

# Cartographie et développement de marqueurs liés au gène de résistance à la septoriose *Stb16q* en vue de son clonage

Cyrille Saintenac<sup>1</sup>, Florence Cambon<sup>1</sup>, Justin Faris<sup>2</sup>, Steven Xu<sup>2</sup>, Olivier Soudière<sup>1</sup>, Pauline Lasserre-Zuber<sup>1</sup>, Marc-Henri Lebrun<sup>3</sup>, Laure Duchalais<sup>4</sup>, Williams Marande<sup>5</sup>, Helene Berges<sup>5</sup>, Delphine Hourcade<sup>6</sup>, Mahmod Tabib Ghaffary<sup>7</sup>, Lamia Aouini<sup>8</sup>, Gert H.J. Kema<sup>8</sup>, Thierry Langin<sup>1</sup> et Olivier Robert<sup>9\*</sup>

1 - INRA/UBP UMR 1095 GDEC (Genetics, Diversity and Ecophysiology of Cereals), 5 chemin de Beaulieu, Clermont Ferrand, 63100, France

2 - USDA-ARS, Cereal Crops Research Unit, 1307 18th Street North, Fargo, ND 58102, USA

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

4 - RAGT 2n SAS, Route d'Epincy, 28150 Louville la Chenard

5 - Centre National des Ressources Génétiques Végétales, INRA UPR 1258, Castanet-Tolosan, France

6 - ARVALIS - Institut du végétal, 6 chemin de la Côte Vieille 31450 Baziege

7 - Seed and Plant Improvement Institute, P.O. Box 4119, Karaj 31585, Iran

8 - Wageningen University and Research, Wageningen Plant Research, Laboratory of Phytopathology, P.O. Box 16, 6700 AA Wageningen, The Netherlands

9 - Florimond Desprez, BP41, 59242, Cappelle-en-Pévèle, France

\* **Coordinateur** : Olivier Robert, [olivier.robert@florimond-desprez.fr](mailto:olivier.robert@florimond-desprez.fr)

## 1. Introduction

La septoriose, causée par le champignon *Zymoseptoria tritici*, est l'une des maladies les plus dommageables sur blé en France avec des pertes de rendement avoisinant, en moyenne chaque année, les quinze quintaux à l'hectare. L'utilisation des fongicides est actuellement le principal moyen de lutte contre cette maladie. Cependant, les populations de *Z. tritici* développent de plus en plus de résistances aux fongicides. Les strobilurines, principalement utilisées pour lutter contre cette maladie à l'origine, ne sont que très peu utilisées à l'heure actuelle car la résistance à ce type de fongicides est devenue commune dans les populations européennes du champignon. De plus en plus de populations du champignon développent aussi des pertes de sensibilité aux azoles. Cette maladie représente ainsi une menace grandissante pour la production de blé. L'utilisation de variétés de blé résistantes est une des alternatives les plus respectueuses de l'environnement et de la société pour lutter contre cette maladie et limiter les pertes de rendement.

A ce jour, seulement 21 gènes majeurs de résistance, appelés gènes *Stb*, ont été identifiés chez le blé (Brown *et al.*, 2015). Ce nombre est relativement faible comparé au nombre de gènes (environ 70 gènes de résistance) conférant une résistance à chaque type de rouille. L'origine des gènes *Stb* est très diverses. La plupart proviennent de variétés de pays et d'espèces ancestrales comme *TmStb1* (identifié chez *Triticum monoccocum*) et seul quelques-uns ont été identifiés chez des variétés cultivées. D'après les résultats de GWAS obtenus lors d'un précédent projet FSOV 2010I et au cours du programme BREEDWHEAT ainsi que d'après les données issues de la littérature (Arraiano and Brown, 2006; Kollers *et al.*, 2013; Miedaner *et al.*, 2013), peu de ces gènes majeurs sont présents dans le matériel européen. Seul le gène *Stb6* et *Stb15* sont connus pour être présents dans une proportion importante de variétés européennes et dans une moindre mesure le gène *Stb9* (Arraiano and Brown, 2006). D'autres sont postulés comme étant présents dans les blés cultivés mais leur présence reste à démontrer. Aucun marqueur diagnostique de ces gènes n'a encore été identifié, limitant la sélection de variétés résistantes. Une relation de type gène pour gène a clairement été démontrée pour le gène *Stb6* et le gène d'avirulence *avrStb6* (Brading *et al.*, 2002). La plupart des autres gènes majeurs déjà contournés

par le pathogène pourrait donc faire partie de cette catégorie considérée comme non durable si utilisés seuls. Lors d'un précédent projet FSOV2008B (Tabib Ghaffary *et al.*, 2012), le blé synthétique M3 porteur du gène *Stb16q*, a été montré comme résistant contre l'ensemble des souches testées. A ce jour encore, toujours aucune souche de *Z. tritici* n'a été identifiée comme étant virulente sur l'accession M3. Cette dernière et plus particulièrement le gène *Stb16q* représente ainsi potentiellement un mécanisme de résistance unique large spectre à fort potentiel pour la sélection française.

Au cours de ce projet, nous proposons de réaliser la cartographie fine du gène de résistance *Stb16q*, l'identification de marqueurs diagnostics pour le suivi de ce gène en sélection et le phénotypage d'une collection de blés synthétiques pour identifier de nouvelles sources de résistance à la septoriose.

## 2. Matériel et méthode

### ► Matériel végétal et inoculation par le champignon *Z. tritici*

Une population de cartographie biparentale issue d'haploïdes doublés de 170 individus ainsi qu'une population F2 d'environ 20 000 individus ont été créées à partir de croisements entre le blé synthétique TA4152-19 et l'accession ND495 sensible à la septoriose.

Un panel de 98 blés synthétiques a été commandé auprès du centre de ressources biologiques de l'université du Kansas (WRGC, <https://www.k-state.edu/wgrc/>). Ces accessions ont été multipliées au champ en première année. Seul 76 ont fournies un stock de grains suffisant pour des tests de phénotypage au stade plantule et au champ (Tableau 1).

Le phénotypage des populations de cartographie génétique a été réalisé au PRI avec les souches IPO88018, IPO95036 et IPO02159. Les plantes issues de la première série ont été inoculées par spray alors que l'inoculation des plantes issues de la deuxième série a été réalisée au pinceau. La première feuille a été inoculée et la lecture des symptômes a été effectuée à 21 dpi. L'inoculation des blés synthétiques a été réalisée au stade plantule sur la deuxième feuille de plantes âgées de 15 jours avec cinq souches (IPO92006, IPO9415, IPO9455, IPO86036 et IPO2166). Trois plantes par accession ont été

inoculées et la lecture des symptômes a été réalisée à 21 dpi. Le phénotypage de la collection de blés synthétiques au stade adulte a été réalisé avec la souche IPO9415. Trois inoculations successives ont été réalisées à partir de l'étalement complet de la feuille drapeau chez l'accession la plus précoce. La lecture des symptômes a été réalisée à six dates après inoculation.

### Analyses moléculaires

Le génotypage des marqueurs SSR a été réalisé suivant le protocole décrit au sein de l'article suivant (Saintenac *et al.*, 2008). Le génotypage des SNP a été conduit en utilisant le système de génotypage de type KASPar suivant le protocole du fournisseur.

La construction de la banque BAC et le criblage de cette dernière a été réalisé par le CNRGV suivant les protocoles décrits chez Peterson *et al.* 2000 et Gonthier *et al.* 2010, respectivement. Le séquençage des clones BAC a été réalisé à l'aide de la technologie Pacific Biosciences et leur annotation avec le pipeline Triannot (Leroy *et al.*, 2012).

Pour développer la population de mutants, environ 600 grains de l'accession TA4152-19 ont été traités avec une solution d'EMS à 0.3% pendant 16 heures. Après plusieurs lavages à l'eau, ces grains ont été semés et les 310 plantes M1 générées ont donné naissance à des graines M2 qui ont été directement utilisées pour les tests de phénotypage. Un total de 10 plantes par famille M2 a été phénotypé.

Le re-séquençage partiel du gène *Stb16q* a été réalisé par amplification PCR du premier exon. L'ensemble des produits PCR a été envoyé à GATC pour un séquençage suivant la méthode Sanger.

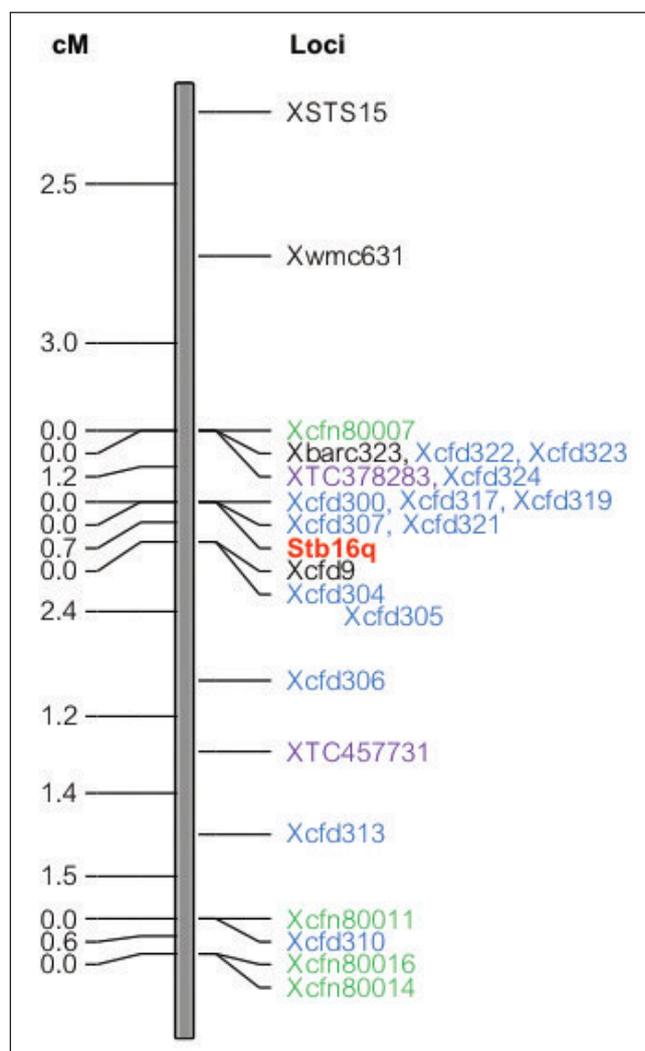
## 3. Résultats et discussion

Le projet FSOV2008B a permis de cartographier le gène *Stb16q* sur le chromosome 3D à partir de la population M3 (*Stb16q*) x Kulm (Tabib Ghaffary *et al.*, 2012). Cependant, l'inhibition de la recombinaison au niveau du locus *Stb16q* chez cette population, nous a contraints à développer une nouvelle population de cartographie. Au cours de nos précédentes études de phénotypage, nous avons observé que le blé synthétique TA4152-19 montrait le même spectre de résistance que le blé synthétique M3. Ainsi, une population de 170 haploïdes doublés (HD) issus du croisement entre le blé synthétique TA4152-19 et l'accession ND495 (sensible à la septoriose) a été construite, phénotypée au stade plantule par trois souches de *Z. tritici* (IPO88018, IPO95036 et IPO02159) et génotypée avec 22 marqueurs SSR localisés sur le chromosome 3D. L'analyse QTL de ces données a mis en évidence la présence d'un QTL majeur expliquant jusqu'à 68% de la variabilité phénotypique et localisé au niveau du locus *Stb16q*. Ce travail a permis de montrer que le parent synthétique TA4152-19 portait vraisemblablement le gène *Stb16q*.

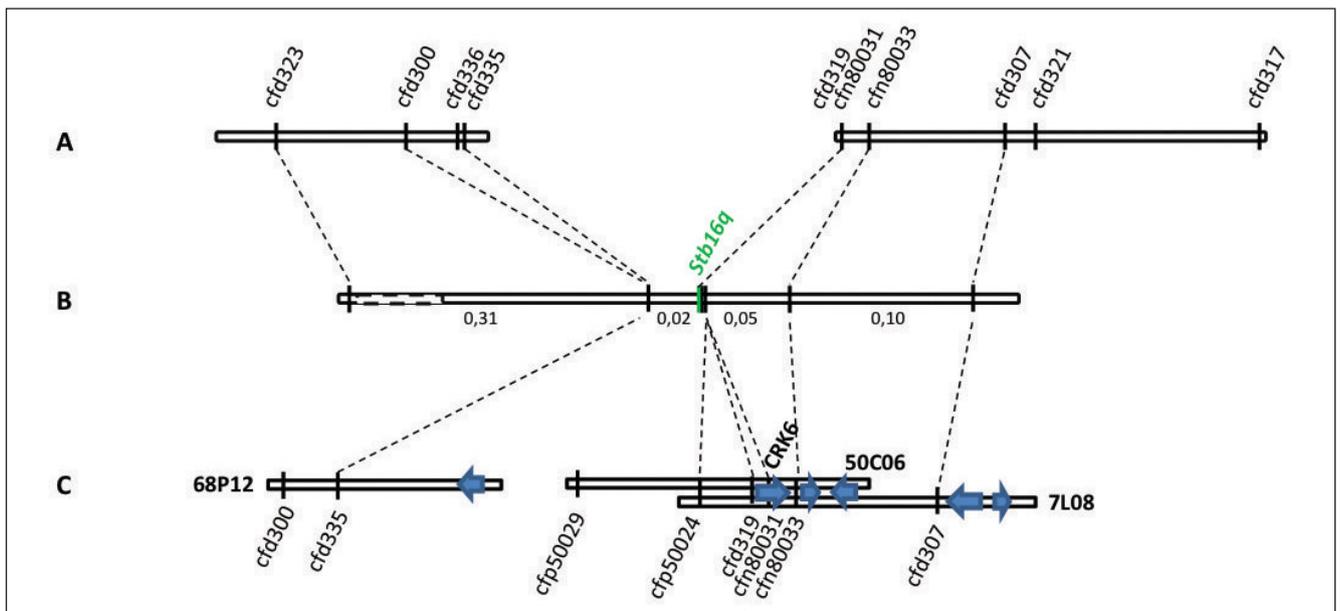
La densification du locus *Stb16q* en marqueurs s'est déroulée en plusieurs étapes. L'ensemble des 300 ESTs assignés au bin de délétion le plus distal du chromosome 3D (où se situe le gène *Stb16q*) a été utilisé pour dériver des marqueurs. Ceci a permis d'ajouter neuf nouveaux marqueurs sur la carte génétique dont deux fortement liés au locus *Stb16q* (Figure 1). Nous avons ensuite utilisé les cartes génétiques internationales de référence CsxRe et ITMI (Saintenac *et al.*, 2013) à très haute densité en marqueurs. Ces deux populations ont été génotypées avec les marqueurs Xbarc323 et Xcfd9 encadrant le locus *Stb16q*. Alors qu'aucun marqueur n'a été identifié sur la carte CsxRe dans l'intervalle Xbarc323/Xcfd9, un total de 42 SNPs a été retrouvé sur la carte ITMI. Les séquences contextes de ces 42 marqueurs

SNP, trop courtes pour définir des marqueurs SNP de type KASPar, ont permis d'identifier par analyse BLASTN un total de 10 scaffolds cartographiés génétiquement sur le bras long du chromosome 3D par Jia *et al.* 2013. L'étude de la carte physique d'*Aegilops tauschii* portant ces 10 scaffolds a révélé la présence de 16 scaffolds supplémentaires dans la région (Jia *et al.*, 2013). Ainsi, les 26 scaffolds ont été utilisés pour développer de nouveaux marqueurs de type SNP et SSR. Nous avons pu identifier 18 marqueurs SNP issus de Luo *et al.* 2013 (Luo *et al.*, 2013) et présents sur ces 26 scaffolds qui ont été transformés en marqueurs KASPar. Parmi eux, cinq ont été cartographiés génétiquement sur la population HD, les plus près se situant à 1,2 cM en position proximale et à 6.5 cM en position distal. En parallèle, un total de 15 marqueurs SSR (cfd300 à cfd314) a été développé à partir de la séquence de ces 26 scaffolds. Dix ont été cartographiés génétiquement et deux issus de deux scaffolds différents co-ségréguaient avec le gène *Stb16q*. Un nouveau set de 12 marqueurs SSR (cfd315 à cfd326) issus uniquement de ces deux scaffolds a été développé. Trois d'entre eux ont été cartographiés et montré comme totalement lié à *Stb16q*.

En conclusion, nous avons cartographié le gène *Stb16q* dans un intervalle de 1,9 cM et nous avons identifié 5 marqueurs SSR totalement liés à ce gène (Figure 1).



**Figure 1** : Cartographie génétique du locus *Stb16q* à partir de la population HD issue du croisement entre le blé synthétique TA4152-19 (*Stb16q*) et l'accession sensible ND495. Bleu = marqueurs SSR, vert = marqueurs SNP, violet = marqueurs dérivés d'EST et noir = marqueur présent sur les cartes génétiques de référence.



**Figure 2 :** Cartographie fine du locus *Stb16q*. A/ Carte physique développée par Jia et al. 2013 à partir d'*A. tauschii*. B/ carte génétique réalisée à partir de 2170 F2 issus du croisement entre TA4152-19 et ND495 (distances en cM). C/ carte physique développée lors de cette étude à partir de l'accension résistante TA4152-19, les flèches bleues indiquent les gènes identifiés par TriAnnot (Ref).

### Cartographie fine du gène *Stb16q*

La résolution de la population HD étant limitée, nous avons ensuite développé une population F2 de haute résolution issue du croisement entre le parent résistant TA4152-19 et l'accension sensible ND495. Lors de la première inoculation, 1680 plantes F2 ont été phénotypées. Seules les plantes présentant un phénotype totalement résistant (537) ou à l'inverse totalement sensible (129) ont été échantillonnées. Lors de la deuxième vague d'inoculation, 7420 F2 ont été phénotypées et 1504 ont été échantillonnées. Le génotypage des 2170 F2 avec les marqueurs *cfd323* et *cfd306* a permis d'identifier 87 individus présentant des événements de recombinaison entre ces deux marqueurs. Ces derniers ont été génotypés avec l'ensemble des marqueurs SSR identifiés comme co-ségrégant avec *Stb16q* lors de l'étude de la population HD.

Dans le même temps, deux nouveaux marqueurs SSR (*cfd335* et *cfd336*) et deux marqueurs SNP (*cfn80031* et *cfn80033*) ont été développés à partir des deux scaffolds de la carte physique d'*Aegilops tauschii* précédemment décrits. Cette approche nous a permis de réduire l'intervalle encadrant le gène *Stb16q* à 0,07 cM et d'identifier deux marqueurs (*cfd319* et *cfn80031*) totalement liés au gène (Figure 2).

### Carte physique du locus *Stb16q*

Pour construire la carte physique du locus *Stb16q*, une banque BAC a été développée à partir de l'accension TA4152-19 et criblée avec quatre marqueurs couvrant la région *Stb16q* (*cfd336*, *cfn80031*, *cfn80033* et *cfd307*). Ce premier crible a permis d'identifier deux clones BAC avec les marqueurs *cfd307*, *cfn80031* et *cfn80033*. Aucun BAC clone n'a été identifié avec le marqueur distal *cfd336*. Le plus long des deux BAC positifs (7L08, 150 kb) a été séquencé et annoté.

Une marche chromosomique a ensuite été initiée pour établir la carte physique complète du locus *Stb16q*. Quatre marqueurs SSR (*cfd337* à *cfd340*) et deux marqueurs ISBP (*cfp50023* et *cfp50024*) ont été développés à partir de l'extrémité distale du clone BAC 7L08. Les marqueurs *cfd337* et co-ségrégant avec le gène *Stb16q* ont été utilisés pour cribler à nouveau la banque BAC. Un clone BAC (50C06, 145 kb) a été identifié, séquencé et annoté. Trois nouveaux marqueurs SSR (*cfd341* à *cfd343*) et trois ISBP (*cfp50027* à *cfp50029*) ont été développés sur l'extrémité distale

de ce clone. Le marqueur *cfp50029* co-ségrégant avec le gène *Stb16q* a été utilisé pour cribler la banque BAC. Cependant, aucun nouveau clone BAC n'a été identifié. Nous avons réalisé une première augmentation de la couverture de notre banque BAC et criblé cette dernière avec les marqueurs *cfd336* et *cfp50029*. Un clone BAC (68P12) a été identifié avec le marqueur *cfd336* uniquement. Ce clone BAC a été séquencé et annoté mais il n'a pas permis de combler le trou présent dans la carte physique.

Une deuxième augmentation de couverture a été réalisée mais cela n'a pas permis d'identifier de clone BAC positif supplémentaire avec le marqueur *cfp50029* laissant ainsi un trou dans la carte physique. Dans les dernières étapes du projet, la nouvelle séquence de référence du blé étant disponible, nous avons identifié, grâce à l'ensemble des marqueurs liés au gène, une région de 7 Mb portant le locus *Stb16q* chez l'accension Chinese spring. Aucun gène supplémentaire n'a été identifié sur la séquence de référence du blé par rapport aux séquences provenant de l'accension résistante TA4152-19.

Ces données nous ont permis de délimiter l'intervalle *Stb16q* à deux gènes dont l'un ne possède aucun domaine protéique connu et l'autre code pour un récepteur à activité kinase riche en cystéine nommé *Crk6* (Figure 2).

### Validation fonctionnelle du gène *Crk6*

Une population de TILLING issue de l'accension TA4152-19 a été développée par traitement des grains à l'EMS. Dix plantes M2 pour chacune des 310 familles de la population ont été phénotypées et neuf ont été identifiées comme sensibles à *Z. tritici*. La partie codante de notre gène candidat (*Crk6*) a été re-séquencé chez ces neuf familles ainsi que 3 kb couvrant la partie promotrice du gène. Chez cinq la présence d'un nombre important de SNPs au sein du gène *Crk6* par rapport à la séquence du parent TA4152-19 suggère vraisemblablement une contamination de la population de mutants par des grains d'une autre accession. Parmi les quatre autres familles, nous avons identifié une présentant une mutation au sein du 5<sup>ème</sup> exon du gène *Crk6* et prédite comme délétère pour la fonction de la protéine. L'étude de plusieurs individus M2 appartenant à cette famille a montré que la mutation était totalement liée avec le phénotype de sensibilité suggérant l'implication de ce gène dans la résistance à la septoriose.

En parallèle, nous avons montré que l'introduction du gène *Crk6* par biolistique dans une variété de blé sensible confère la résistance à *Z. tritici*. Ces deux expériences nous ont permis de prouver que notre gène candidat était bien *Stb16q*.

### Développement de marqueurs diagnostics pour le gène *Stb16q* et étude de la distribution de ce gène

Dans un premier temps, l'ensemble des blés synthétiques a été génotypé avec les marqueurs *cfd319*, *cfn80031* et *cfn80033* fortement lié avec le gène *Stb16q* mais ces derniers n'étaient pas totalement diagnostics de *Stb16q*. Ainsi, le premier exon du gène *Stb16q* (852 bp) a été re-séquencé chez 184 accessions de blé, comprenant 96 blés synthétiques et 88 variétés de blés anciennes ou récentes. Au total, 14 haplotypes ont été identifiés mais seulement 3 chez les variétés de blé anciennes et récentes.

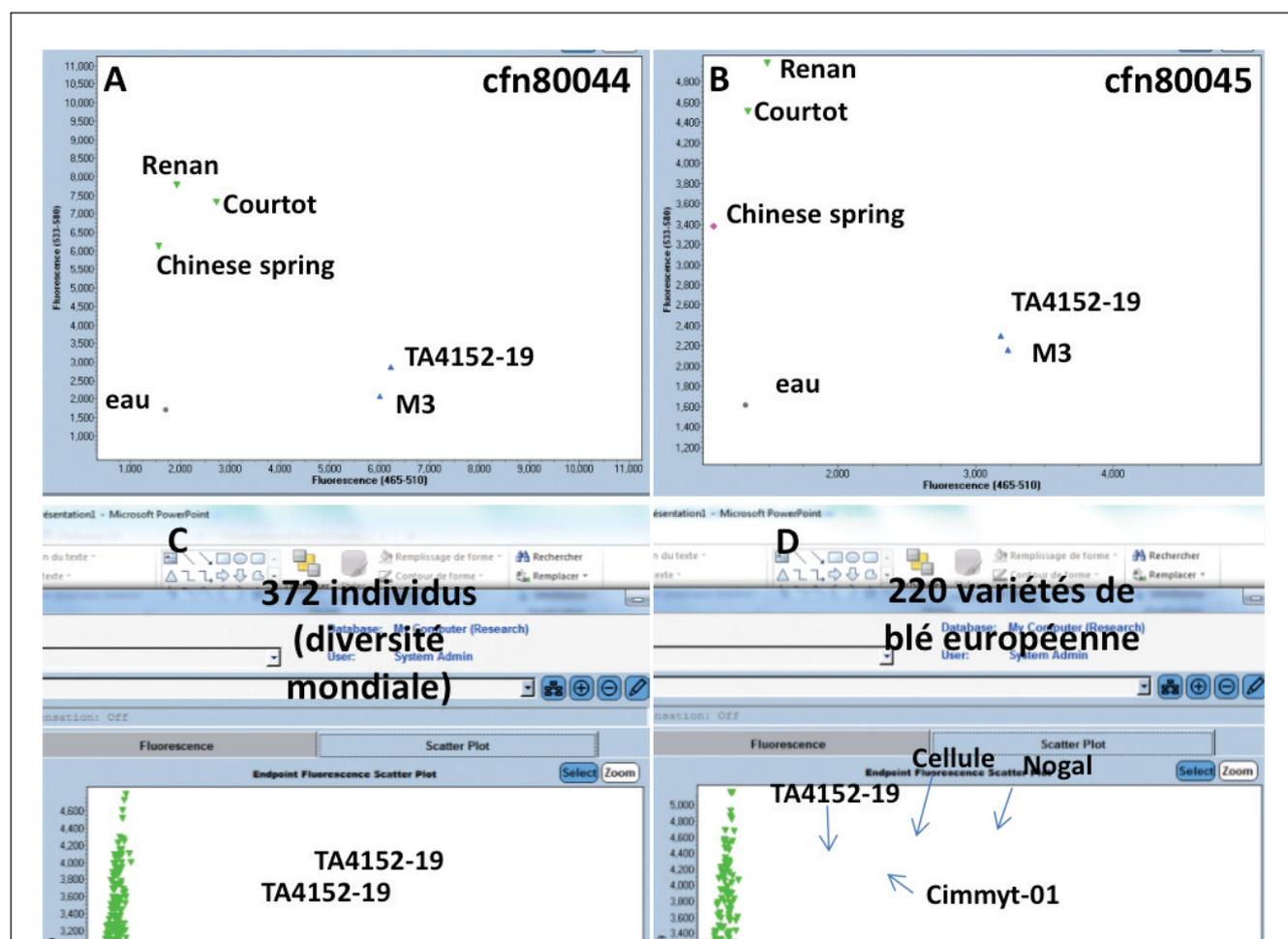
Sur la base de ces séquences, quatre marqueurs SNP KASPar ont été développés et testés sur les témoins portant l'allèle de résistance (TA4152-19, M3) ou l'allèle de sensibilité (Chinese Spring, Courtot et Renan). Deux marqueurs (*cfn80044* et *cfn80045*) ont permis de discriminer l'allèle résistant de l'allèle de sensibilité (Figure 3). Ces marqueurs ont ensuite été utilisés pour évaluer la présence du gène *Stb16q* au sein de la diversité du blé tendre. Ainsi, une core-collection de 372 accessions maximisant la diversité génétique mondiale (Balfourier *et al.*, 2007) et un panel de 220 variétés de blé européennes ont été génotypées. Parmi ces 592 accessions, le gène *Stb16q* a été

trouvé uniquement chez les variétés Cellule et Nogal et chez une accession issue du Cimmyt (Cimmyt-01, Figure 3).

### Recherche de nouvelles sources de résistance au sein d'un panel de blés synthétiques

Nous avons évalué la résistance de 76 blés synthétiques au stade plantule contre trois souches de *Z. tritici* possédant des virulences différentes (IPO92006, IPO9455, IPO9415). Les accessions résistantes ont ensuite été évaluées avec deux autres souches (IPO86036 et IPO2166). Parmi les accessions ne possédant pas le gène *Stb16q*, nous en avons identifié 17 totalement résistantes à plusieurs isolats (Tableau 1). Ces dernières représentent potentiellement des sources de résistance nouvelles intéressantes pour la sélection.

Les essais aux champs de cette collection de blés synthétiques n'ont pas donné les résultats escomptés et seul un essai inoculé avec la souche IPO9415 a permis d'évaluer la résistance des accessions contre cette souche. Cependant, l'ensemble des accessions se sont montrés sensibles (Tableau 1). Au cours de l'année 2016 la pression de maladies étant très fortes, il est difficile de dire si les résistances retrouvées au stade plantule ne se sont pas exprimées au stade adulte lors de cet essai ou si les résistances identifiées au stade plantule n'ont pas permis de conférer la résistance aux contaminations naturelles par d'autres souches de *Z. tritici* ou d'autres champignons nécrotrophes.



**Figure 3** : Identification de deux marqueurs diagnostics, *cfn80044* (A) et *cfn80045* (B) pour le gène *Stb16q*. Trois accessions sensibles (Chinese spring, Courtot, Renan) et les deux blés synthétiques (M3 et TA4152-19) portant le gène *Stb16q* ont été génotypés avec les deux marqueurs par la technologie KASP. Le marqueur *cfn80044* a ensuite été utilisé pour évaluer la présence de *Stb16q* au sein de la diversité mondiale (C) et des variétés de blé européennes (D).

Accessions	Stade plantule					Commentaires	Stade adulte
	IPO9415	IPO9455	IPO92006	IPO83036	IPO2166		
ELITE95-2	R?	0	13	-	-		10
ELITE95-3	-	0	0	0	0		10
ELITE95-4	R?	43	3	-	-		8
ELITE95-5	-	0	0	0	0		8
ELITE95-8	S	0	60	-	-		9
ELITE95-10	-	0	0	-	-		3.5
ELITE95-11	-	0	0	0	0	R plantule (sans Stb16q)	5
ELITE95-12	-	0	0	-	-		7
ELITE95-13	-	0	0	20	0		9
ELITE95-15	-	23	7	80	57		7
ELITE95-22	S	0	0	-	-		5
ELITE95-23	-	31	0	-	-		5
ELITE95-24	R?	0	0	-	-		4
ELITE95-30	-	0	0	-	-		9
ELITE95-32	-	0	0	0	0	R plantule (sans Stb16q)	10
ELITE95-33	R	0	0	0	0	R plantule (sans Stb16q)	5
ELITE95-35	-	0	20	-	-		9
ELITE95-36	-	1	47	-	-		10
ELITE95-37	-	0	0	0	0		10
ELITE95-42	-	0	8	-	-		10
ELITE95-45	R	0	0	0	-	R plantule (sans Stb16q)	9
ELITE95-47	R	0	0	-	-	Nécrose importante avec IPO92006	6
ELITE95-49	R?	0	1	-	-		8
ELITE95-51	-	10	2	-	-		7
ELITE95-52	-	0	0	43	0		7
ELITE95-54	-	0	0	0	0		6
ELITE95-55	-	2	43	-	-		8
ELITE95-56	R	0	0	0	0	R plantule (sans Stb16q)	4
ELITE95-59	-	0	0	-	-		9
ELITE95-62	R	0	0	0	0		9
ELITE95-63	-	0	0	0	0		9
ELITE95-64	-	0	0	0	-	R plantule (sans Stb16q)	8
ELITE95-66	-	0	0	-	-		8
ELITE95-67	R	0	0	-	-		5
ELITE95-71	R	0	0	0	0	R plantule (sans Stb16q)	6
ELITE95-78	-	0	0	0	0	R plantule (sans Stb16q)	4
ELITE95-79	-	0	2	-	-		10
ELITE95-83	R	0	0	0	0	R plantule (sans Stb16q)	5
ELITE95-90	-	0	0	-	-		7
ELITE95-91	-	0	30	-	-		9
ELITE95-92	R	0	20	0	0		8
ELITE95-93	-	63	47	-	-		10
ELITE95-95	-	0	0	0	0	R plantule (sans Stb16q)	6
ELITEII-2	-	52	15	-	-		10
ELITEII-9	-	42	43	-	-		9
ELITEII-12	-	0	10	-	-		6
ELITEII-13	-	0	0	0	0		7
ELITEII-16	-	0	0	20	0		10
ELITEII-19	-	3	0	0	0		4
ELITEII-20	-	0	0	-	-		4
ELITEII-21	-	0	0	0	0	R plantule (sans Stb16q)	7
ELITEII-22	R	0	0	0	0	R plantule (sans Stb16q)	6
ELITEII-23	R	0	0	0	0	R plantule (sans Stb16q)	5
ELITEII-26	-	0	0	0	0	R plantule (sans Stb16q)	7
ELITEII-27	-	0	0	0	0	R plantule (sans Stb16q)	8
ELITEII-28	-	0	0	0	0		6
ELITEII-30	R	0	0	0	0		7
ELITEII-31	-	0	0	2	0		9
ELITEII-33	-	13	20	0	20		9
ENTRY-1	-	50	85	-	-		10
ENTRY-2	-	0	0	0	0		5
ENTRY-4	-	2	67	0	70		10
ENTRY-21	-	0	10	-	-		9
ENTRY-24	-	0	0	0	0	R plantule (sans Stb16q)	8
ENTRY-27	-	0	67	-	-		9
ENTRY-36	-	0	0	-	-		9
ENTRY-40	-	0	27	-	-		6
ENTRY-61	-	0	0	0	0	R plantule (sans Stb16q)	6
ENTRY-71	R	0	0	-	-		7
ENTRY-72	R?	0	0	-	-		7
ENTRY-73	-	0	17	-	-		10
ENTRY-74	-	6	65	-	-		10
ENTRY-75	-	0	37	-	-		10
ENTRY-85	-	0	4	-	-		5
ENTRY-91	-	0	0	0	2		6
ENTRY-95	S?	25	17	-	-		8
TA4152-19	-	0	0	0	0		-
M3	-	0	0	0	0		-
Cs	-	77	90	97	30		-
Riband	-	73	0	-	-		-
Obelisk	-	83	42	-	-		-
ND495	-	67	82	-	-		-
Taichung	-	83	87	77	73		-

Tableau 1 : Evaluation d'un panel de 76 blés synthétiques pour leur résistance à la septoriose. Seules les dernières notes de phénotypage au stade adulte sont présentées.

## 4. Conclusions

L'objectif initial de ce projet était la cartographie fine du gène *Stb16q* en vue de son clonage. Les compétences complémentaires des différents partenaires réunis dans ce projet ont permis d'aller plus loin que l'objectif initial est ainsi d'identifier pour la première fois un gène majeur de résistance large spectre à la septoriose. Ce résultat résulte d'un phénotypage à très large échelle, d'une densification rapide en marqueurs possible grâce aux nouveaux outils de génomiques et à l'utilisation d'outils de validation pertinents. Ce clonage a permis, suite au re-séquençage de *Stb16q* chez 184 accessions de blé, de développer deux marqueurs diagnostics qui seront un atout majeur pour suivre ce gène dans les programmes de sélection et pour créer les variétés de demain.

Le deuxième objectif était l'identification de nouvelles sources de résistance à la septoriose à travers l'étude d'un panel de blés synthétiques. Suite au phénotypage de ce panel par cinq souches de *Z. tritici*, nous avons identifiés 17 accessions totalement résistantes qui représentent potentiellement un renouveau en sources de résistance à la septoriose pour les nouvelles variétés de blé françaises.

## Références bibliographiques

- Arraiano, L.S., and Brown, J.K.M. (2006). Identification of isolate-specific and partial resistance to septoria tritici blotch in 238 European wheat cultivars and breeding lines. *Plant Pathol.* 55, 726-738.
- Balfourier, F., Roussel, V., Strelchenko, P., Exbrayat-Vinson, F., Sourdille, P., Boutet, G., Koenig, J., Ravel, C., Mitrofanova, O., Beckert, M., *et al.* (2007). A worldwide bread wheat core collection arrayed in a 384-well plate. *Theor. Appl. Genet.* 114, 1265-1275.
- Brading, P.A., Verstappen, E.C.P., Kema, G.H.J., and Brown, J.K.M. (2002). A Gene-for-Gene Relationship Between Wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the Septoria Tritici Blotch Pathogen. *Phytopathology* 92, 439-445.
- Brown, J.K.M., Chartrain, L., Lasserre-Zuber, P., and Sainenac, C. (2015). Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genet. Biol.* 79, 33-41.
- Gonthier, L., Bellec, A., Blassiau, C., Prat, E., Helmstetter, N., Rambaud, C., Huss, B., Hendriks, T., Bergès, H., and Quillet, M.-C. (2010). Construction and characterization of two BAC libraries representing a deep-coverage of the genome of chicory (*Cichorium intybus* L., Asteraceae). *BMC Res. Notes* 3, 225.
- Jia, J., Zhao, S., Kong, X., Li, Y., Zhao, G., He, W., Appels, R., Pfeifer, M., Tao, Y., Zhang, X., *et al.* (2013). *Aegilops tauschii* draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation. *Nature* 496, 91-95.
- Kollers, S., Rodemann, B., Ling, J., Korzun, V., Ebmeyer, E., Argillier, O., Hinze, M., Plieske, J., Kulosa, D., Ganai, M.W., *et al.* (2013). Genetic architecture of resistance to Septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in European winter wheat. *Mol. Breed.* 32, 411-423.
- Leroy, P., Guilhot, N., Sakai, H., Bernard, A., Choulet, F., Theil, S., Reboux, S., Amano, N., Flutre, T., Pelegri, C., *et al.* (2012). TriAnnot: A Versatile and High Performance Pipeline for the Automated Annotation of Plant Genomes. *Front. Plant Sci.* 3.
- Luo, M.-C., Gu, Y.Q., You, F.M., Deal, K.R., Ma, Y., Hu, Y., Huo, N., Wang, Y., Wang, J., Chen, S., *et al.* (2013). A 4-gigabase physical map unlocks the structure and evolution of the complex genome of *Aegilops tauschii*, the wheat D-genome progenitor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 7940-7945.
- Miedaner, T., Zhao, Y., Gowda, M., Longin, C.F.H., Korzun, V., Ebmeyer, E., Kazman, E., and Reif, J.C. (2013). Genetic architecture of resistance to Septoria tritici blotch in European wheat. *BMC Genomics* 14, 858.
- Peterson, D.G., Tomkins, J.P., Frisch, D.A., Wing, R.A. and Paterson, A.H. (2000) Construction of plant bacterial artificial chromosome (BAC) libraries: an illustrated guide. *Journal of Agricultural Genomics*, 5, 1-100.
- Sainenac, C., Falque, M., Martin, O.C., Paux, E., Feuillet, C., and Sourdille, P. (2008). Detailed Recombination Studies Along Chromosome 3B Provide New Insights on Crossover Distribution in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics* 181, 393-403.
- Sainenac, C., Jiang, D., Wang, S., and Akhunov, E. (2013). Sequence-Based Mapping of the Polyploid Wheat Genome. *G3amp58 GenesGenomesGenetics* 3, 1105-1114.
- Tabib Ghaffary, S.M., Faris, J.D., Friesen, T.L., Visser, R.G.F., van der Lee, T.A.J., Robert, O., and Kema, G.H.J. (2012). New broad-spectrum resistance to septoria tritici blotch derived from synthetic hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 124, 125-142.