR comme un nouvel outil d'évaluation des mycotoxines dans le grain.

## Résultats escomptés et valorisations

Les principaux résultats attendus sont les suivants :

**E**stimation de la représentativité des différentes espèces de fusariose présentes en France ; Ces différentes espèces étant susceptibles d'expliquer les différences de type de mycotoxines présentes dans les grains de blé.

**M**ise en évidence d'une corrélation (ou d'une absence de corrélation) pour la teneur en trichothécènes de type A (T2, HT2) et de type B (DON, NIV) dans les grains des variétés de blé résistantes et sensibles.

**P**roduction d'une nouvelle population de lignées HD pertinente pour l'étude des mycotoxines de fusarioses.

**V**alidation de nouvelles sources de résistance aux mycotoxines DON, NIV, T2 et HT2.

**I**dentification de lignées ayant une résistance de type III (capables de détoxifier les mycotoxines DON, NIV, T2 et HT2).

**I**dentification de marqueurs moléculaires liés aux QTL de résistance aux symptômes, aux mycotoxines des fusarioses ainsi qu'aux QTL de résistance de type III.

**V**alidation du FTNIR comme outil d'estimation de la teneur en mycotoxines dans le grain.

## Fonds engagés

Les fonds engagés pour ce programme de 3 ans sont de 436 700 € dont 305 690 € d'aide FSOV.



*FsoV* JEUDI 8 JANVIER 2015

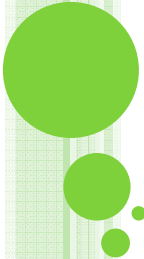




**ÉTUDE DES FACTEURS DE RÉSTANCES DU BLÉ TENDRE À LA PRODUCTION DES MYCOTOXINES T2, HT2, DON ET NIV PAR LES FUSARIOSES**

**Valérie LAURENT**

Hermann BURSTMAYR, Laure DUCHALAIS, Delphine HOURCADE, Marc LEMMENS, Olivier Robert




**LA FUSARIOSE DU BLÉ**





- provoque des pertes de rendements (>20qx/ha)
- provoque une contamination des grains par des mycotoxines
- 2 champignons étudiés: *Fusarium graminearum* et *Fusarium sporotrichioides*
  - =>trichothécènes de type B: DON, NIV
  - de type A: T2 et HT2

Ces mycotoxines sont très toxiques pour l'homme et les animaux

=>seuil réglementaire européen T2 et HT2 (100µkg/kg)  
DON et NIV (200-1250µg/kg)



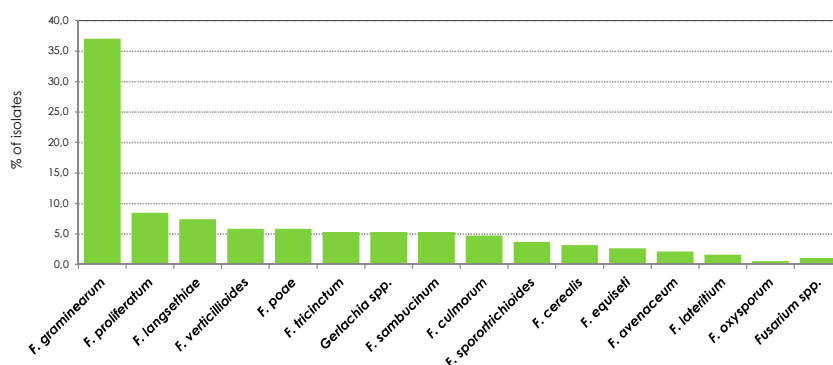


### EN SERRE : TEST DE LA TOXICITÉ DES MYCOTOXINES SUR LES ÉPIS

- 3 concentrations: 0,5, 1 et 2 mg / épi
- 2 solvants: méthanol ou eau-acétonitrile (60:40)
- Mêmes symptômes qu'avec les champignons:
  - => blanchiments des épillets
  - => Échaudage de l'épis du bas vers le haut
- => Forte corrélation entre la résistance aux 4 toxines DON, NIV, T2 et HT2 ( $r = 0.74-0.89$ )
- => Les lignées les plus résistantes sont les descendantes de Sumai 3 qui possède le gène *Fhb1*



### RÉPARTITION DES FUSARIUM EN FRANCE



- => *F. graminearum* : espèce de *Fusarium* dominante en France.
- => *F. sporotrichioides* mineure
- => Répartition des espèces en France = répartition des espèces en Europe (Boutigny *et al.*, 2014)





329 lignées testées en 3 ans

3 lieux : Autriche, Nord et Centre de la France

#### Mesures de la fusariose

- AUDPC 26dpi: % d'épillets fusariés x % d'épis contaminés
- FDK
- qPCR pour la quantité de champignons

caractères associés: hauteur, extrusion des anthères , date d'épiaison

#### Mesures des toxines

- Elisa DON
- GC Ms/Ms: DON, NIV, T2 et HT2
- Test d'un autre outil: Le FT-NIR



#### DOSAGE DE MYCOTOXINES

- Dosage Elisa = dosage GC- Ms/Ms ( $r=0.99$ )
- Sur les 3 années, les teneurs en mycotoxines ont variées

#### Inoculation *F. graminearum*:

DON: 442 à 49 100 µg/kg  
 T2: <10 à 18  
 HT2: <10 à 1 130  
 ZON: 10 à 6 350

Corrélation élevée avec  
 la maladie (0.85)  
 le FDK (0.91)





## DOSAGE DES MYCOTOXINES

Inoculation *F. sporotrichioides*:

|      |                   |
|------|-------------------|
| DON: | <50 à 8 130 µg/kg |
| T2:  | <10 à 667         |
| HT2: | <10 à 3 250       |
| ZON: | <10 à 1 080       |

=> La contamination par les trichotécènes B (DON et Zearalinone) indique un fond de contamination naturelle par *graminearum*.

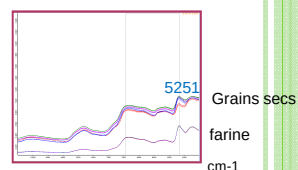
Corrélation moyenne avec la maladie (0.61 à 0.7)

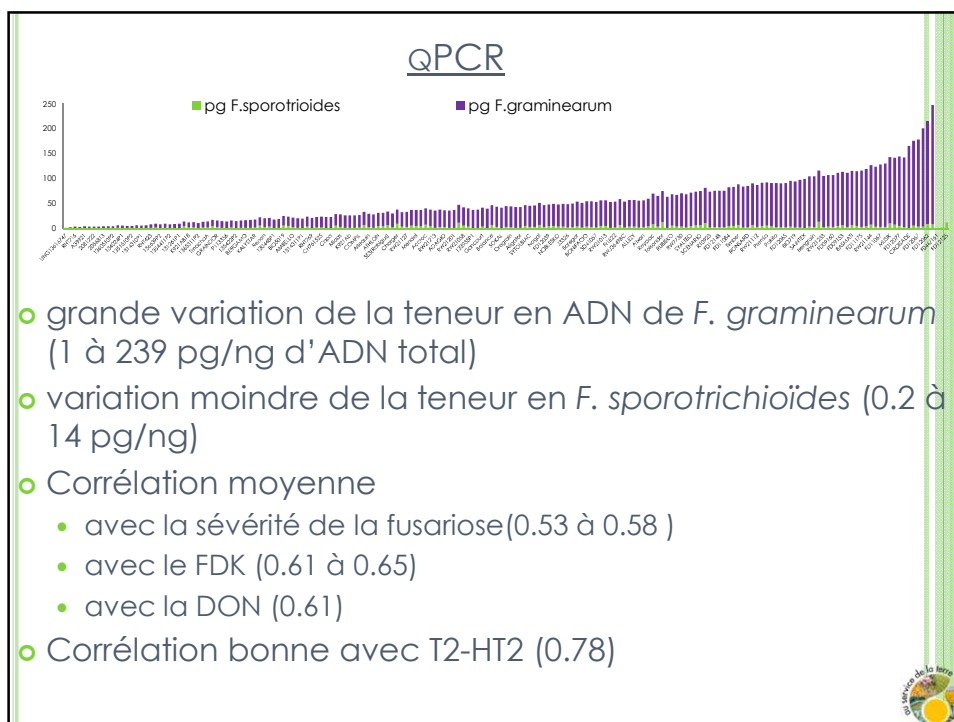
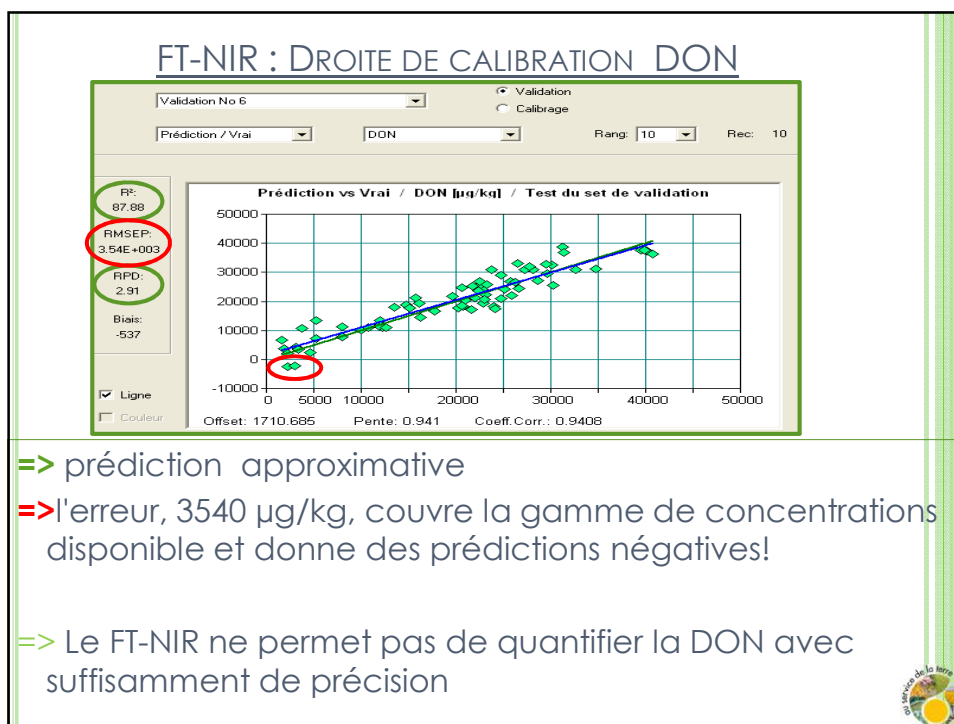
Corrélation bonne avec le FDK (0.73)



## DOSAGE DE LA DON PAR FT-NIR

- Test sur grains ou sur farine séchés  
=> mesures plus répétables sur farine
- Absorption de la DON entre 5000 et 5300 cm<sup>-1</sup>
- Les concentrations de DON obtenues par GC ont servi de référence







### LES CARACTÈRES PHYSIOLOGIQUES

|                       | FHB26_FG | AUDPC_FG | FHB26_FS | AUDPC_FS | Hauteur | Anthères<br>retention |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------|---------|-----------------------|
| Hauteur               | -0.61    | -0.61    | -0.57    | -0.57    | 1.00    |                       |
| Anthères<br>retention | 0.59     | 0.63     | 0.45     | 0.51     | -0.47   | 1.00                  |
| Date<br>d'épiaison    | -0.11    | -0.03    | -0.14    | -0.04    | 0.49    | -0.09                 |

- pas d'impact des caractères hauteur et précocité sur la résistance. Il y a des résistants et des sensibles dans toutes les classes de précocité et de hauteur.
- Malgré une corrélation moyenne (0.45 à 0.63), les lignées avec une extrusion élevée sont moins fusariées que les autres.



### RÉSISTANTS / SENSIBLES

- Quelque soit le champignon, le caractère ou le lieu, les lignées les plus résistantes sont les lignées expérimentales descendantes de Sumaï 3
- Variétés + résistantes : Capo, Renan, Illico
- Variétés + sensibles : Timber, Toison dor, Charger, Royssac
- Variétés mal classées: Isengrain et Bagou





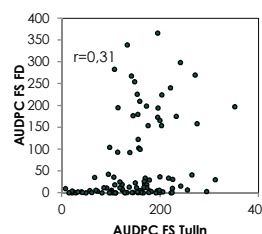


### IMPACT DU PROTOCOLE D'INOCULATION SUR LES MESURES

- IFA: inoculation tous les 2 jours sur toutes les lignées pendant toute la période d'épiaison + brumisation
- Bioplante, Arvalis: 2 inoculations par lignées à partir de sa date d'épiaison + springler
- Même quantité totale de spores de champignons



=> Fort effet lieu qui a impacté l'étude d'association => pas d'association commune aux différents lieux!



### CONCLUSIONS

- La teneur en mycotoxines est liée à la sensibilité de la plante à la fusariose
- La résistance à *F. graminearum* est liée à la résistance à *F. sporotrichioides*
- FDK, Elisa, GC-Ms/Ms et qPCR sont des bons outils pour évaluer la résistance des plantes à la fusariose





## 2010 G

# 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



## Objectifs



L'objectif de cette étude est de proposer des outils visant à mieux caractériser le comportement des variétés de blé tendre vis-à-vis de ses différents champignons pathogènes.

## Contexte

Le blé tendre subit des dégâts de maladies qui se développent à différents stades causant des pertes de rendement importantes mais également la production de mycotoxines. Si l'amélioration de la tolérance des variétés, les pratiques culturales et les traitements fongicides ont permis de maintenir des rendements élevés et une bonne qualité du grain, il est aujourd'hui nécessaire d'intensifier les travaux en matière de sélection et de caractériser les variétés vis-à-vis des pathogènes. 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 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, 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.

## Protocole, Matériel & Méthode

Ce projet est structuré autour de trois axes.

Le premier axe concerne la constitution d'une mycothèque de souches récentes de champignons pathogènes du blé accessible à tous les partenaires. Les espèces ou genres sur lesquels il a été choisi de travailler sont les suivants : *Fusarium* spp., *Microdochium* spp., Rouille jaune (*Puccinia striiformis*), Rouille brune (*Puccinia recondita*), *Mycosphaerella graminicola* (ex *Septoria tritici*), *Phaeosphaeria nodorum* (*Stagonospora nodorum*), *Pyrenophora tritici-repentis* (*Helminthosporium*), Piétin verse (*Oculimacula* spp.) et Piétin échaudage (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*). Chaque souche fera l'objet d'une caractérisation précise afin de permettre la production d'inocula adaptés à chaque maladie d'intérêt économique. Le second volet de ce premier axe repose sur l'état des lieux et l'harmonisation des méthodes d'isolement, de conservation et d'inoculation des différentes espèces de pathogènes en s'appuyant sur les travaux menés dans divers autres projets et en les complétant.

Le second axe est orienté sur le développement d'outils moléculaires de caractérisation, détection et quantification des différents genres et espèces de champignons pathogènes du blé. Ces outils auront pour but d'identifier de manière précise les souches conservées dans la mycothèque et d'assurer une étude fiable des disparités variétales face à l'attaque de ces différents pathogènes.

L'ensemble de la démarche sera complété dans un troisième axe par une application de ces outils dans des expérimentations au champ, visant à caractériser les variétés de blé tendre face aux attaques de ces maladies. Les essais proposés auront deux objectifs :

- la présélection rapide de lignées de blé tendre résistantes à la fusariose obtenues par tilling (mutagenèse aléatoire) pouvant déboucher sur l'identification de sources de tolérance
- la mise en œuvre des protocoles d'inoculation et de suivi des différents champignons pathogènes dans les essais pour l'évaluation des variétés en cours de sélection.

## Résultats escomptés et valorisations

Ce projet aura pour vocation de générer une mycothèque qui se veut apte à être pérennisée, de participer au transfert de connaissances de la recherche fondamentale vers les sélectionneurs et les évaluateurs mais également de capitaliser des informations générées par d'autres projets et d'harmoniser des méthodes entre les partenaires. Il pourra être perçu comme un réseau de travail qui débouchera sur des collaborations durables dans le cadre de la sélection variétale du blé tendre face à ses pathogènes.

## Fonds engagés

Les fonds engagés pour ce programme de 3 ans sont de 571 076 € dont 399 753 € d'aide FSOV.



**FsoV** JEUDI 8 JANVIER 2015

## 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: **MYCOTEK**

**VALADE Romain**









## PROBLÉMATIQUE

- Nombreuses maladies sur le blé tendre qui peuvent provoquer des dégâts importants

**Ecart traité/non-traité en qx/ha**

**Année forte pression**  
Année moyenne

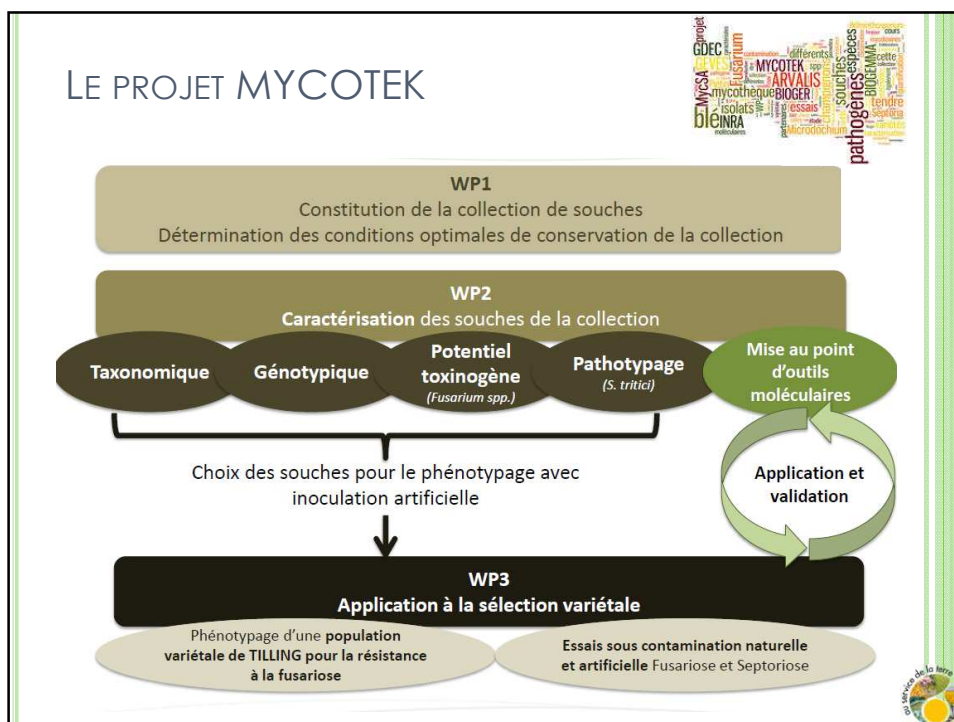
| Maladie             | Année forte pression (qx/ha) | Année moyenne (qx/ha) |
|---------------------|------------------------------|-----------------------|
| Pédozoïse           | 5                            | 3                     |
| Oïdium              | 12                           | 5                     |
| Sétozoïse           | 35                           | 15                    |
| Rouille jaune       | 60                           | 20                    |
| Rouille brune       | 40                           | 15                    |
| Pyraïdoïse sur épis | 15                           | 5                     |

Moyenne 2014: 21.7q/ha  
Moyenne pluriannuelle: 17q/ha

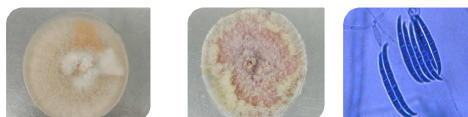
Source Arvalis-Institut du végétal

- Plan ECOPHYTO, résistances aux fongicides, contournement des résistances variétales...

→ Comment caractériser au mieux les variétés de blé tendre vis-à-vis des différents champignons pathogènes actuels afin d'aider à la sélection variétale?



## LA MYCOTHÈQUE



- 14 espèces, 151 souches

*Fusarium* spp., *Z. tritici*, *S. nodorum*, *Microdochium* spp., *Drechslera tritici-repentis*, *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*, *Rhizoctonia cerealis*

- Banque pérenne accessible aux partenaires du projet. Conserver en trois exemplaires



→ Source d'inoculum importante pour phénotyper les variétés avec des isolats récents



## DÉTERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES DE CONSERVATION DES ESPÈCES

- Évaluation de différents protocoles de conservation sur la survie des souches dans le temps et le maintien de l'agressivité sur la plante hôte

**Fiche technique**  
Conservation des souches de *Fusarium* spp. dans du glycérol 20% à -80°C

**Matériel & milieu**

- Boîte de pétri (diameter 15cm)
- Milieu PDA (Pense Dextrose Agar, Anomali)
- Nappes 0.25m
- Microsphaères de 1.5 cm 2 ml
- Eau glycérolisée à 20%
- Gel-Boîte

**Conditions de culture**

- Température: 18-25°C
- Humidité: 85%
- Abaissement: 10m/10m

**ETAPES**

1. Préparation du milieu de culture:
  - Préparer le milieu de culture (PDA) pendant 7 jours dans la chambre de culture.
  - Agiter 7 jours, dévoter les petits sacs (dextrose) dans l'eau de la chambre de culture.
  - Le mélange sera utilisé pour la culture à l'avenir.
2. Culture de *F. graminearum* (Pense):
  - Préparer le milieu de culture (PDA) pendant 7 jours dans la chambre de culture.
  - Agiter 7 jours, dévoter les petits sacs (dextrose) dans l'eau de la chambre de culture.
  - Le mélange sera utilisé pour la culture à l'avenir.
3. Préparation des souches de *F. graminearum*:
  - Dévoter les tubes contenant les souches de *F. graminearum* dans la chambre de culture.
  - Préparer le milieu de culture (PDA) pendant 7 jours dans la chambre de culture.
  - Agiter 7 jours, dévoter les petits sacs (dextrose) dans l'eau de la chambre de culture.
  - Le mélange sera utilisé pour la culture à l'avenir.

**Fiche technique**  
Conservation des souches de *Synchytrium endobioticum* (S. endobioticum) et *Albugo blight* (A. blight) à -80°C

**Matériel & milieu**

- Boîte de pétri (diameter 15cm)
- Milieu PDA (Pense Dextrose Agar, Anomali)
- Nappes 0.25m
- Microsphaères de 1.5 cm 2 ml
- Eau glycérolisée à 20%
- Gel-Boîte

**Conditions de culture**

- Température: 18°C
- Humidité: 85%
- Abaissement: 10m/10m

**ETAPES**

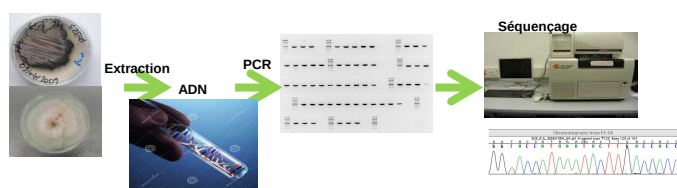
1. Préparation du milieu de culture:
  - Préparer le milieu de culture (PDA) pendant 7 jours dans la chambre de culture.
  - Agiter 7 jours, dévoter les petits sacs (dextrose) dans l'eau de la chambre de culture.
  - Le mélange sera utilisé pour la culture à l'avenir.
2. Culture de *S. endobioticum* (Pense):
  - Préparer le milieu de culture (PDA) pendant 7 jours dans la chambre de culture.
  - Agiter 7 jours, dévoter les petits sacs (dextrose) dans l'eau de la chambre de culture.
  - Le mélange sera utilisé pour la culture à l'avenir.
3. Préparation des souches de *S. endobioticum*:
  - Dévoter les tubes contenant les souches de *S. endobioticum* dans la chambre de culture.
  - Préparer le milieu de culture (PDA) pendant 7 jours dans la chambre de culture.
  - Agiter 7 jours, dévoter les petits sacs (dextrose) dans l'eau de la chambre de culture.
  - Le mélange sera utilisé pour la culture à l'avenir.

→ Identifier les méthodes optimales pour *Fusarium* et *Z. tritici*

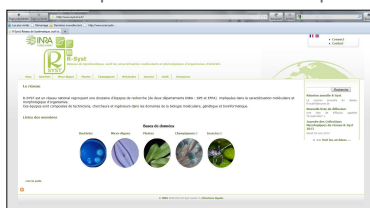
→ Valorisation par la rédaction de fiches techniques à disposition des partenaires

## CARACTÉRISATION DES SOUCHES DE LA COLLECTION

- Taxonomique**



- ✓ Séquençage des souches avec les marqueurs ITS (barcode) et EF1alpha pour *Fusarium*
- ✓ Séquences mises à disposition sur le serveur R-syst



→ Identification spécifique sans risque d'erreur

→ Alimentation de la base R-syst permettant de proposer des outils moléculaires de plus en plus spécifiques





## CARACTÉRISATION DES SOUCHES DE LA COLLECTION

### ○ Génotypique (*Z. tritici*)

Marqueurs microsatellites disponibles utilisés (Gautier et al., 2014).

→ Tous les isolats intégrés dans la mycothèque sont génétiquement différents

### ○ Pathotypage (*Z. tritici*)

15 isolats phénotypés sur une lignée différentielle de blé

| LIGNÉES DIFFÉRENTIELLES DE BLÉ |                           |
|--------------------------------|---------------------------|
| Cultivars                      | Gènes de résistance à STB |
| Tacheng 29                     |                           |
| Obelisk                        |                           |
| Copiale                        |                           |
| Bulgaria 88                    | Sb1 Sb2 Sb3 Sb4 Sb5       |
| Vernopolis                     | Sb6 Sb7                   |
| Israel 483                     |                           |
| Tadania                        |                           |
| CSyphatic                      |                           |
| Shafir                         |                           |
| Cadanza                        |                           |
| Estanovila Federal             |                           |
| M8 Synthet/3843                |                           |
| Courlet                        |                           |
| Belmon                         |                           |
| Kovae - K4500                  |                           |
| TEB11                          |                           |
| Salomon                        |                           |
| Arina                          |                           |
| Rband                          |                           |
| Synthet M3                     |                           |
| Balace                         |                           |
| Apache                         |                           |



## CARACTÉRISATION DES SOUCHES DE LA COLLECTION

### ○ Génotypique (*Z. tritici*)

Marqueurs microsatellites disponibles utilisés (Gautier et al., 2014).

→ Tous les isolats intégrés dans la mycothèque sont génétiquement différents

### ○ Pathotypage (*Z. tritici*)

15 isolats phénotypés sur une lignée différentielle de blé

| R Gènes | Sb1 | Sb2 | Sb3 | Sb4 | Sb5 | Sb6 | Sb7 | Sb8 | Sb9 | Sb10 | Sb11 | Sb12 | Sb13 | Sb14 | Sb15 | Sb16 | Sb18 |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|
| MTK30   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |
| MTK32   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |
| MTK33   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |
| MTK45   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |
| MTK46   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |
| MTK47   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |
| MTK48   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |
| MTK82   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |
| MTK83   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |
| MTK84   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |
| MTK85   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |
| MTK86   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |
| MTK87   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |      |      |      |      |      |      |      |

|         |                         |
|---------|-------------------------|
| 0%      | avirulent               |
| 1-9%    | faiblement virulent     |
| 10-24%  | virulent, intermédiaire |
| 30-100% | virulent                |

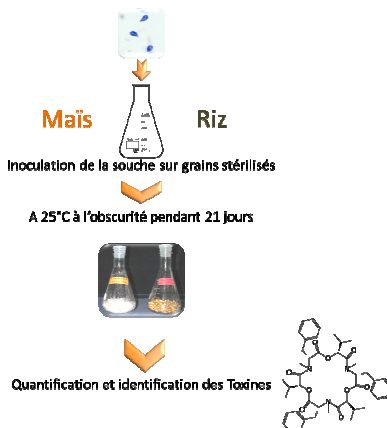
→ Inoculations artificielles avec des isolats caractérisés pour leurs virulences

- ✓ 3 souches avirulentes sur l'ensemble des géotypes
- ✓ Combinaisons de virulences différentes



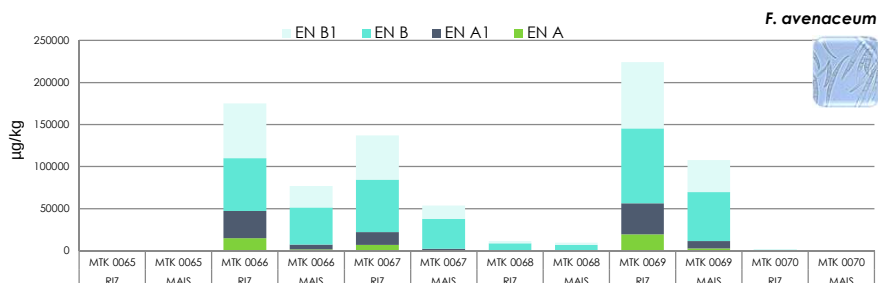
## CARACTÉRISATION DES SOUCHES DE LA COLLECTION

- Potentiel toxinogène (*Fusarium spp.*)
  - Mise au point d'outil biochimique et caractérisation des espèces pour la production de **toxines émergentes** (Enniatines, Beauvericine)



## CARACTÉRISATION DES SOUCHES DE LA COLLECTION

- Potentiel toxinogène (*Fusarium spp.*)
  - Mise au point d'outil biochimique et caractérisation des espèces pour la production de **toxines émergentes** (Enniatines, Beauvericine)



→ Meilleure expression du potentiel toxinogène sur riz pour les différentes espèces et toxines testées







## CARACTÉRISATION DES SOUCHES DE LA COLLECTION

- Potentiel toxigène (*Fusarium* spp.)
  - Mise au point d'outil biochimique et caractérisation des espèces pour la production de **toxines émergentes** (Enniatines, Beauvericine)

| Espèces             | ENNS |    |      |      | Nb souches produisant | BEA  | Nb Souches produisant | MON |
|---------------------|------|----|------|------|-----------------------|------|-----------------------|-----|
|                     | A1   | A  | B    | B1   |                       |      |                       |     |
| <i>F. poae</i>      | 0    | +  | 0    | 0    | 5/6                   | ++++ | 6/6                   | 0   |
| <i>F. avenaceum</i> | ++   | ++ | ++++ | ++++ | 3/6                   | +    | 6/6                   | 0   |

- Caractérisation des espèces pour la production de **TCTB** avec des outils moléculaires et biochimiques

→ Tous les isolats de *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum* ont été chémotypés. Données disponibles pour les partenaires.



## CARACTÉRISATION DES SOUCHES DE LA COLLECTION

- Potentiel toxigène (*Fusarium* spp.)
  - Mise au point **d'outil moléculaire** et caractérisation des espèces pour la production de **toxines émergentes** (Enniatines, Beauvericine)
- ✓ quantification **simple, fiable et rapide** des espèces productrices d'ENN et BEA sur céréales (par qPCR)
- ✓ **Problème:** très grande hétérogénéité du gène *esn1* → difficulté de détection des producteurs sur céréales

→ L'outil développé permet actuellement la quantification et l'identification de 3 espèces productrices d'enniattines et /ou beauvericine sur matrice blé :

***F. acuminatum*, *F. tricinctum* et *F. avenaceum***

→ Poursuite du développement pour les autres espèces productrices dont *F. poae*





## MISE AU POINT D'OUTILS MOLÉCULAIRES

- Internalisation ou développement de méthodes qPCR lors des trois années du projet:
  - Méthodes internalisées, validées pour 7 espèces de *Fusarium* et deux espèces de *Microdochium* (Elbet et al., 2014)
  - Nouvelle méthode développée pour *Z. tritici* avec technologie TaqMAN® → gène nucléaire monocopie de la mannitol déshydrogénase. Méthode très spécifique et sensible

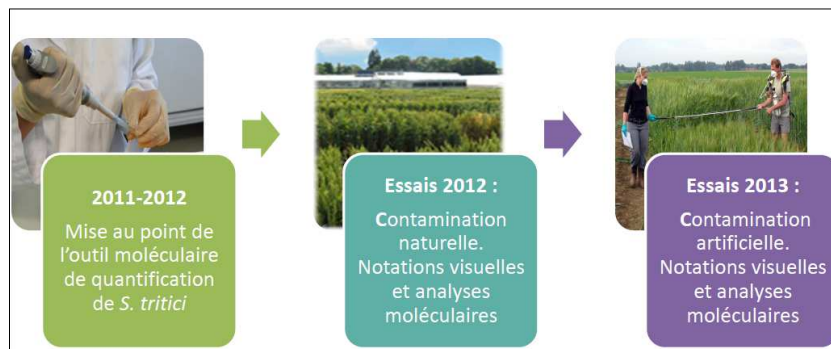
→ Applications évaluées pour la sélection variétale



## APPLICATIONS A LA SÉLECTION VARIÉTALE

- Septoriose et Fusarioses

Objectif: étudier la corrélation entre les notations visuelles et la présence de l'agent pathogène par la quantification de son ADN. Valider le phénotypage sous contamination artificielle et comparer l'efficacité de différentes souches.





## APPLICATIONS A LA SÉLECTION VARIÉTALE

- Essais pour la septoriose et les fusarioses

2012

### Contamination naturelle

5 lieux / 2 répétitions

2 dates de notation + prélèvements

2 approches :

- Par étage foliaire (= voir poster)
- Globale



2013

### Contamination artificielle :

- 3 souches différentes / essai
- 1 témoin non-inoculé

6 lieux / 2 répétitions

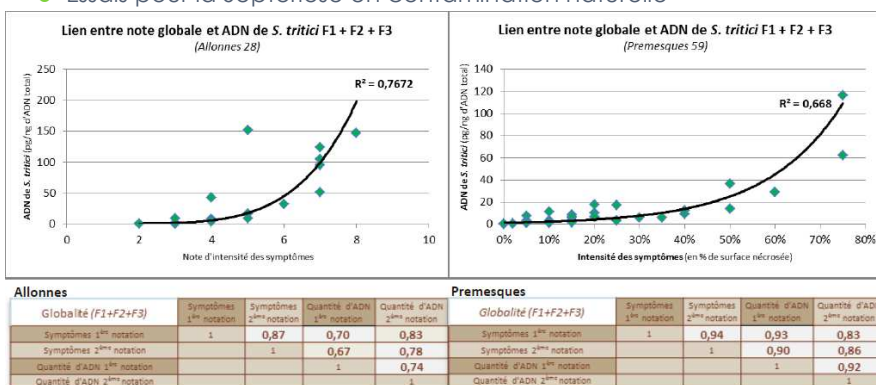
2 dates de notation + prélèvements

Approche globale



## APPLICATIONS A LA SÉLECTION VARIÉTALE

- Essais pour la Septoriose en contamination naturelle



→ Très bonne corrélation entre les notations visuelles et la quantité d'ADN du champignon et donc sur le classement variétal

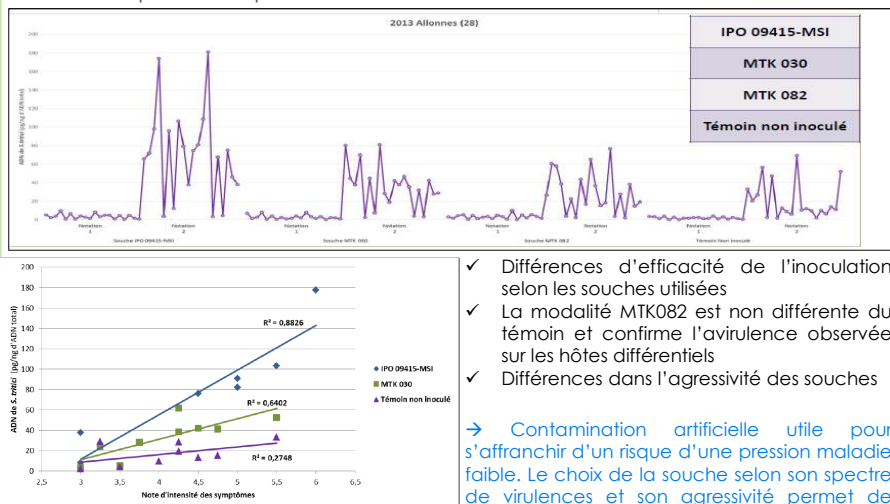
→ Intérêt supérieur de la qPCR en cas de complexe de maladies. Certaines variétés sensibles à la rouille jaune et la rouille brune ont pu être discriminées par l'outil qPCR contrairement aux notations visuelles impossibles à faire





## APPLICATIONS A LA SÉLECTION VARIÉTALE

### Essais pour la Septoriose en contamination artificielle



- ✓ Différences d'efficacité de l'inoculation selon les souches utilisées
- ✓ La modalité MTK082 est non différente du témoin et confirme l'avirulence observée sur les hôtes différentiels
- ✓ Différences dans l'agressivité des souches

→ Contamination artificielle utile pour s'affranchir d'un risque d'une pression maladie faible. Le choix de la souche selon son spectre de virulences et son agressivité permet de discriminer finement des variétés pour des gènes spécifiques au champ



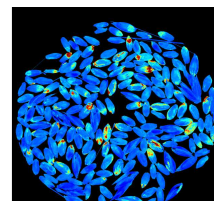
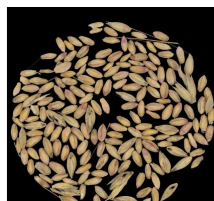
## APPLICATION A LA SÉLECTION VARIÉTALE

### Phénotypage par imagerie spectrale

#### → Diagnostiquer la fusariose de l'épis?

- ✓ Automatiser, robotiser les mesures
- ✓ Passer des notations visuelles aux mesures physiques dynamiques, non invasives et non destructives

→ Etudier la corrélation entre le % de grains fusariés évalué par le videometer et le % d'épillets fusariés par notation visuelle





## APPLICATION A LA SÉLECTION VARIÉTALE

### Phénotypage par imagerie spectrale

Dispositif expérimental :

Essai inoculé par spray de *F. graminearum* 07-

03 et *F. culmorum* R964

Blé tendre : 5 variétés :

Tremie (4) ; Altigo (4) ; Solehio (5) ; Arezzo (5.5) ;

Apache (7)

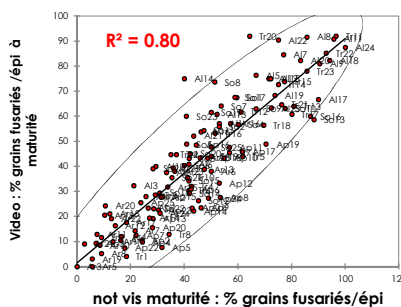
2 répétitions de 25 épis notés/rep

Notations visuelles au champ :

à la 2<sup>ème</sup> notation visuelle : autour de 360°C  
jour après floraison

Par épi : estimation du % épillets fusariés , %  
grains fusariés

à maturité : comptage du % grains fusariés



→ Bonne corrélation pour tous les stades testés avec l'algorithme mis au point par le GEVES



## APPLICATION A LA SÉLECTION VARIÉTALE

### Phénotypage par imagerie spectrale

Dispositif expérimental :

Essai inoculé par spray de *F. graminearum* 07-03 et *F. culmorum* R964

Blé tendre : 5 variétés :

Tremie (4) ; Altigo (4) ; Solehio (5) ; Arezzo (5.5) ;

Apache (7)

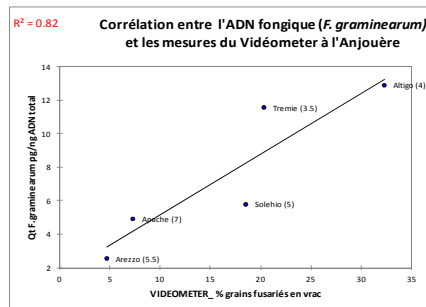
2 répétitions de 25 épis notés/rep

Notations visuelles au champ :

à la 2<sup>ème</sup> notation visuelle : autour de 360°C  
jour après floraison

Par épi : estimation du % épillets fusariés , %  
grains fusariés

à maturité : comptage du % grains fusariés



→ Bonne corrélation pour tous les stades testés avec l'algorithme mis au point par le GEVES  
→ Corrélations plus faibles dans d'autres essais notamment quand *Microdochium* est présent  
→ Continuer le développement en prenant en compte la présence de *Microdochium* (FSOV 2014 *Microdochium*)





## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

- Mise à disposition d'une mycothèque pérenne et accessible avec les principaux agents pathogènes du blé tendre caractérisés pour des critères utiles (gènes d'avirulence, agressivité, potentiel toxinogène...) afin d'aider la sélection variétale
- Progrès collectif pour la réalisation d'essais en contamination artificielle avec des échanges multiples et constructifs entre les différents acteurs de la filière
- Développements et validations d'outils de phénotypage (moléculaire et visuel automatisé) ayant un intérêt afin d'améliorer la précision dans le phénotypage des variétés notamment en présence d'un complexe maladies. Outils à disposition des partenaires (transfert, prestation...)
- Poursuivre ces collaborations pour lever les verrous techniques dans le phénotypage précis pour certaines maladies (FSOV 2014 Microdochium)





## 2010 F

# Variabilité génétique pour l'absorption d'azote post-floraison



### Objectifs



L'objectif de ce projet est de mieux comprendre la dynamique d'absorption post-floraison et les variables qui la contrôlent dans le but d'une part de tester des scénarios de gestion de l'azote optimaux pour des objectifs donnés et d'autre part d'explorer la variabilité génétique existante afin d'identifier le déterminisme génétique d'une forte valorisation des apports d'azote tardifs.

### Contexte

Par son impact sur le rendement et sur la teneur en protéines, l'azote est le principal élément nutritif de la culture de blé. Ses coûts économiques, énergétiques et environnementaux font toutefois qu'il est nécessaire de réfléchir aux stratégies permettant de l'utiliser plus efficacement. Une solution est de proposer des reports des dates d'application de l'engrais associés à des variétés capables d'absorber efficacement cet azote apporté tardivement. Néanmoins cette stratégie de décalage des apports d'azote repose sur l'existence de conditions climatiques favorables pour une absorption et utilisation efficace de l'azote.



## Protocole, Matériel & Méthode

Le programme est composé en quatre volets complémentaires.

**Le premier volet** a pour objectif d'analyser par simulation les interactions pedo-climat x stratégie de fertilisation x précocité variétale. Nous utiliserons pour cela un modèle de fonctionnement de la culture et différents scénarios climatiques régionalisés caractérisant aussi bien le climat actuel que les prédictions de climats futurs.

**Le deuxième volet** a pour objectif une analyse fine de la dynamique d'absorption d'azote post-floraison sur deux variétés. Ceci permettra de mieux comprendre les processus de régulation de l'absorption post-floraison et ainsi d'affiner les modèles de simulation et potentiellement d'identifier des caractères suffisamment simples pour permettre la mise en place de stratégies de phénotypage haut débit.

**Le troisième volet** a pour but d'analyser la variabilité génétique pour l'absorption post-floraison. Pour cela deux groupes d'une vingtaine de variétés seront cultivées avec deux stratégies de fertilisation. Chaque groupe sera caractérisé par une précocité différente mais cette dernière sera homogène au sein de chaque groupe.

**Enfin le dernier volet** aura pour objectif une première analyse du déterminisme génétique des traits importants identifiés dans les précédents volets. Pour cela nous proposons de conduire une approche de génétique d'association sur un panel de variétés adaptées.

## Résultats escomptés et valorisations

Les retombées attendues concernent en premier lieu une meilleure caractérisation phénotypique et génétique des variétés de blé pour leur capacité à valoriser les apports d'azote tardifs en interaction avec le climat et la stratégie de fertilisation azotée. Ces résultats pourront être à la fois valorisés dans les programmes de sélection et dans l'élaboration des stratégies de fertilisation azotée. Il permettra la mise au point et l'utilisation de modèles de fonctionnement des cultures permettant de simuler le comportement de variétés de blé. Enfin, les résultats de ce projet seront complémentaires de ceux issus du projet FSOV 2008 "Caractérisation du rythme de développement du blé tendre pour des variétés adaptées aux risques climatiques".

## Fonds engagés

Les fonds engagés pour ce programme de 3 ans sont de 516 210 € dont 321 040 € d'aide FSOV.







JEUDI 8 JANVIER 2015

## VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE POUR L'ABSORPTION D'AZOTE POST-FLORAISON

# Le Gouis Jacques



**INRA** : Jacques Le Gouis, Vincent Allard, Jean-Louis Joseph, Frédéric Henry, François Taulemesse, Emmanuel Heumez

**Arvalis – Institut du végétal** : Katia Beauchêne, David Gouache, Jean-Charles Deswarte

**CETAC** : Sylvie Dutriez - **Caussade Semences**, Volker Lein - **Saaten Union Recherche**, Pascal Giraudeau - **SECOBRA Recherches**, Philippe Momont, Stephen Sunderwirth – **Momont**, Jean-Michel Delhaye - **Lemaire-Deffontaines**

**Limagrain Europe** : Franck Lacoudre, Céline Duque, Jérémy Derory

**RAGT R2n** : Laure Duchalais, Frédéric Minard, Christophe Michelet, Laurent Guerreiro,

**Unisigma** : Philippe Lerebour, Clément Debiton



## CONTEXTE

- Corrélation génétique négative rendement (RDT) / concentration en protéines (GPC)
 

Pente moyenne : ↗ 10 q/ha RDT ⇒ ↘ 1% GPC (Oury et al 2003)
- Il existe des variétés possédant un écart positif/négatif à la relation RDT-GPC (Monaghan et al. 2001) : Grain Protein Deviation (GPD)
- Le GPD est sous contrôle génétique (Oury et al 2003, Oury et Godin 2007)
- Bonification à l'inscription des variétés significativement GPD+ (2007): 21 variétés inscrites avec un simple ou double bonus.

Rencontre Scientifique 8 janvier 2015

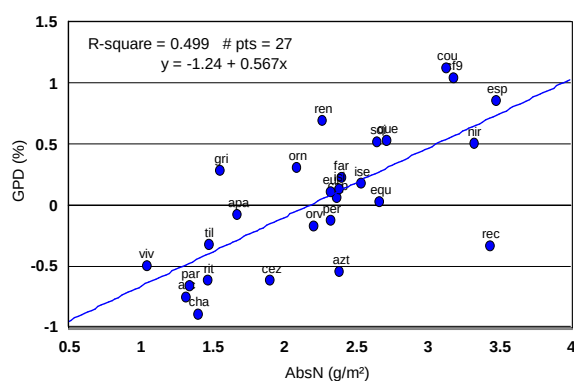


2



## UNE HYPOTHÈSE MAJEURE

La déviation à la relation négative entre rendement et teneur en protéine est en grande partie expliquée par l'absorption post-floraison (FSOV 2004-2007)



(Bogard et al 2010)

| Milieu | r²      |
|--------|---------|
| ml04N- | 0.05    |
| ml04Np | 0.15*   |
| ms04D- | 0.37*** |
| ms04Ir | 0.34*** |
| ms04N- | 0.12    |
| ms04Np | 0.21**  |
| ms05D- | 0.54*** |
| ms05N+ | 0.17*   |
| ms05N- | 0.22*** |
| ms05Np | 0.19*   |
| ml05N- | 0.19**  |
| ml05Np | 0.48*** |

3

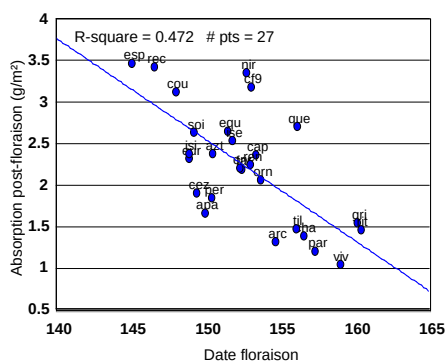


## INTERACTION AVEC LA PRÉCOCITÉ

Relation entre absorption post-floraison et précocité (FSOV 2004-2007)

Biais dû ?

- Apports d'azote à la même date
- Facteurs climatiques
- Cycle de l'azote du sol
- Effet génétique



(Bogard et al 2010)

4





## OBJECTIFS DU PROJET

### Quatre volets

- 1- Analyser les interactions Climat x Stratégies de fertilisation x Précocité variétale
- 2- Quantifier finement la dynamique d'absorption d'azote post-floraison
- 3- Analyser la variabilité génétique pour l'absorption post-floraison
- 4- Identifier le déterminisme génétique du GPD

Rencontre Scientifique 8  
janvier 2015

5



## LE GPD DÙ À L'ENVIRONNEMENT EST-IL RELIÉ AUX MÊMES MÉCANISMES QUE LE GPD DÙ AUX GÉNOTYPES ?

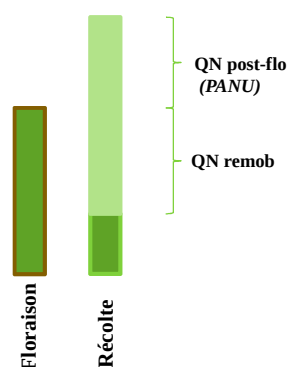
### Calcul d'un GPD dû à l'environnement

Jeu de données: observatoire Arvalis « PMOD ».

- Apache, Caphorn, Charger, Soissons
- Années 1997 à 2011
- 16 régions administratives
- Exclusion des fertilisations basses

→ 373 essais, >1000 données

- À floraison:
  - biomasse et %N (INN)
- À la récolte:
  - Grain: rendement et protéines
  - Pailles: biomasse et %N



Rencontre Scientifique 8  
janvier 2015

6



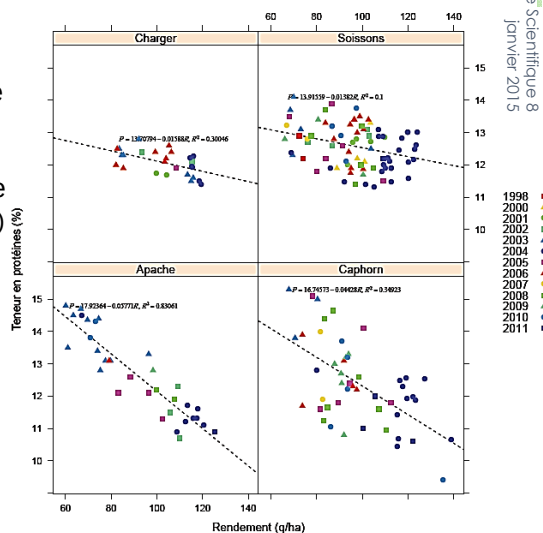
Volet 1



## CALCUL PAR VARIÉTÉ D'UN GPD DÛ À L'ENVIRONNEMENT

- Élimination des situations en carence azotée marquée (INNflo < 0.8)
- Détermination de la droite de régression par procédure itérative (Oury et Godin, 2007)
- Calcul d'un GPD sur l'ensemble des données

Corrélation RDT-GPC significative pour les 4 variétés

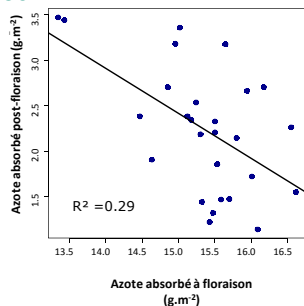


Volet 1

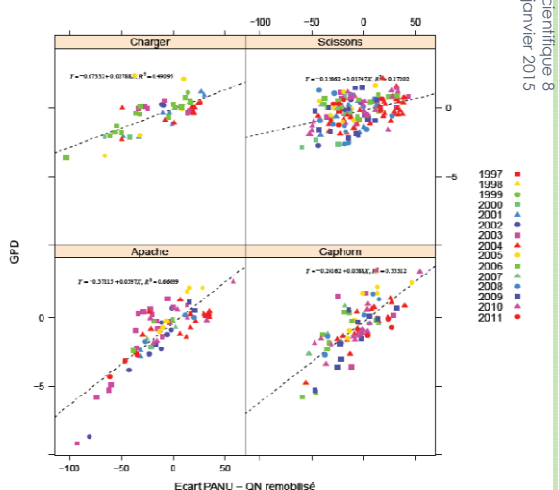
7

## LE GPD DÛ À L'ENVIRONNEMENT EST LIÉ À L'ABSORPTION POST-FLORAISON

Un écart PANU-QN remob positif conduit à un GPD positif



(Bogard et al 2010)



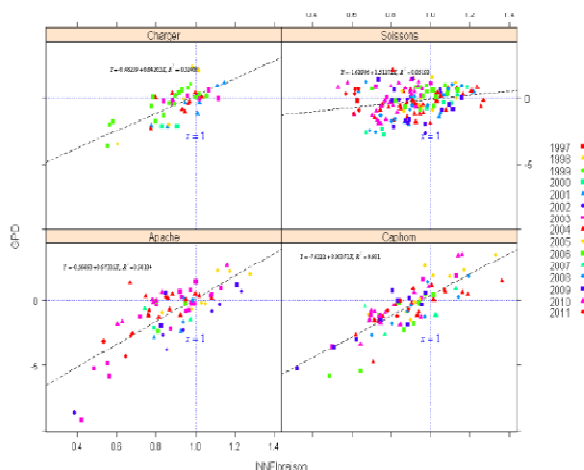
Volet 1

8



LE GPD DÙ À L'ENVIRONNEMENT EST LIÉ À L'INN FLORAISON

Un INNflo supérieur à 1 à floraison conduit à un GPD positif



Rencontre Scientifique 8  
janvier 2015

Volet 1



QUELLE EST LA DYNAMIQUE D'ABSORPTION D'AZOTE POST-FLORAISON ?

Expérimentation en conditions contrôlées

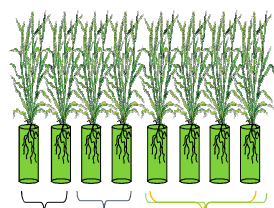


Condition pré-floraison

1mM 4mM 7mM 10mM

Condition post-floraison

10mM



Récital

Séparation

- Epis (Grains, Balles)
- Feuilles
- Tiges
- Racines

Mesures plantes entières

- Assimilation de  $CO_2$
- Absorption  $^{15}N$

Mesures

- Masses sèches
- Nombres de grains
- Surface foliaire
- Teneur en N

Analyses

- Transcriptomique
- Métabolomique

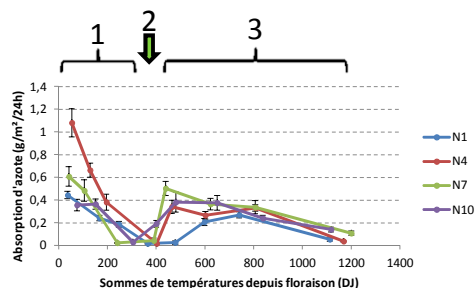
Rencontre Scientifique 8  
janvier 2015

Volet 1





## LA DYNAMIQUE D'ABSORPTION D'AZOTE POST-FLORAISON



- Absorption post-floraison non linéaire

### Manifestement régulée

- Trois phases dans la dynamique d'absorption post-floraison
  - ✓ Phase 1: baisse d'absorption \_ coïncidence réduction des puits
  - ✓ Phase 2: arrêt temporaire d'absorption \_ coïncidence absence de puits d'azote
  - ✓ Phase 3: reprise d'absorption \_ coïncidence développement du grain

Régulation par la demande / rythme de croissance de la plante

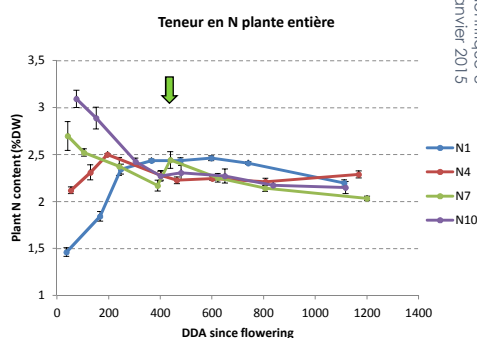
Volet 1

11



## INFLUENCE DU STATUT AZOTÉ PRÉ-FLORAISON

Coïncidence entre homogénéisation de l'absorption et homogénéisation de la teneur en azote de la plante



Absorption influencée par le statut azoté

Volet 1

12





## QUELLE EST LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE INDÉPENDAMMENT DE LA PRÉCOCITÉ ?

### Expérimentation au champ dans un réseau multilocal

- Séries variétales homogènes pour la précocité pour limiter les interactions stade x date d'apport d'azote
- Expérimentations sur 7 lieux et deux ans
  - 2 lieux INRA, 1 Arvalis, 4 CETAC-Limagrain-RAGT-Unisigma
- Deux apports d'azote différenciés par les apports pré-floraison (X-50, X+50)
- Mesure rendement – teneur en protéines
- Calcul du GPD
- Test du marquage  $^{15}\text{N}$  au champ pour estimer l'absorption post-floraison

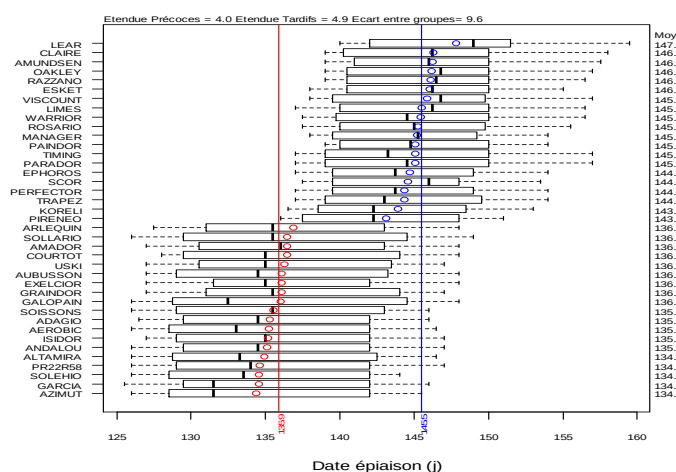
Volet 1

13



Rencontre Scientifique 8  
janvier 2015

## VALIDATION DES GROUPES DE PRÉCOCITÉ



Choix basé sur le 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)

Volet 1

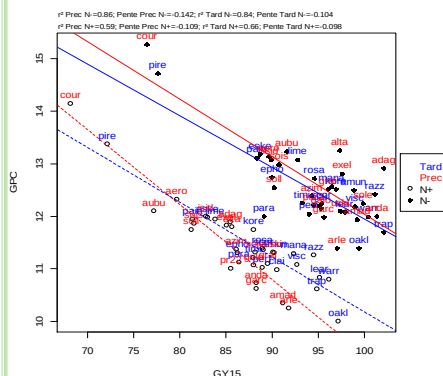
14



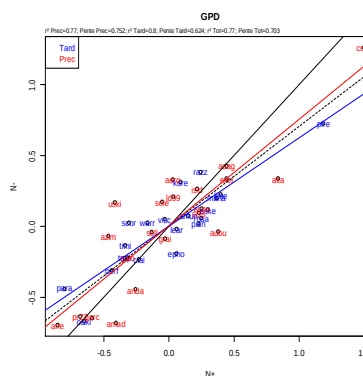
Rencontre Scientifique 8  
janvier 2015

Rencontre Scientifique 8  
janvier 2015

## ANALYSE DU GPD



## Corrélation négative du même ordre pour précoces et tardives



### Fortes corrélations entre doses d'azote

## Volet 1

15

15 

## LE MARQUAGE $^{15}\text{N}$ PERMET-IL ESTIMER L'ABSORPTION POST-FLORAISON ?

### Apport au champ d'engrais marqué

- Apport de 50 kg N / ha (liquide) (1% 15N)
- A Flo et Flo+15
- Sur 10 variétés de la série précoce x 2 répétitions

- Avantage : un seul prélèvement pour estimer l'azote absorbé
- Abondance naturelle : 0.3663%
- Tout l'azote 15 présent (au dessus de l'abondance naturelle) provient de l'engrais
- Suppose absence de discrimination isotopique si on veut estimer la part de l'engrais absorbé
- Ne marque que l'engrais apporté (pas N du sol)

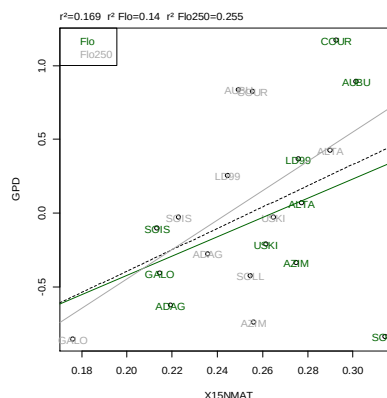
## Volet 1

10

Rencontre Scientifique 8  
janvier 2015

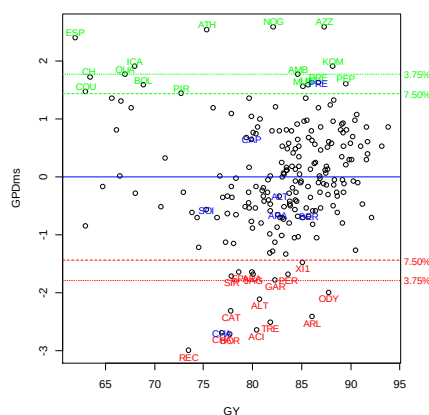
16



Rencontre Scientifique 8  
janvier 2015

**Corrélation significative avec le GPD**

17

Rencontre Scientifique 8  
janvier 2015Scientifique 8  
janvier 2015

18





## CONCLUSIONS

- 1- Analyser les interactions Climat x Fertilisation x Précocité variétale
  - Absorption N post-floraison explique aussi les différences environnementales
  - Pas d'interaction majeure avec le climat futur si adaptation de la précocité
- 2- Quantifier finement la dynamique d'absorption d'azote post-floraison
  - Contrôle de l'absorption par (i) le statut azoté à floraison, (ii) la force des puits
- 3- Analyser la variabilité génétique pour l'absorption post-floraison
  - Retrouve conclusions du précédent FSOV dans des séries de précocité homogène
  - Marquage  $^{15}\text{N}$  corrélé à l'absorption post-floraison
- 4- Identifier le déterminisme génétique du GPD
  - Données phénotypiques disponibles
  - Accès au marquage génétique de BreedWheat

Rencontre Scientifique 8  
janvier 2015

19

