



Fonds de soutien à l'Obtention Végétale

RenKSeq : Développement d'un outil innovant de criblage de gènes à haut débit pour identifier rapidement de nouveaux gènes de résistance à la septoriose

Olivier Robert *¹, David Lopez², Andrea Garavito², Aurélie Evrard*¹, Ellen Goudemand-Dugue*¹, Lamia Aouini³, Els Verstappen³, Burkhard Steuernagel⁴, Delphine Hourcade Marcolla⁵, Brande Wulff⁴, Justin Faris⁶, Gert Kema³, Cyrille Saintenac²

1 - FLORIMOND DESPREZ VEUVE & FILS, 59242 Cappelle-en-Pévèle, France
2 - INRAE GDEC, UMR 1095, 5 chemin de Beaulieu 63100 Clermont-Ferrand, France
3 - Wageningen University and Research (Wageningen Plant Research, Biointeractions and Plant Health), PO Box 16, 6700AA, Wageningen, The Netherlands
4 - JOHN INNES CENTRE, Colney Lane - NR4 7UH Norwich, UK
5 - ARVALIS - INSTITUT DU VEGETAL, 3 rue Joseph et Marie Hacquin-75116 PARIS, France
6 - United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service, Cereal Crops Research Unit, Edward T. Schafer Agricultural Research Center, Fargo, ND, 58102, USA
*Coordinateur : Ellen Goudemand-Dugue, Ellen.GOUDEMAND-DUGUE@florimond-desprez.fr

Résumé: Le projet avait pour objectif de mettre au point une stratégie innovante pour accélérer le clonage de nouveaux gènes de résistance à la septoriose et fournir un ensemble de marqueurs diagnostiques associés à ces gènes. Cette stratégie basée sur l'approche MutRenSeq (Figure 1) développée pour le clonage de gènes de résistance à la rouille se focalisaient sur les gènes de type récepteurs kinase ou RLK, une famille de gènes impliquée dans la résistance à la septoriose. Le projet a permis de développer un essai de capture des gènes de type RLK chez le blé afin de mieux comprendre leur diversité dans les variétés. Bien que la stratégie développée ait été validée pour le clonage du gène *Stb6*, celle-ci n'a pas permis le clonage de nouveaux gènes de résistance. Ce projet a cependant permis l'identification de mutants sensibles, une ressource indispensable pour l'identification de gènes de résistance et également l'identification de nouveaux QTL de résistance à la septoriose chez la variété résistante Pocho.

Introduction: La septoriose est l'une des maladies les plus dommageables pour la culture du blé en France. Chaque année, les pertes sont estimées entre 350 et 700 millions d'euros pour la France. Seulement 22 gènes majeurs de résistance et 89 méta-QTL ont été cartographiés génétiquement (Brown et al., 2015). Même si certains comme *Stb4*, *Stb9*, *Stb11*, *Stb18* ont été identifiés dans des variétés Françaises, il existe encore peu de connaissances sur la présence de ces gènes au sein des variétés françaises et très peu de marqueurs diagnostiques. L'identification des gènes *Stb6* et *Stb16q* comme des RLK suggère que cette grande famille a un rôle prépondérant dans la résistance du blé vis-à-vis de la septoriose. L'analyse de cette grande famille pourrait permettre de mieux connaître leur diversité et également faciliter le clonage de nouveaux gènes de résistance et l'identification de marqueurs.

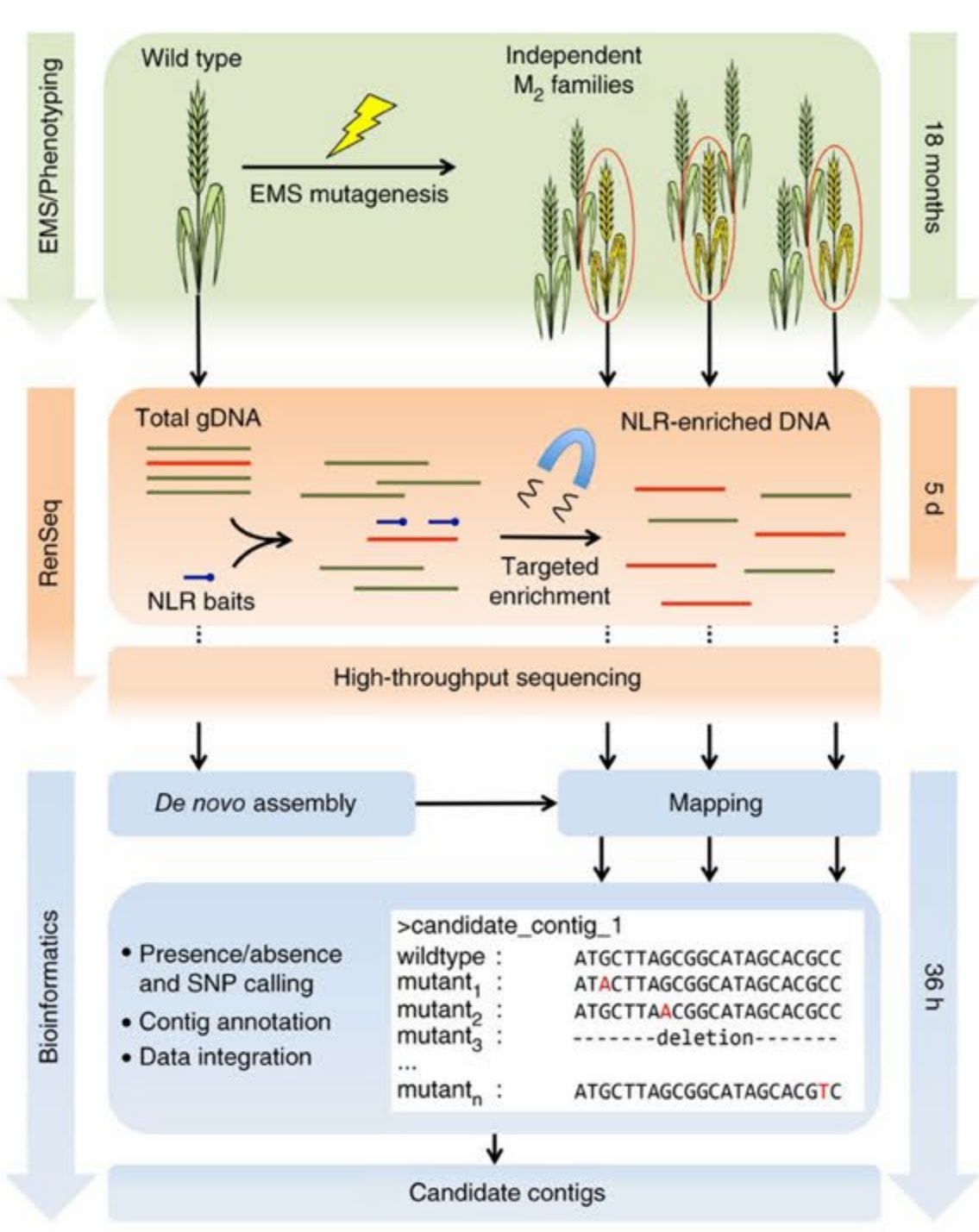


Figure 1: Stratégie MutRenSeq (Steuernagel et al. 2016)

WP1 - Développement d'un outil de capture des gènes RLK

Afin d'être le plus exhaustif, 16 génomes de blé ont été utilisés pour rechercher les gènes de type RLK, soit en utilisant les RLK annotés par la communauté, soit en utilisant le pipeline présenté dans la figure 2. Cette analyse a permis l'identification d'un total de 45 290 RLK (Table 1) à partir desquels un design de 199 733 séquences appâts a été réalisé en collaboration avec la société Daicel Arbor.

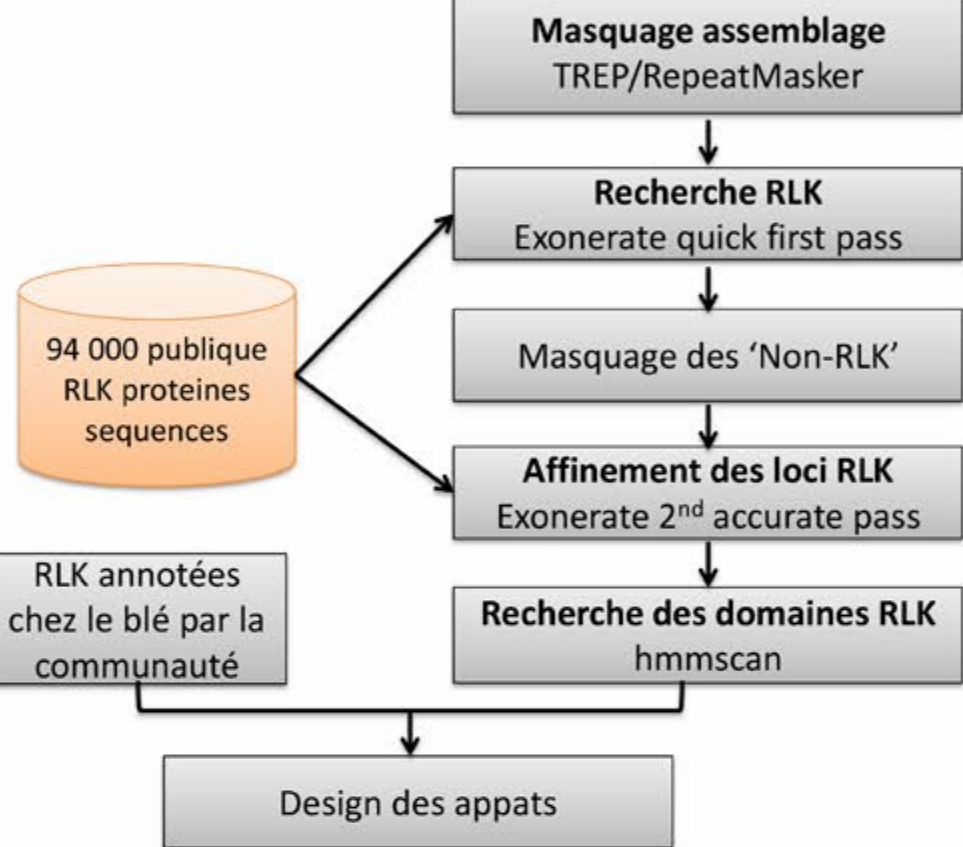


Figure 2: Pipeline bioinformatique utilisé pour l'identification des RLK chez le blé

Assembly	Assembly size (pb)	RLK loci (pb)	RLK Loci
Chinese Spring IWGSC	14 347 605 634	23 254 210	6 445
Chinese Spring Earham Institute	13 467 630 192	23 714 007	4 862
Zavitan	10 509 868 245	20 489 051	2 584
Cadenza	13 399 781 746	22 244 268	5 362
Clare	14 616 451 647	21 707 537	5 357
Kronos	10 540 467 196	14 940 058	3 706
Paragon	15 318 048 945	22 432 660	5 431
Robigus	14 791 409 785	21 874 636	5 281
Svevo	6 803 298 213	8 350 510	2 444
TGAC_WGS_durum_v1	3 386 481 085	458 483	426
TGAC_WGS_monococcum_v1	1 322 112 030	574 717	417
TGAC_WGS_spekkodes_v1	1 907 878 214	552 288	426
TGAC_WGS_strongfield_v1	3 384 841 931	361 995	387
TGAC_WGS_tauschi_v1	1 200 221 237	665 015	441
TGAC_WGS_urartu_v1	1 657 029 501	686 599	445
TSL_WGS_sharonensis_v1	1 730 899 803	611 984	445
Bibliography sequences		2 286 202	831
Total	128 Gb	185 Mb	45 290

Table 1: RLK identifié pour chacun des 16 génomes étudiés

WP2 – Développement et phénotypage de 5 populations de tilling réalisées à partir d'accessions résistantes

- L'accession d'origine sud-américaine Pocho qui présente un large spectre de résistance à *Zymoseptoria tritici* (911 M₂, 9 familles sensibles, Figure 3)
- L'accession de blé synthétique M6 qui porte le gène majeur *Stb8*. (513 M₂, 0 sensible)
- Une lignée recombinante BG301 qui porte le gène de résistance à *Parastagonospora nodorum* Snn2. (478 M₂, 7 familles sensibles)
- L'accession de blé dur (*Triticum dicoccum*) PI41025 portant un gène majeur de résistance à *Z. tritici* sur le chromosome 3A. (803 M₂, 0 sensible)
- L'accession Cadenza portant le gène de résistance *Stb6*. (1200 M₅, 7 familles sensibles)

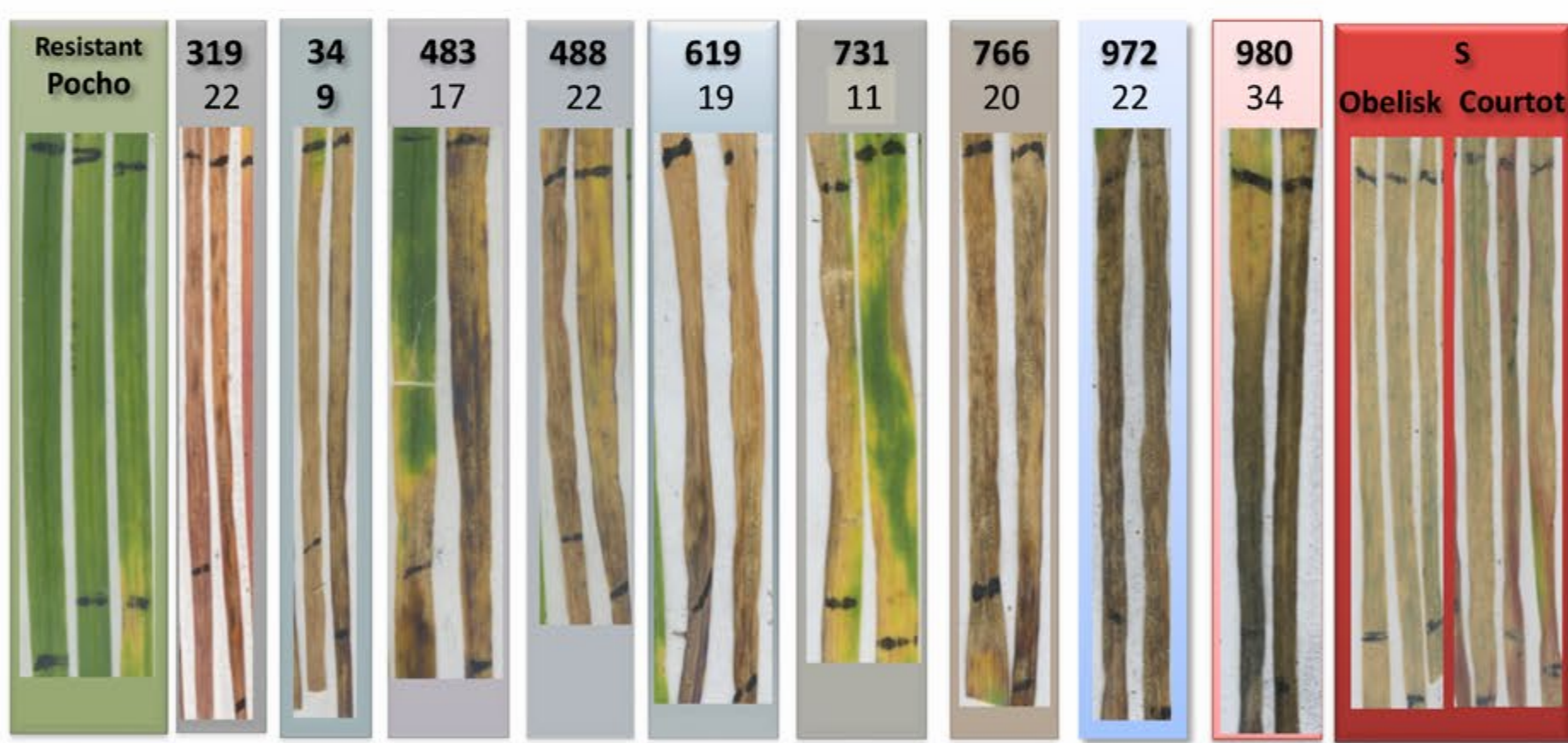


Figure 3: Phénotypes des 9 plantes M₂ issues de la population de tilling Pocho à 21 dpi après inoculation avec une souche avrulente.

WP3 – Identification des gènes de résistance présent dans les accessions d'intérêt

L'essai de capture des RLK (WP1) a été utilisé pour séquencer les RLK des 23 familles sensibles identifiées dans le WP2 ainsi que les parents de ces populations. L'ensemble des mutations présentes dans ces RLK a été identifié ainsi que les RLK portant une mutation dans plusieurs familles sensibles de la même population par le pipeline MutantHunter. Cette analyse a permis d'identifier un seul contig portant sept mutations, une par famille sensibles et issues de la population Cadenza. Ce contig porte le gène *Stb6*, ce qui a permis de valider la stratégie de clonage. Cependant, aucun gène portant une mutation pour l'ensemble des familles sensibles pour les populations Pocho ou BG301 n'a été identifié. Certaines optimisations sont encore nécessaires pour lever les difficultés liées à l'étude d'une des plus grandes familles multigéniques du blé et pallier à ce manque d'efficacité. En parallèle, une approche d'analyse QTL sur une population RIL issue de Pocho a permis d'identifier 5 QTL (2A, 3A, 5B, 7B et 7D) impliqués dans la résistance suite au phénotypage avec trois isolats de *Z. tritici* génétiquement différents (Figure 4).

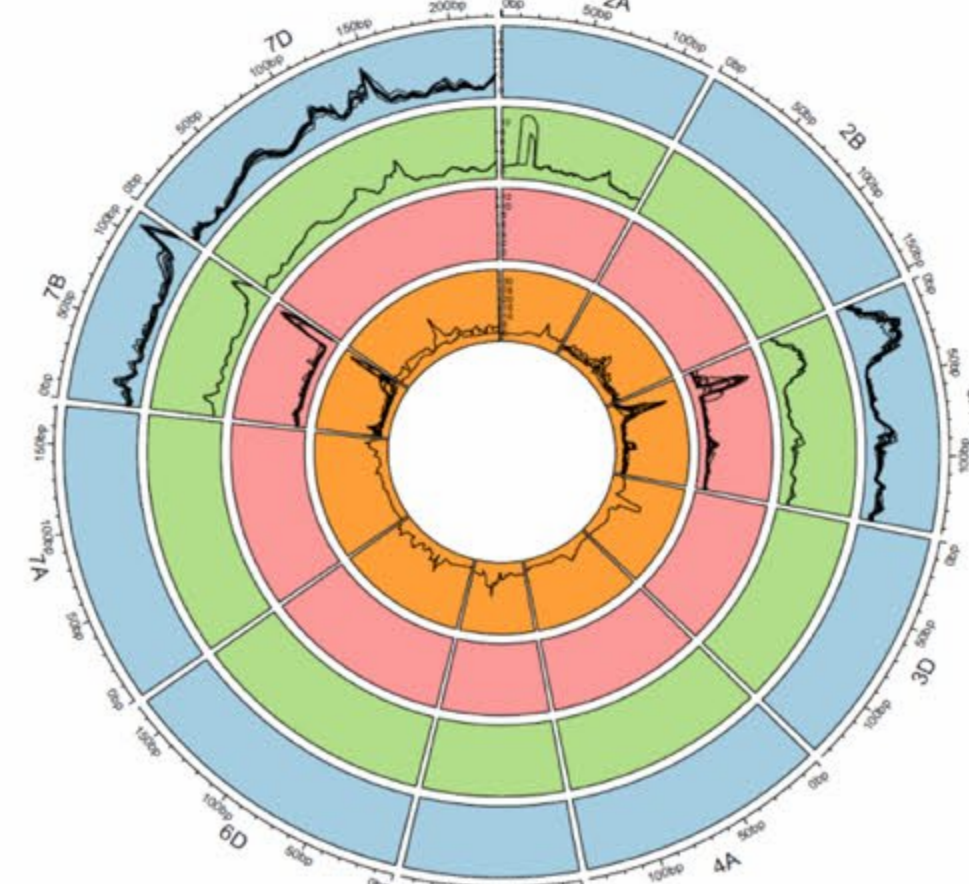


Figure 4: Représentation de deux QTL de résistance sur le chromosome 3A et 7B identifiés chez l'accession Pocho suite au phénotypage avec l'isolat IPO9415.

