

# MOSAIC : Développement d'outils phénotypique et génotypique pour améliorer la sélection de la résistance du blé dur à deux virus des mosaïques du blé

Ellen GOUDEMAND-DUGUE<sup>1\*</sup>, Michael COCHARD<sup>1</sup>, Dragan PEROVIC<sup>2</sup>, Ute KASTIRR<sup>2</sup>, Delphine HOURCADE<sup>3</sup>, Michel BONNEFOY<sup>3</sup>, Jacques DAVID<sup>4</sup>, Valentin RIBAUT<sup>4</sup>, Lucas MATHIEU<sup>4</sup>, Veronique VIADER<sup>4</sup>, Brande WULFF<sup>5</sup>, Ruth BRYANT<sup>6</sup>, Thierry Lefevre<sup>6</sup>, Cyrille SAINTENAC<sup>7</sup>, Roberto TUBEROSA<sup>8</sup>, Matteo BOZZOLI<sup>8</sup>, Marco MACCAFERRI<sup>8</sup>

1 - FLORIMOND DESPREZ VEUVE & FILS, 59242 Cappelle-en-Pévèle, France

2 - THE JULIUS KUHN-INSTITUT, Erwin-Baur-Str. 17 - 06484 Quedlinburg, Germany

3 - ARVALIS - INSTITUT DU VEGETAL, 3 rue Joseph et Marie Hacquin-75116 PARIS, France

4 - INSTITUT NATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES AGRONOMIQUES DE MONTPELLIER, 2 place Viala - 34060 Montpellier Cedex 2, France

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

6 - RAGT 2n, rue Emile SINGLA, Site de Bourran - B.P. 3336, 12033 RODEZ Cedex 09, France

7 - INRAE GDEC, UMR 1095, 5 chemin de Beaulieu 63100 Clermont-Ferrand, France

8 - UNIVERSITA' DI BOLOGNA - DEPARTMENT OF AGRICULTURAL SCIENCES, Viale Fanin 44 - 40127 Bologna (BO), Italy

\***Coordonateur** : Ellen GOUDEMAND-DUGUE, ellen.goudemand@florimond-desprez.fr

## 1 Introduction

Le Virus de la Mosaïque des céréales (SBCMV) a été identifié et défini pour la première fois en Italie en 1960. Il s'est propagé dans toute l'Europe, dont la France ensuite (Canova and Quaglia, 1960 ; Clover *et al.*, 1999). Le Virus de la Mosaïque des stries en fuseaux du blé (WSSMV) est présent partout dans le monde dans les régions cultivant du blé. WSSMV a été détecté dans des régions aux climats tempéré et tropical comme le Canada, la France, l'Allemagne, l'Inde, l'Italie, le Japon, les Etats-Unis et la Zambie (Clover *et al.*, 1999). SBCMV et WSSMV peuvent causer des pertes de rendement pouvant atteindre 50 à 70 % chez les variétés les plus sensibles de blés durs et tendres en France et en Italie (Budge and Henry, 2002 ; Rubies-Autonell *et al.*, 2003). Du fait de la nature persistante de ces virus dans le sol, le seul moyen pratique et économique de contrôler l'infection est l'utilisation de variétés résistantes. Des études sur la résistance des variétés aux virus de la mosaïque ont été menées depuis plusieurs années en évaluant les performances agronomiques sur des sols contaminés (Budge and Henry, 2002 ; Rubies-Autonell *et al.*, 2003). De telles expérimentations ont abouti à identifier du germplasm résistant utilisable en sélection.

Les virus SBCMV (genre Furovirus) et WSSMV (genre Bymovirus) sont transmis par un champignon du sol appelé *Polymyxa graminis*. Les spores virulifères peuvent survivre dans le sol plus de 10 ans (Richard-Molard, 1985) et germer quand les conditions environnementales deviennent favorables en relâchant des zoospores primaires. De nombreuses études ont étudié la résistance génétique au virus SBCMV mais les résultats sont assez variables, attribuant le contrôle génétique de la résistance à un, deux ou même trois gènes (Nakagawa *et al.*, 1959 ; Modawi *et al.*, 1982 ; Barbosa *et al.*, 2001). Les infections mélangées de SBCMV et WSSMV au champ ne sont pas distinguées facilement puisque les symptômes sont globalement similaires. Malgré la distinction difficile, les infections mixées sont connues pour être présentes partout dans le monde (Hariri *et al.*, 1987 ; Kendall and Lommel, 1988 ; Chen, 1993).

### ► Phénotypage et quantification du virus

Les symptômes d'infection virale chez le blé varient du vert pâle à la couleur jaune sur les feuilles et les gaines, avec des retards de croissance modérés à graves. L'évaluation de la résistance de la plante peut être réalisée par une évaluation visuelle des symptômes, ou par une quantification du virus dans la plante par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) (Hunger and Sherwood 1985). La PCR en temps réel est 1000 fois plus sensible que l'ELISA pour la quantification de SBCMV (Ratti *et al.*, 2004).

Kanyuka *et al.* (2004) ont démontré que les génotypes de blé peuvent être testés efficacement pour leur résistance à SBCMV en conditions contrôlées en utilisant du sol naturellement contaminé par *Polymyxa graminis*. Cette technique pourrait permettre d'améliorer la rapidité et l'efficacité de sélection de variétés de blé résistantes à SBCMV et WSSMV.

### ► Déterminisme génétique de la résistance

Chez le blé dur, des études ont été réalisées afin de connaître le comportement d'un large panel d'individus vis-à-vis de leur résistance à SBCMV (Vallega *et al.* 1999 ; Ratti *et al.* 2006 ; Rubies-Autonell *et al.* 2008). Un gène majeur a été localisé sur le chromosome 2B et il a été récemment confirmé dans une population en ségrégation (Ratti *et al.* 2009 ; Maccaferri *et al.* 2011).

Chez le blé tendre, l'analyse de la résistance au furovirus a permis d'identifier jusqu'à 3 loci majeurs (Shaalán *et al.* 1966 ; Dubey *et al.* 1970 ; Modawi *et al.* 1982 ; Merkle and Smith 1983 ; Barbosa *et al.* 2001 ; Bass *et al.* 2006). *Sbm1* est localisé sur le chromosome 5D et est efficace contre SBCMV en Amérique du Nord (Narasimhamoorthy *et al.* 2006) et en Europe (Bass *et al.* 2006). Le même QTL majeur *QSbm.uga-5DL* a été identifié dans tous les environnements avec de forts LOD scores, expliquant jusqu'à 65 % de la variabilité phénotypique dans les populations PR61/A2000 et A2020/LA. La localisation de la résistance *QSbm.uga-5DL* coïncide avec des gènes précédemment publiés *Sbm1*, *Sbm<sub>Claire</sub>* and *Sbm<sub>Trémie</sub>* sur le bras long du chromosome 5D (Perovic *et al.*, 2009).



Ce QTL est lié aux marqueurs flanquants Xbarc177 et Xbarc161 (Hao *et al.* 2012).

Le locus *Sbm2* a été identifié par Bayles *et al.* (2007) comme l'un des deux QTL majeurs de résistance à SBCMV dans la population de cartographie Avalon/Cadenza (avec *Sbm1*). *QSbm.ubo-2BS* détecté dans le cultivar Meridiano de blé dur, identique à *Sbm2*, est situé à proximité du marqueur DArT wPt-2106 (Maccaferri *et al.* 2011). En se basant sur une analyse combinée de 2 populations, Meridiano x Claudio et Simeto x Levante, *Sbm2* a été plus finement localisé dans un intervalle de 2.6 cM défini par les marqueurs SSR (wmc661-gwm210-barc35, côté distal) et wPt-2106 (côté proximal). L'intérêt de ces marqueurs a été confirmé dans une étude réalisée sur une collection de blé dur élite (Maccaferri *et al.* 2012).

Concernant la résistance à WSSMV, un QTL majeur a été détecté sur le chromosome 2D (Khan *et al.*, 2000). Le cultivar Soldur et la lignée Dic2 sont deux nouvelles sources de résistance contre ce virus.

Ce projet vise donc à offrir plusieurs solutions au sélectionneur afin de lui permettre de sélectionner plus rapidement et plus efficacement des variétés résistantes aux deux virus de la mosaïque du blé dur :

- Le projet a pour objectif principal de mettre au point un test de résistance à ces deux virus en conditions contrôlées. Une fois ce test au point, le sélectionneur pourra sélectionner son matériel de manière plus efficace car l'expression de la maladie est difficile à maîtriser au champ. Elle n'est pas présente de façon homogène au sein d'un même champ ce qui ne permet pas une évaluation non-biaisé des individus.
- Le projet améliorera également la localisation des régions chromosomiques (QTL) de la lignée de blé dur « Dic2 » impliquées dans la résistance à SBCMV et WSSMV. Des marqueurs Kaspar liés à ces QTL seront développés pour rendre ces QTL plus facilement utilisables en sélection.
- Enfin, le projet propose d'identifier des marqueurs moléculaires étroitement liés au gène *Sbm2* de résistance à SBCMV dans la variété de blé dur « Meridiano » par une approche de cartographie fine. Les marqueurs du gène seront validés sur des variétés de blé dur et de blé tendre connues pour porter ou non le gène *Sbm2*. Grâce à ces marqueurs moléculaires liés à *Sbm2*, le sélectionneur pourra facilement utiliser le gène *Sbm2* en sélection et produire de nouvelles variétés de blé tendre et de blé dur plus résistantes au SBCMV.

## 2 WPI - Développement d'un outil phénotypique en conditions contrôlées

### ► Matériel utilisé (sol, plantes)

Pendant les 3 ans du projet, des sols infectés ont été prélevés sur un total de 12 champs originaires de 4 pays différents en 26 prélèvements (Italie : 1 champ / 4 prélèvements ; France : 5 champs / 10 prélèvements ; Allemagne : 4 champs / 10 prélèvements ; Angleterre : champs / 2 prélèvements). Ces sols ont été utilisés pour les expérimentations en serre et en chambre de culture au JKI à Quedlinburg en Allemagne.

Sur les 26 prélèvements de sol effectués, des analyses des propriétés physiques et chimiques (pH, concentrations en P, K, Mg, N et Zn) ont été réalisées sur 22 d'entre eux (Tableau I).

	Fine fraction	pH value	PC <sub>CAL</sub>	K <sub>CAL</sub>	Mg	Nt	Zn
Field / Country	%	value	mg/100g air-dried soil			% air-dried soil	mg/kg air-dried soil
Vatan (F)	35	7.5	7.0	16	6.2	0.20	6.3
	37	7.5	4.7	15	5.2	0.17	3.9
Bologna (I)	37	7.0	11.1	20	11.9	0.14	2.6
	40	7.4	10.8	23	10.1	0.14	2.1
	39	6.7	6.6	26	18.1	0.13	1.7
	39	6.9	10.1	26	12.5	NA	1.8
Chambon (F)	29	6.5	9.2	26	17.2	0.13	1.1
Pray (F)	30	5.3	6.6	20	8.9	0.11	2.0
	30	5.0	5.7	17	8.3	0.10	1.3
Westerrade (G)	11	6.6	5.2	14	13.1	0.07	2.9
	17	6.1	7.1	22	15.1	0.12	4.1
	19	6.4	8.2	22	14.8	0.10	4.2
Heddesheim (G)	30	6.9	10.1	37	14.7	0.13	3.3
	28	6.0	6.2	26	11.8	0.09	2.6
Harpenden (GB)	26	6.5	19.0	24	4.9	0.18	8.0
	26	6.7	19.3	18	7.6	0.17	8.1
	41	6.7	9.4	11	11.0	0.27	4.5
	41	7.0	9.4	8	12.0	0.27	5.1
Hüner (G)	6	5.6	10.7	11	6.3	0.14	11.7
	4	5.2	6.5	5	3.0	0.07	7.9
Ehdeben (G)	37	5.5	7.5	41	18.5	0.22	3.4
	41	5.7	3.7	45	19.2	0.21	4.3

**Tableau I :** Propriétés physiques et chimiques des échantillons de sol prélevé.

Ces échantillons de sol ont été analysés afin d'identifier les virus et les types de *Polymyxa* en utilisant des outils moléculaires non publiés, c'est-à-dire des primers multiplexés pour les 3 virus (SBCMV, SBWMV et WSSMV) et les 2 types de *Polymyxa* (ARN, ADN).

Le virus SBCMV a été identifié dans 60-80 % des échantillons testés provenant de Vatan et Bologne, dans 20 % des échantillons testés de Guilly et Chambon, et n'a pas été détecté dans les sols de Pray, MSP et Westerrade.

Le virus SBWMV n'a été détecté que dans les échantillons de Bologne et Westerrade. Le virus WSSMV n'a pas été détecté dans le sol de Westerrade mais il était bien présent dans les autres sols testés.

L'analyse du vecteur viral *Polymyxa graminis* n'a pas pu être corrélée avec les résultats de présence de virus.

Un set de 28 génotypes (Tableau II) a été construit afin de mettre en place un test phénotypique optimal en conditions contrôlées. Ce panel comprenait 14 *Triticum durum* (blé dur), 1 *Triticum dicoccum*, 9 *Triticum aestivum* (blé tendre), 4 *Triticum monococcum*, résistants ou sensibles à SBCMV et WSSMV.

Ind	Specie	Comment	WSSMV	SBCMV	Cross
LEVANTE	Durum	parent of population	-	R	Simeto x Levante
LLOYD	Durum	parent of population	S		Dic2 x Lloyd
MERIDIANO	Durum	parent of population	-	R	Meridiano x Claudio
MONASTIR	Durum	parent of population	-	R	Monastir x Odisseo
ODISSEO	Durum	parent of population	-	S	Monastir x Odisseo
PESCADOU	Durum	parent of population	S	S	Pescadou x Soldur
SENATORE_CAPPELLI	Durum	founder, sequenced	-	R	NAM
SILUR	Durum	parent of population	S		Dic2 x Silur
SIMETO	Durum	parent of population	-	S	Simeto x Levante
SOLDUR	Durum	parent of population	R	R	Pescadou x Soldur
SVEVO	Durum	Sequenced line		R	Ciccio x Svevo
ARONDE	Durum		S	R	
CICCIO	Durum	parent of population	-	S	Ciccio x Svevo
CLAUDIO	Durum	parent of population	-	S	Meridiano x Claudio
AZTEC	Bread	parent of population	R	S	Tremie x Aztek
CADENZA	Bread	will be sequenced	R	R	
CEZANNE	Bread		S	S	
CLAIRE	Bread	parent of population	R	R	Claire x Savannah
CORDIALE	Bread		S	R	
TOMCLAIR	Bread		S	R	
GONCOURT	Bread		S	S	
SAVANNAH	Bread	parent of population	R	S	Claire x Savannah
TREMIE	Bread	parent of population	R	R	Tremie x Aztek
DIC2	Dicocum	parent of population	R	R	Dic2 x Silur
DV92	Monococum				
MDR002	Monococum				
PI272560	Monococum	parent of population	-		PI272560 x PI36554
PI36554	Monococum	parent of population	-		PI272560 x PI36554

Tableau II : Panel de 28 géotypes utilisé pour la mise en place de l'outil de phénotypage en conditions contrôlées.

### ► Expérimentations initiales (2017)

Plusieurs expérimentations tests ont été réalisés en 2017, en chambre de culture et en serre, afin de tester différents paramètres : échantillon de sol, prégermination des graines, température (jour/nuit), date de notation (entre 10 et 18 semaines après semis), et application de fertilisant.

La première expérimentation en chambre de culture (18°C le jour / 16°C la nuit) n'a permis que peu d'infection avec SBCMV/SBWMV et aucune infection avec WSSMV. Parmi les géotypes infectés, certains sont des cultivars connus comme résistants. Dans les conditions initiales mises en place en 2017, l'infection ne représentait pas la résistante ou la sensibilité des lignées du panel. Dans les sols provenant de Guilly et MSP, aucune plante infectée n'a pu être détectée.

La seconde expérimentation a été conduite en chambre de culture également, en tout point identique à la précédente mais à des températures plus faibles (12°C le jour / 10°C la nuit). Parmi les 45 échantillons détectés comme positifs aux analyses ELISA SBCMV/SBWMV, 7 étaient issus de cultivars connus pour être résistants. 13 échantillons ont montré une infection à WSSMV. Le taux d'infection était plus élevé pour les deux virus dans cette seconde expérimentation à plus faibles températures.

La troisième expérimentation, conduite en serre, a été réalisée dans un mélange de sol infecté et de sable. Les graines germées ont été plantées dans des pots 9x9cm. La température de la serre a été maintenue à 12°C le jour

et 10°C la nuit. Les autres facteurs étaient identiques à ceux en chambre de culture (intensité de 10 000 lux et durée du jour de 16h). Le feuillage des plantes de six semaines a été coupés 10 cm au-dessus du sol afin d'accélère la propagation du virus vers les feuilles. Des tests ELISA ont été réalisés à 10 et 16 semaines après plantation. Peu de plantes ont montré une infection après 16 semaines et les cultivars sensibles comme Pescadou et Cezanne n'étaient infectés qu'à 30 % (3 plantes sur 10 en moyenne).

En ce basant sur ces premières expérimentations conduites en 2017, une analyse des paramètres influençant le taux d'infection et son efficacité a pu être réalisée (Figure 1).

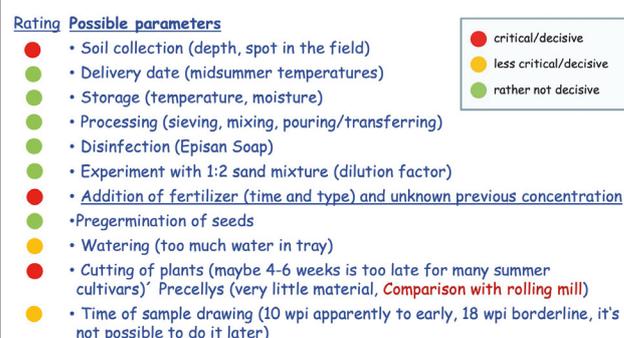


Figure 1 : Analyse des paramètres influençant le taux et l'efficacité d'infection.

### ► Suite des expérimentations (2018)

Avec les sols de Chambon (SBCMV) et Westerrade (SBWMV), de nouvelles expérimentations ont été entreprises en 2018 en chambres de culture.

Une première expérimentation a été réalisée à une température de 18°C le jour/16°C la nuit et une seconde a été réalisée à une température de 12°C le jour/10°C la nuit. Afin de tester l'impact que peut avoir la date d'apport du fertilisant, ce dernier a été apporté soit sous forme liquide juste après le taillage des feuilles, soit sous forme solide directement dans le sol. L'objectif était de minimiser les effets négatifs causés par l'augmentation de la pression osmotique due à la dissolution du fertilisant, sur l'activité de *Polymyxa graminis*. Des tests ELISA ont été réalisés sur les feuilles 8 et 14 semaines après infection.

La plupart des génotypes sensibles ont montré une infection à 14 semaines après infection quand le fertilisant liquide était utilisé, indiquant que ce paramètre peut améliorer significativement le taux d'infection. Cette amélioration a été observée sur les deux sols (Chambon et Westerrade).

Dans un second temps, une expérimentation a été réalisée en serre à 18°C/16°C afin d'évaluer l'impact que pourrait avoir une blessure mécanique des racines sur l'infection. Les deux témoins sensibles, Pescadou et Cezanne, ont été semés dans un sol de Chambon (SBCMV) sans ajout de fertilisant dans le sol. Les plantes ont été retirées du sol au stade 2-3 feuilles, et les racines et les feuilles ont été coupées. Les plantes ont ensuite été replantées dans le même sol infecté. Les résultats montrent une meilleure homogénéité de l'infection au sein d'un même génotype (nombre de plantes infectées par génotype).

Après ce premier test sur deux génotypes, une expérimentation a été mise en place sur l'ensemble du panel afin de tester plus précisément l'impact d'une blessure mécanique des racines sur l'infection. Les sols de Chambon et Bologne ont été utilisés en chambre de culture à 12/10°C. De la même manière que précédemment, les racines et les feuilles ont été coupées au stade 2-3 feuilles. Le nombre de plantes infectées ne change pas significativement avec les racines coupées. Encore une fois, le paramètre quantité et moment d'application du fertilisant semble beaucoup plus crucial.

Il a été observé également une véritable différence entre les sols quant à leur capacité d'infection, nécessitant de réfléchir au moment le plus pertinent pour réaliser le prélèvement et la méthode de prélèvement des sols, en favorisant les zones montrant des symptômes sur plante.

### ► Evaluation des ressources génétiques

#### a) Screening d'un panel d'*Aegilops tauschii*

Un panel composé de 150 génotypes a été fourni par Brande Wulff (John Innes Centre) pour phénotypage en conditions contrôlées. Le phénotypage a été réalisé en serre, avec les sols de Elxleben et Westerrade. La température était de 18°C le jour, et 16°C la nuit, avec une intensité lumineuse de 10 000 lux et une alternance jour/nuit de 16h/8h à 60 % d'humidité. L'échantillonnage pour test ELISA a été réalisé à 10 et 14 semaines après semis.

Dans le sol d'Elxleben, 24 lignées se sont montrées sensibles, 36 moyennement sensibles, 42 moyennement résistantes et 49 résistantes. Dans le sol de Westerrade,

19 lignées se sont montrées sensibles, 34 moyennement sensibles, 41 moyennement résistantes et 57 résistantes. 116 lignées sur 150 montrent la même réaction (groupe identique ou adjacent) à SBWMV dans différents sols.

#### b) Screening d'un panel de *Triticum dicoccoides*

Une expérimentation similaire a été réalisée avec un panel de 245 génotypes de *Triticum dicoccoides*, fourni par l'université de Bologne. Cette collection a été phénotypée pour les trois virus sur les sols de Bologne et d'Elxleben dans 3 expérimentations différentes en serre. La résistance d'un génotype a été calculée comme la moyenne des notes obtenues sur les 3 expérimentations.

Pour le virus SBCMV/SBWMV, 11 lignées se sont montrées résistantes, 124 moyennement résistantes, 68 moyennement sensibles et 42 sensibles. Concernant WSSMV, 173 lignées se sont montrées résistantes, 68 moyennement résistantes, 3 moyennement sensibles et 1 sensible.

Les tests ELISA montrent que la plupart des *Triticum dicoccoides* sont sensibles à SBCMV et SBWMV, mais moins sensibles à WSSMV.

### ► Conclusions

Il est fortement recommandé d'échantillonner des sols, à 15-30 cm de profondeur, sur lesquels des plantes infectées ont été observées. Ensuite, il est recommandé de tamiser le sol juste après le prélèvement, en retirant les pierres et le matériel végétal.

La prégermination des graines permet d'améliorer l'homogénéité des expérimentations.

Le type et le moment d'application du fertilisant montrent une forte influence sur le taux d'infection. Une quantité modérée, ainsi qu'une application 8 semaines après le semis et de plus faibles températures (12°C jour / 10°C nuit), augmente le taux et l'efficacité d'infection.

Il est recommandé de d'analyser la disponibilité en fertilisant dans les sols avant de les utiliser en conditions contrôlées.

Couper les racines n'augmente pas les taux d'infection.

## 3 WP2 - Identification de marqueurs liés à la résistance aux virus chez Dic2 et Soldur

### ► Résistance à WSSMV dans la population KARUR x SOLDUR

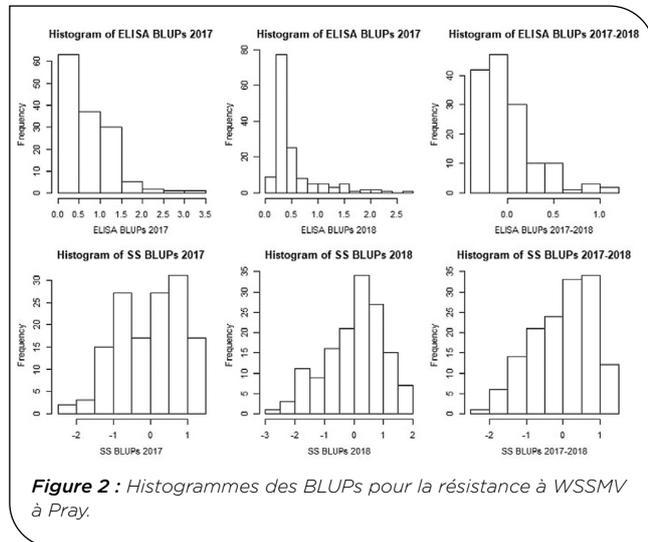
#### a) Matériel et Méthodes

Les lignées recombinantes produites par RAGT issues de deux croisements (populations Karur x Soldur [KS] et Pescadou x Soldur [PS]) ont été semées en 2016-2017 et 2017-2018 dans un champ naturellement infecté par le virus WSSMV à Pray (latitude 47.683333N, longitude 1.116667E). En 2016-2017 et en 2017-2018, 144 lignées et un témoin ont été phénotypés. Le phénotypage a été réalisé par Arvalis. La sévérité des symptômes (SS) a été évaluée sur une échelle de notations allant de 0 à 5 (5 étant la plus importante quantité de symptômes). La concentration de virus a été quantifiée par DAS-ELISA (Clark et Adams 1977). Pour chaque parcelle expérimentale, environ 20 feuilles ont été collectées à différents stades de développement de façon aléatoire. Les échantillons ont ensuite été génotypés en pool par ELISA.

Le génotypage a été produit dans ce projet par génotypage ciblé, en utilisant le protocole de Holtz *et al.* (2016).

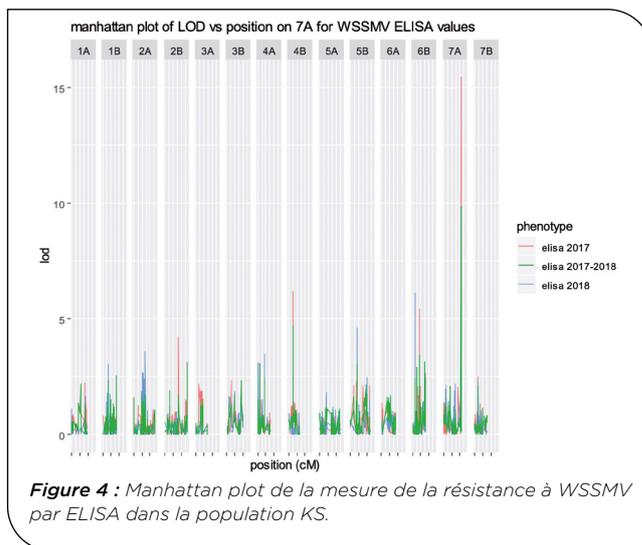
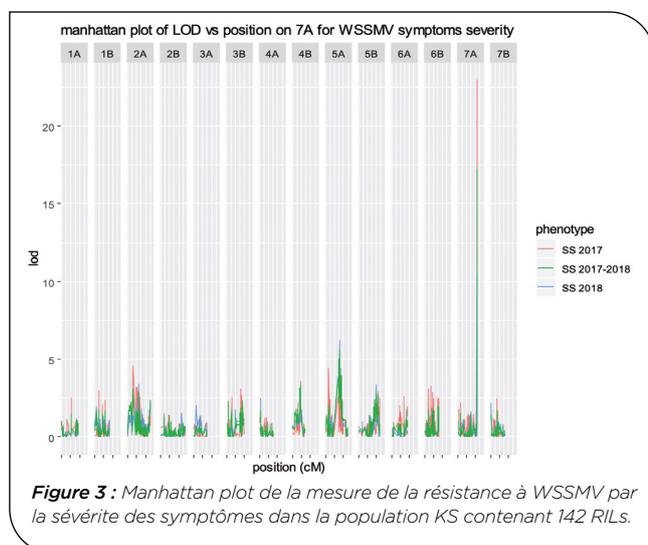
Des BLUPs ont été calculés pour 6 caractères : SS 2017, SS 2018, SS 17-18 (valeurs combinées des 2 années), ELISA 2017, ELISA 2018 et ELISA 17-18. Le package QTL de R a été utilisé pour l'analyse QTL par composite interval mapping.

## b) Résultats



D'une part, la distribution des BLUPs des ELISA (Figure 2) montre qu'il y a une grande majorité des génotypes avec de faibles valeurs et peu avec de fortes valeurs. D'autre part, les BLUPs de la sévérité des symptômes sont plus proches d'une distribution normale, avec une majorité des génotypes avec des symptômes moyens. Les corrélations de Spearman entre ELISA et SS en 2017 et 2018 sont respectivement de 0.62 et 0.34. La corrélation entre ELISA des 2 années est de 0.36 et la corrélation entre SS des 2 années est de 0.60. Les héritabilités calculées avec SPATS pour SS 2017 et SS 2018 sont respectivement de 0.84 et 0.92.

En 2017 et 2018, l'analyse QTL a mis en évidence une région localisée sur la portion distale du long bras du chromosome 7A (Figures 3 et 4), impliquée dans la résistance.



Le tableau III résume les statistiques de ce QTL majeur détecté dans Karur x Soldur.

Trait	Chr	LOD peak	Position (cM)	SNP Name	IC size (cM)	R <sup>2</sup> (%)	Soldur Additive effect
Elisa 2017	7A	15.4	425.6	chr7A.361	1.1	40.4	-0.75
Elisa 17-18	7A	9.9	424.5	chr7A.288	0.4	27.1	-0.32
SS 2017	7A	23.0	425.6	chr7A.361	-	53.0	-1.22
SS 2018	7A	10.5	424.5	chr7A.288	0.4	27.8	-1.04
SS 17-18	7A	17.2	425.6	chr7A.361	0.7	43.1	-1.06

**Tableau III :** Statistiques descriptives du QTL majeur détecté sur le chromosome 7A dans la population KS.

Un QTL mineur a également été détecté sur le chromosome 5A. Ce QTL n'a pas été détecté pour tous les caractères, uniquement pour SS (Tableau IV). Les R<sup>2</sup> sont faibles (5.8 et 4.7 %) et l'intervalle de confiance est large entre 50 et 63.2 cM.

Trait	Chr	LOD peak	Position (cM)	SNP Name	IC size (cM)	R <sup>2</sup> (%)	Soldur Additive effect
SS 2018	5A	6.19	304.3	chr5A.391	50.0	5.8	-0.48
SS 17-18	5A	5.63	311.2	chr5A.519	63.2	4.7	-0.31

**Tableau IV :** Statistiques descriptives du QTL mineur détecté sur le chromosome 5A dans la population KS.

## ► Résistance à SBCMV en France chez Dic2 et Soldur

### a) Matériel et Méthodes

Un essai a été réalisé à Chambon (46° 50' 37"N 0° 48' 47"E) en France dans un champ connu pour avoir les deux virus (WSSMV et SBCMV) présents. Dans ce champ, uniquement les individus RILs préalablement identifiés comme résistants à WSSMV ont été implantés au champ (54 Dic2 x Lloyd, 61 Dic2 x Silur, 26 Karur x Soldur and 17 Pescadou x Soldur). Les individus de la population DB résistants à WSSMV étaient trop peu nombreux pour être utilisés. L'infection au champ par les 2 virus a été vérifiée par 2 variétés témoins de blé tendre, Aztec et Virlor connus pour être respectivement résistant à WSSMV et sensible à SBCMV et vice versa.

Les notations ont été réalisées pour SBCMV de la même façon que pour WSSMV (SS et ELISA).

Le package *mppR* sous R a été utilisé pour la détection de QTL au sein d'un panel multi-parental.

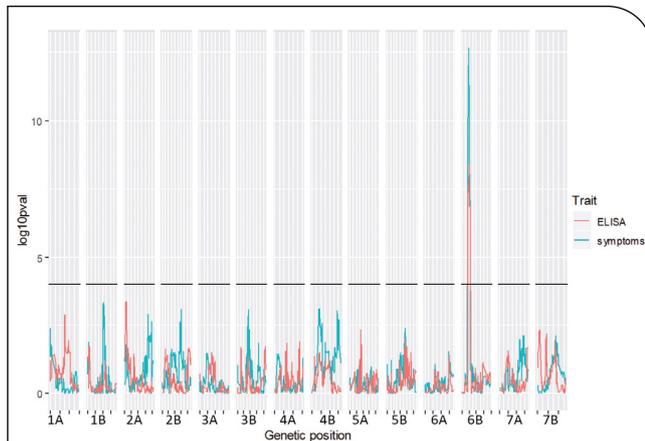
## b) Résultats

Les variétés contrôles (Virlor et Aztec) ont confirmé la présence de WSSMV et SBCMV à Chambon. Comme attendu, les croisements issus du parent Dic2 ont montré le moins de symptômes (Tableau V).

	KS		PS		D2S		D2L	
	SS	ELISA	SS	ELISA	SS	ELISA	SS	ELISA
mean	2.94	0.80	3	0.89	2.64	0.92	1.98	0.84
min	0	0.17	0	0.18	0	0,2	0	0,21
max	5	1.43	5	1.69	5	2.45	5	2.74
CV(%)	25	42	34	35	-	-	-	-
H <sup>2</sup> (%)	36	80	80	68	-	-	-	-

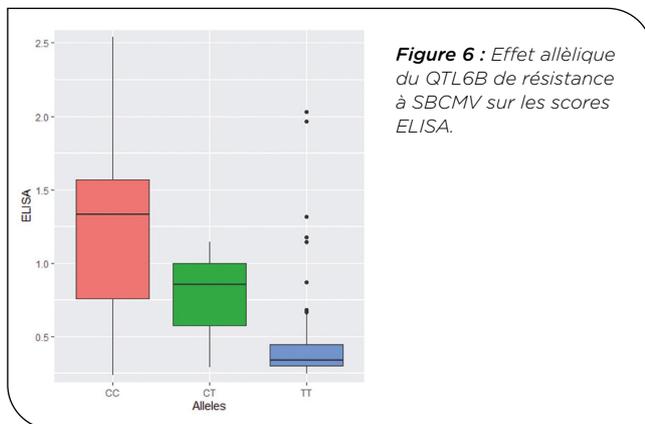
**Tableau V :** Statistiques descriptives des notations SS et ELISA dans les différentes populations.

La détection de QTL a mis en évidence un unique mais très fort QTL de résistance à SBCMV, sur le chromosome 6B (Figure 5). L'allèle de résistance vient du parent Dic2. Le QTL explique entre 39 % et 28 % de la variation phénotypique de SS et de l'ELISA.



**Figure 5 :** Manhattan plot de la mesure de la résistance à SBCMV dans les populations avec Dic2 comme parent.

La Figure 6 montre l'effet du QTL 6B sur les scores ELISA. L'allèle T vient du parent Dic2, et l'allèle C des parents sensibles.



**Figure 6 :** Effet allélique du QTL6B de résistance à SBCMV sur les scores ELISA.

Aucun QTL n'a été détecté dans les croisements avec le parent résistant Soldur.

## ► Résistance à SBCMV en Italie chez Dic2

### a) Matériel et Méthodes

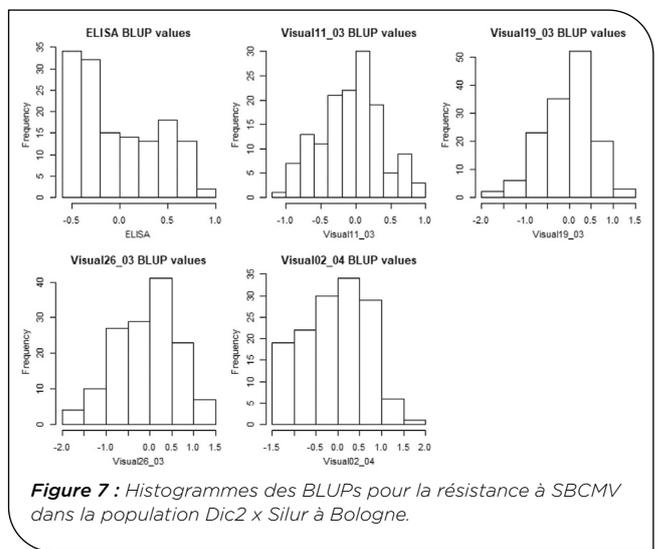
A Bologne en Italie, 140 RILs issues du croisement Dic2 x Silur (DS) ont été phénotypées en 2019. Chaque génotype a été répété 2 fois. Les variétés témoins utilisées étaient Claudio, Meridiano, Ciccio, Simeto, Grazia, Rascon, Svevo, Neodur et Levante.

La sévérité des symptômes (SS) a été mesurée à 4 dates en Mars-Avril, sur une échelle de 0 à 5 (0 représentant aucun symptôme). La quantification du virus a été mesurée comme à Chambon, mais sur 12 feuilles au lieu de 20.

Les données phénotypiques ont été ajustées avec le package *SPATS* et la détection de QTL a été réalisée avec le package *qtl* sous R.

### b) Résultats

La distribution des BLUP n'est pas la même entre les scores SS et les scores ELISA (Figure 7).



**Figure 7 :** Histogrammes des BLUPs pour la résistance à SBCMV dans la population Dic2 x Silur à Bologne.

Le croisement DS montre une forte ségrégation des scores SS. Les corrélations de Pearson varient de 79 % à 95 % entre les différentes notations SS. La corrélation entre SS et ELISA est de 57.5 % (Tableau VI).

	SS 19/03	SS 26/03	SS 02/04	ELISA
SS 11/03	0.80	0.79	0.82	0.60
SS 19/03	-	0.91	0.90	0.52
SS 26/03	-	-	0.95	0.58
SS 02/04	-	-	-	0.59

**Tableau VI :** Corrélations de Pearson entre les phénotypes de Bologne dans la population Dic2 x Silur.

La détection de QTL a mis en évidence 2 forts QTL avec les données ELISA. Un QTL a été détecté sur le chromosome 6B à 85.5 cM (LOD de 11.5), dans un intervalle de confiance allant de 78.8 à 88.8 cM. Il a été détecté uniquement à la date 11/03. Il est localisé dans le même intervalle que celui détecté à Chambon.

Le plus fort QTL a été détecté sur le chromosome 2A avec un LOD de 24 (Figure 8). Il est situé dans un intervalle allant de 13.1 à 21.6 cM. Il a été détecté pour les scores SS à toutes les dates, ainsi qu'avec les scores ELISA.

Trois autres QTL mineurs ont été détectés avec les scores visuels : un sur le chromosome 1A à 72.2cM (LOD = 4.5), un sur le chromosome 4A à 82 cM à 2 dates (LOD 5.1 et 4.7), et l'un sur le chromosome 7A à 179cM (LOD = 4.7).

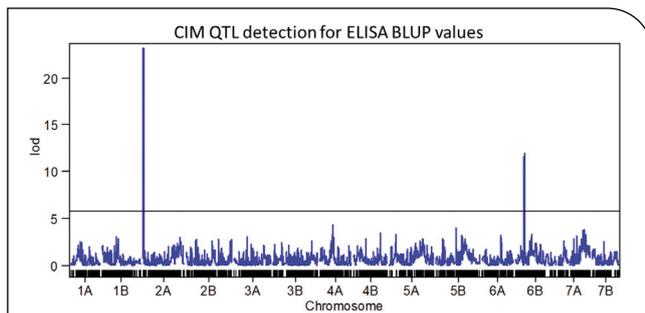


Figure 8 : Manhattan plot de la mesure de la résistance à SBCMV par mesure ELISA dans la population DS en Italie.

### ► Conclusions et perspectives

Chez la lignée résistante aux mosaïques, SOLDUR, 2 QTL de résistance à WSSMV ont été détectés, l'un majeur sur le chromosome 7A, l'autre mineur sur le chromosome 5A. Dans la lignée résistante aux mosaïques, Dic2, un QTL majeur de résistance à SBCMV a été détecté en France sur le chromosome 6B. Ce QTL a également été retrouvé dans l'essai en Italie. En Italie, un autre QTL majeur a été détecté sur le chromosome 2A.

Le déterminisme de la résistance de SOLDUR à SBCMV n'a pour le moment pas été mis en évidence.

L'Italie et la France semblent présenter des virus SBCMV différents, ne faisant pas intervenir les mêmes QTL de résistance chez Dic2. Une analyse du virome pourrait être envisagée pour investiguer plus en profondeur ces différences.

## 4 WP3 - Identification de marqueurs liés finement au gène majeur *Sbm2* dans le blé dur

### ► Cartographie fine grâce au développement de marqueurs KASP et à l'analyse de liaison

Qsbm.ubo-2BS=*Sbm2* a été caractérisé dans 2 populations RIL, Meridiano (R) x Claudio (S) et Simeto (S) x Levante (R). L'utilisation de la puce Illumina 90K SNPs a permis l'identification de 8 SNP, convertis en KASP dans l'intervalle de confiance du QTL : KUBO13 (0 cM), KUBO27, KUBO29, KUBO3, KUBO1, KUBO40, KUBO41 et KUBO9 (11.4 cM).

Environ 2000 RIL de la population Svevo (R) x Ciccio (S) ont été génotypés avec les 2 marqueurs encadrants le QTL, KUBO9 et KUBO13. Les 291 lignées recombinantes identifiées entre ces 2 marqueurs ont été phénotypées pour leur résistance à SBCMV. Cette cartographie fine a permis de localiser la résistance dans un intervalle de 0.2cM (3.2Mb) entre les marqueurs KUBO27 et KUBO1 (Figure 9).

Markers	cM	140	3	59	1	1	2	162	65	n° of RILs
KUBO13	0	B	B	A	A	A	A	A	B	
KUBO27	3.5	B	B	B	A	A	A	A	A	
WPE-2106-2B	3.6	B	B	B	B	A	A	A	A	
KUBO29	3.6	B	B	B	B	A	A	A	A	
KUBO3	3.6	B	m	B	B	H	A	A	A	
KUBO1	3.6	B	m	B	B	m	A	A	A	
KUBO40	3.7	B	A	B	B	B	B	A	A	
KUBO41	3.7	B	A	B	B	B	B	B	A	
KUBO9	11.4	A	A	B	B	B	B	B	A	
		3.20	3.25	3.24	3.34	2.56	1.47	2.01	1.90	BLUES

Figure 9 : Intervalle génétique dans la population Svevo x Ciccio. Le nombre de RILs résume le nombre d'individus avec un haplotype donné (A : allèle du parent résistant). Les valeurs BLUES sont calculées en prenant la moyenne de l'ensemble des individus présentant l'haplotype donné.

La population BC1F2 Meridiano x Meridiano/Claudio 110 (S), contenant 2500 lignées, a été génotypée avec les 8 marqueurs KASP et 600 lignées recombinantes entre les marqueurs KUBO9 et KUBO13 ont été sélectionnées et autofécondées en serre. Les lignées BC1F4 ont été génotypées plus finement avec la puce Axiom 420K SNP et phénotypées pour leur résistance à SBCMV en 2018 et 2019. Les recombinaisons montrent que l'intervalle de confiance peut être réduit à un intervalle de 1.5Mb entre les marqueurs KUBO63 et KUBO82 (Figure 10).

L'analyse de la séquence de référence Svevo montre la présence de 11 gènes candidats dans cet intervalle de 1.5 Mb. L'outil Blast Koala montre que ces gènes sont principalement impliqués dans les interactions plante-pathogène et dans le transfert membranaire (NBS-LRR, MAPK et membrane receptor kinase).

Liste des gènes potentiellement causaux (high-confidence) avec leur ID sur le génome de Svevo : TRITD2Bv1G007170, TRITD2Bv1G007220, TRITD2Bv1G007230, TRITD2Bv1G007240, TRITD2Bv1G007250, TRITD2Bv1G007260, TRITD2Bv1G007300, TRITD2Bv1G007370, TRITD2Bv1G007380, TRITD2Bv1G007400 and TRITD2Bv1G007430.

### ► RNA-seq et évaluation de l'expression des gènes

Durant la saison 2018, les variétés sensibles et résistantes (Neodur, Cappelli, Kronos, Simeto, Levante, Saragolla, Meridiano, Claudio, Svevo and Ciccio) ont été semées en 3 répétitions biologiques dans des champs infectés

MXMC110 ID	KUBO74	KUBO27	KUBO64	KUBO75	KUBO65	wPt-2106-2B	KUBO63	KUBO76	KUBO80	KUBO68	KUBO72	KUBO29	KUBO81	KUBO82	KUBO3	KUBO9	h <sup>2</sup> = 0.028 R <sup>2</sup> = 0.3772	h <sup>2</sup> = 0.49 R <sup>2</sup> = 0.6896	h <sup>2</sup> = 0.70 R <sup>2</sup> = 0.868
																Blue_VS_2019	BLUE_VS_2018	BLUE_ELISA_2019	
1033-2	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	2.32	3.50	0.38
1033-3	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	1.87	3.08	0.18
1089-1	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	2.82	3.67	1.28
1096-3	Undeterm	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	2.13	3.72	1.11
1011-4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	1.19	3.24	0.14
1290-2	B	A	A	Undeterm	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Undeterm	A	A	1.44	2.87	0.15
62-6	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	H	2.02	3.04	0.01
1365-1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	1.49	2.70	0.26
2252-3	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	2.06	3.43	0.23
2252-4	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	1.79	2.38	0.44
265-5	Undeterm	B	B	Undeterm	Undeterm	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	2.55	3.71	1.27
57-1	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	2.31	3.80	0.73
75-5	B	B	B	B	Undeterm	Undeterm	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	1.76	3.83	1.06
920-3	Undeterm	B	B	B	B	B	B	B	Undeterm	B	B	B	B	B	A	A	2.21	3.69	1.28

Figure 10 : Intervalle de confiance dans la population Meridiano x Meridiano/Claudio.

par SBCMV. Les racines et les feuilles de ces variétés (répétitions incluses) ont été échantillonnées à 5 dates entre janvier et mars.

Les ARN ont été extraits à partir des racines et des feuilles des échantillons issus des variétés résistantes (Svevo et Meridiano) et sensibles (Ciccio et Claudio) pour les 3 premières dates de prélèvement.

Ces échantillons ont été retrotranscrits en ADNc et une analyse qRT-PCR a été réalisée sur les 3 gènes candidats les plus probables : TRITD2Bv1G007260 (proteine kinase), TRITD2Bv1G007240 (NBS-LRR) et TRITD2Bv1G007370 (proteine kinase). Les données montrent que les gènes sont plus exprimés dans les racines de variétés résistantes que dans les racines de variétés sensibles aux 3 dates (Figure 11). Les résultats restent tout de même variables et nécessitent d'être améliorés. Aucune expression n'a pu être détectée dans les feuilles, confirmant que les racines sont bien le principal tissu impliqué dans la résistance à SBCMV. Etant donné la grande variabilité obtenue dans cette expérimentation, l'analyse RNA-Seq doit être étendue aux autres variétés prélevées (Altar84, Neodur, Cappelli, Kronos, Simeto, Levante, Saragolla).

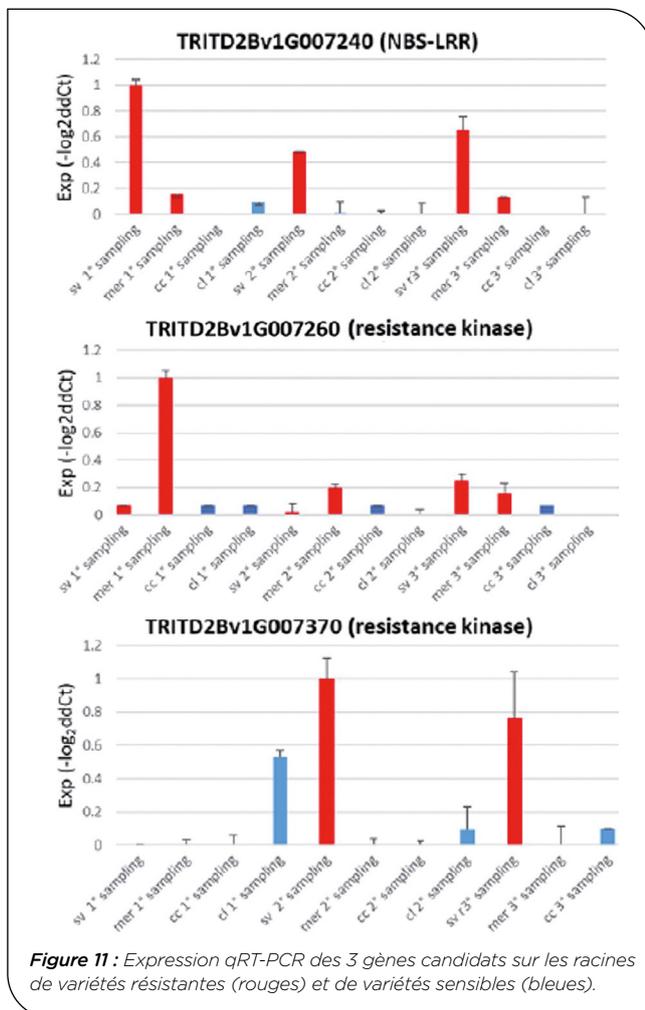


Figure 11 : Expression qRT-PCR des 3 gènes candidats sur les racines de variétés résistantes (rouges) et de variétés sensibles (bleues).

### ► Analyse du déterminisme de la résistance à SBCMV dans la population EPO

181 lignées fixées par SSD à partir d'une population de prebreeding (EPO) ont été phénotypées en 2019 à Bologne en 2 répétitions. Cette population EPO a été présentée dans David *et al.* (2014).

Cette population a été génotypée avec la partie publique de la puce Breedwheat contenant 280k marqueurs (Rimbert *et al.* 2018). Après filtration, environ 65k marqueurs ont pu être utilisés dans l'analyse.

Une analyse GWAS a été réalisée avec les données de phénotypage (résistance à SBCMV) et de génotypage grâce au package *mlmm.gwas* dans R (Segura *et al.* 2012).

La Figure 12 représente les distributions des phénotypes obtenus à Bologne sur la population EPO. La distribution des ELISA est bimodale alors que la distribution des notes visuelles est normale.

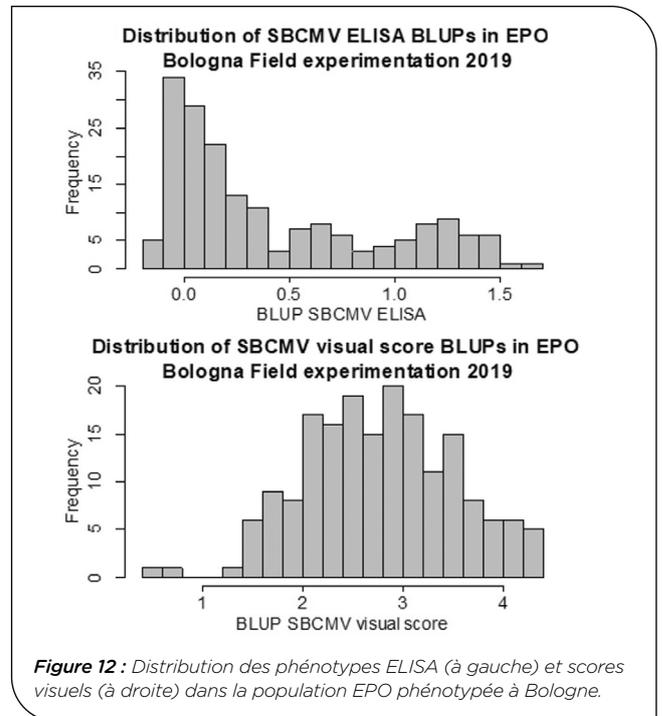


Figure 12 : Distribution des phénotypes ELISA (à gauche) et scores visuels (à droite) dans la population EPO phénotypée à Bologne.

La corrélation de Pearson entre les ELISA et les notes visuelles est de 0.51.

Le marqueur le plus associé en GWAS pour le score visuel est le marqueur AX-89390281 sur le bras court du chromosome 2B. Pour l'ELISA, le marqueur le plus associé est AX-89594037, très proche du marqueur précédent. Ces marqueurs sont positionnés dans la région correspondant au QTL *Q<sub>Sbm.ubo-2BS</sub>* (Figure 13).

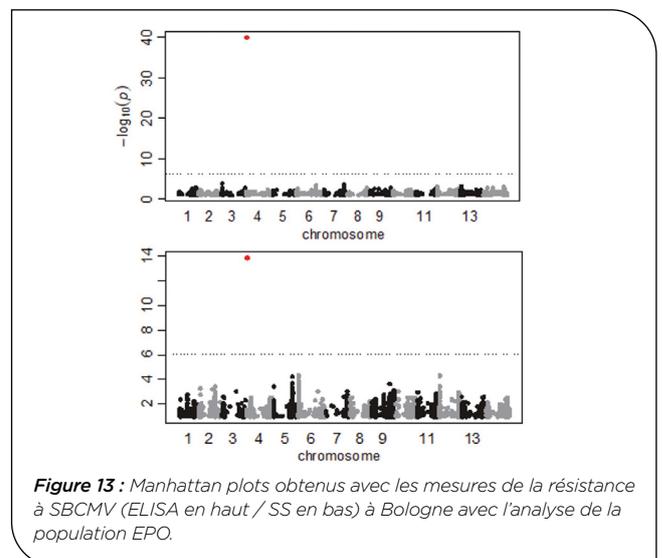


Figure 13 : Manhattan plots obtenus avec les mesures de la résistance à SBCMV (ELISA en haut / SS en bas) à Bologne avec l'analyse de la population EPO.

## Références bibliographiques

- Barbosa MM, Goulart LR, Prestes AM, Juliatti FC.** 2001. Genetic control of resistance to soil-borne wheat mosaic virus in Brazilian cultivars of *Triticum aestivum* L. *Theil. Euphytica*. 122:417-422.
- Bass C, Hendley R, Adams MJ, Hammond-Kosack KE, Kanyuka K.** 2006. The Sbm1 locus conferring resistance to soil-borne cereal mosaic virus maps to a gene-rich region on 5DL in wheat. *Genome*. 49:1140-1148.
- Bayles R, O'Sullivan D, Lea V, Freeman S, Budge G, Walsh K, Henry C** (2007) Controlling Soil-borne cereal mosaic virus in the UK by developing resistant wheat cultivars. HGCA Project 2616. HGCA Crop Research News 32: Project Report no. 418
- Budge, G., Henry, C.M.,** 2002. Assessing resistance of UK winter wheat varieties to soil-borne wheat mosaic virus and wheat spindle streak mosaic virus. Home-Grown, London, UK. Cereals Authority, HGCA Project Report No. 293.
- Canova, A., Quaglia, A.,** 1960. Il mosaico del frumento. *Informatore Fitopatologico* 10, 206-208. Clover, G., and Henry, C. 1999. Detection and discrimination of Wheat spindle streak mosaic virus and Wheat yellow mosaic virus using multiplex RT-PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:891-896.
- Chen J.,** 1993. Occurrence of fungally transmitted wheat mosaic viruses in China. *Annals of Applied Biology* 123, 55-61.
- David, Jacques, Yan Holtz, Vincent Ranwez, Sylvain Santoni, Gautier Sarah, Morgane Ardisson, Gérard Poux, et al.** 2014. « Genotyping by Sequencing Transcriptomes in an Evolutionary Pre-Breeding Durum Wheat Population ». *Molecular Breeding* 34 (4): 1531-48. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0179-z>.
- Clark, M. F., et A. N. Adams.** 1977. « Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses ». *Journal of General Virology*, 34 (3): 475-83. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-34-3-475>.
- Dubey SN, Brown CM, Hooker AL.** 1970. Inheritance of field reaction to soil-borne wheat mosaic virus. *Crop Sci.* 10:93-95.
- Hao Y, Wang Y, Chen Z, Bland D, Li S, Brown-Guedira, GJohnson, J,** 2012. A conserved locus conditioning Soil-borne wheat mosaic virus resistance on the long arm of chromosome 5D in common wheat. *Mol. Breed.* 30 :1453-1464.
- Hariri D., M. Courtillot, P. Zaqui and H. Lapierre,** 1987. Multiplication of Soilborne wheat mosaic virus (SBW- MV) in wheat roots infected by a soil carrying SBWMV and Wheat yellow mosaic virus (WYMV). *Agronomie* 7, 789-796 (in French).
- Holtz, Yan, Morgane Ardisson, Vincent Ranwez, Alban Besnard, Philippe Leroy, Gérard Poux, Pierre Roumet, Véronique Viader, Sylvain Santoni, et Jacques David.** 2016. « Genotyping by Sequencing Using Specific Allelic Capture to Build a High-Density Genetic Map of Durum Wheat ». *PLoS ONE* 11 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154609>
- Hunger RM, Sherwood JL.** 1985. Use of symptomatology and virus concentration for evaluating resistance to wheat soil-borne mosaic virus. *Plant Dis.* 69:848-850.
- Kanyuka, K., Lovell, D.J., Mitrofanova, O.P., Hammond-Kosack, K., Adams, M.J.,** 2004. A controlled environment test for resistance to soil-borne cereal mosaic virus (SBCMV) and its use to determine the mode of inheritance of resistance in wheat cv. Cadenza and for screening *Triticum monococcum* genotypes for sources of SBCMV resistance. *Plant Pathol.* 53, 154-160.
- Kendall T.L. and S.A. Lommell,** 1988. Fungus-vectored viruses of wheat in Kansas. In: *Viruses with Fungal Vectors* (J.I. Cooper, M.J.C. Asher ed.), The Lavenham Press Ltd., Lavenham, UK, 37-60.
- Khan A, Bergstrom G, Nelson J, Sorrells M** (2000) Identification of RFLP markers for resistance to wheat spindle streak mosaic bymovirus (WSSMV) disease. *Genome* 43:477-482
- Maccaferri M, Ratti C, Rubies-Autonell C, Vallega V, Demontis A, Stefanelli S, Tuberosa R, Sanguineti MC.** 2011. Resistance to soil-borne cereal mosaic virus in durum wheat is controlled by a major QTL on chromosome arm 2BS and minor loci. *Theor Appl Genet.* 123:527-544.
- Maccaferri M, R Francia R, C Ratti C, C Rubies-Autonell C, C Colalongo C, Ferrazzano G, Tuberosa R, Sanguineti MC.** 2012. Genetic analysis of Soil-Borne Cereal Mosaic Virus response in durum wheat: evidence for the role of the major quantitative trait locus QSbm.ubo-2BS and of minor quantitative trait loci. *Mol Breed.* 29:973-988.
- Merkle OG, Smith EL.** 1983. Inheritance of resistance to soil borne mosaic in wheat. *Crop Sci.* 23:1085-1086.
- Modawi RS, Heyne EG, Brunetta D, Willis WG.** 1982. Genetic studies of field reaction to wheat soil-borne mosaic virus. *Plant Dis.* 66:1183-1184.
- Narasimhamoorthy B, Gill BS, Fritz AK, Nelson JC, Brown-Guedira GL.** 2006. Advanced backcross QTL analysis of a hard winter wheat synthetic wheat population. *Theor Appl Genet.* 112:787-796.
- Koenig, R., Huth, W.,** 2000. Soil-borne rye mosaic and European wheat mosaic virus: two names for a furovirus with variable genome properties which is widely distributed in several cereal crops in Europe. *Arch. Virol.* 145, 689-697.
- Perovic D., Förster J, Devaux P, Hariri D, Guilleroux M, Kanyuka K, Lyons R, Weyen J, Feuerhelm D, Kastirr U, Sourdille P, Röder M and Ordon F** (2009) Mapping and diagnostic marker development for Soil-borne cereal mosaic virus resistance in bread wheat. *Molecular Breeding*, 23:641-653.
- Ratti C, Rubies-Autonell C, Maccaferri M, Stefanelli S, Sanguineti MC, Vallega V.** 2006. Reaction of 111 cultivars of *Triticum durum* Desf. from some of the world's main genetic pools to soil-borne cereal mosaic virus. *J Plant Dis Protect.* 113:145-149.
- Ratti, C., Budge, G., Ward, L., Clover, G., Rubies-Autonell, C., and Henry, C.** 2004. Detection and relative quantification of Soil-borne cereal mosaic virus (SBCMV) and *Polyomyxa graminis* in winter wheat using real time PCR (TaqMan®). *J. Virol. Methods* 122:95-103.
- Ratti C, Rubies-Autonell C, Maccaferri M, Corneti S, Stefanelli S, Sanguineti MC, Demontis A, Massi A, Vallega V.** 2009. Inheritance of resistance to cereal soil-borne mosaic virus in a durum wheat population of lines derived from the cross 'Meridiano/Claudio': results of a two-year study. *Annu Wheat Newsl.* 55:106-108.

**Rimbert, Hélène, Benoît Darrier, Julien Navarro, Jonathan Kitt, Frédéric Choulet, Magalie Leveugle, Jorge Duarte, et al.** 2018. « High Throughput SNP Discovery and Genotyping in Hexaploid Wheat ». PLOS ONE 13 (1): e0186329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186329>.

**Rubies-Autonell, C., Vallega, V., Ratti, C.,** 2003. Reactions of cultivars of common wheat (*Triticum aestivum* L.) to soil-borne wheat mosaic virus in northern Italy. J. Plant Disease Protect. 110, 332- 336.

**Rubies-Autonell C, Ratti C, Pisi A, Sarti A, Canestrone R, Vallega V.** 2008. Reaction of thirty-four durum wheat cultivars to soil-borne cereal mosaic virus in 2007. In: Rush CM,, editor Proc of the Seventh Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors (IWGPVVFV), Quedlingburg, Germany, August September, 2008. American Society of SB Technologists, Denver. p. 105 110.

**Segura, Vincent, Bjarni J. Vilhjálmsson, Alexander Platt, Arthur Korte, Ümit Seren, Quan Long, et Magnus Nordborg.** 2012. « An Efficient Multi-Locus Mixed-Model Approach for Genome-Wide Association Studies in Structured Populations ». Nature Genetics 44 (7): 825-30. <https://doi.org/10.1038/ng.2314>

**Shalan M, Heyne EG, Sill WH.** 1966. Breeding wheat for resistance to soil-borne wheat mosaic virus, wheat streak-mosaic virus, leaf rust, stem rust, and bunt. Phytopathol. 56:664 669.

**Steuernagel et al** (2016) MutRenSeq; three-step cloning of resistance genes from hexaploid wheat using mutagenesis and sequence capture. Nature Biotechnology (accepted).

**Vallega V, Rubies-Autonell C, Turina M, Ratti C, Contoli S.** 1999. Reactions to SBWMV of durum wheat cultivars grown in northern Italy during 1995 96. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 106:284 290.

# MOSAIC : Développement d'outils phénotypique et génotypique pour améliorer la sélection de la résistance du blé dur à deux virus des mosaïques du blé

Ellen GOUEMAND-DUGUE<sup>1\*</sup>, Michael COCHARD<sup>1</sup>, Dragan PEROVIC<sup>2</sup>, Ute KASTIRR<sup>2</sup>, Delphine HOURCADE<sup>3</sup>, Michel BONNEFOY<sup>3</sup>, Jacques DAVID<sup>4</sup>, Valentin RIBAUT<sup>4</sup>, Lucas MATHIEU<sup>4</sup>, Veronique VIADER<sup>4</sup>, Brande WULFF<sup>5</sup>, Ruth BRYANT<sup>6</sup>, Thierry Lefevre<sup>6</sup>, Cyrille SAINTENAC<sup>7</sup>, Roberto TUBEROSA<sup>8</sup>, Matteo BOZZOLI<sup>8</sup>, Marco MACCAFERRI<sup>8</sup>

- 1 - FLORIMOND DESPREZ VEUVE & FILS, 59242 Cappelle-en-Pévèle, France
  - 2 - THE JULIUS KUHN-INSTITUT, Erwin-Baur-Str. 17 - 06484 Quedlinburg, Germany
  - 3 - ARVALIS - INSTITUT DU VEGETAL, 3 rue Joseph et Marie Hacquin-75116 PARIS, France
  - 4 - INSTITUT NATIONAL D'ETUDES SUPERIEURES AGRONOMIQUES DE MONTPELLIER, 2 place Viala - 34060 Montpellier Cedex 2, France
  - 5 - JOHN INNES CENTRE, Colney Lane - NR4 7UH Norwich, UK
  - 6 - RAGT 2n, rue Emile SINGLA, Site de Bourran - B.P. 3336, 12033 RODEZ Cedex 09, France
  - 7 - INRAE GDEC, UMR 1095, 5 chemin de Beaulieu 63100 Clermont-Ferrand, France
  - 8 - UNIVERSITA' DI BOLOGNA - DEPARTMENT OF AGRICULTURAL SCIENCES, Viale Fanin 44 - 40127 Bologna (BO), Italy
- \*Coordinateur : Ellen GOUEMAND-DUGUE, ellen.gouemand@florimond-desprez.fr

**Résumé:** Le projet a eu pour objectif premier de mettre au point un test de résistance aux deux virus de la mosaïque (SBCMV et WSSMV) du blé dur en conditions contrôlées. Le projet a également permis d'améliorer la localisation des régions chromosomiques (QTL), des lignées de blé dur Dic2 et Soldur, impliquées dans la résistance à SBCMV et WSSMV. Enfin, le projet a identifié des marqueurs moléculaires étroitement liés au gène *Sbm2* de résistance à SBCMV par une approche de cartographie fine. Grâce à ces marqueurs moléculaires liés à la résistance aux virus, le sélectionneur pourra facilement sélectionner et produire de nouvelles variétés de blé dur plus résistantes à WSSMV et SBCMV.

**Introduction:** Le Virus de la Mosaïque des céréales (SBCMV) et le Virus de la Mosaïque des stries en fuseaux du blé (WSSMV) peuvent causer des pertes de rendement pouvant atteindre 50 à 70% chez les variétés les plus sensibles de blés dur et tendre en France et en Italie. Du fait de la nature persistante de ces virus dans le sol, le seul moyen pratique et économique de contrôler l'infection est l'utilisation de variétés résistantes. L'évaluation du matériel au champ est particulièrement difficile puisque les infections ne sont pas toujours homogènes et que les symptômes provoqués par SBCMV et WSSMV au champ ne sont pas distinguables facilement. Kanyuka et al. (2004) ont démontré que les génotypes de blé peuvent être testés efficacement pour leur résistance à SBCMV en conditions contrôlées en utilisant du sol naturellement contaminé par *Polymyxa graminis*. Cette technique pourrait permettre d'améliorer la rapidité et l'efficacité de sélection de variétés de blé résistantes à SBCMV et WSSMV. Chez le blé dur, un gène majeur de résistance à SBCMV a été localisé sur le chromosome 2B. *QSbm.ubo-2BS* détecté dans le cultivar Meridiano de blé dur, serait identique à *Sbm2* détecté chez le blé tendre. Il est situé à proximité du marqueur DArT wPt-2106 (Maccaferri et al. 2011). En se basant sur une analyse combinée de 2 populations, Meridiano x Claudio et Simeto x Levante, *Sbm2* a été plus finement localisé dans un intervalle de 2.6cM. Concernant la résistance à WSSMV, un QTL majeur a été détecté sur le chromosome 2D (Khan et al., 2000). Le cultivar Soldur et la lignée Dic2 sont deux nouvelles sources de résistance contre ce virus.

## WP1 - Développement d'un outil phénotypique

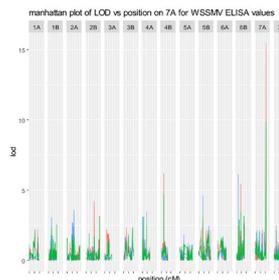
Au cours des 3 ans du projet, des sols infectés provenant de 12 champs différents ont été réceptionnés au JKI et utilisés pour des expérimentations en serre et en chambre de culture. Une collection de 28 génotypes a été construite afin de tester et de développer le nouvel outil de phénotypage en conditions contrôlées. Un panel d'*Aegilops tauschii* (150 génotypes) et de *Triticum dicoccoides* (224 génotypes) a ensuite été testé avec ce nouvel outil afin d'identifier de nouvelles sources de résistance.

Il a été conclu que l'application de fertilisant 8 semaines après les semis, combinée avec des faibles températures (12°C le jour et 10°C la nuit) et une plus longue exposition au virus (16 semaines post infection) permettent d'augmenter le taux d'infection et son efficacité. Le type et le moment du prélèvement des sols sont également décisifs dans la réussite du test. Sur le panel, 5 *T. diccocom* / 7 *T. durum* / 6 *T. aestivum* / 23 *Aegilops* se sont montrés résistants au SBCMV. Les sols infectés par SBCMV ont une efficacité d'infection supérieure en conditions contrôlées, comparés aux sols infectés par WSSMV.

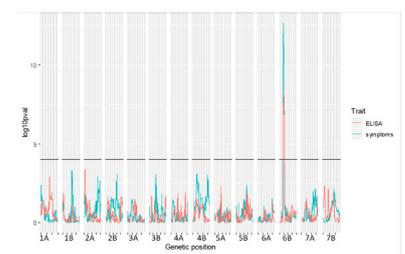


## WP2 - Identification de marqueurs liés à la résistance aux virus chez Dic2 et Soldur

La population biparentale Karur x Soldur, phénotypée en 2017 et 2018, a été utilisée pour confirmer le déterminisme de la résistance à WSSMV de Soldur. Un QTL majeur de résistance à WSSMV, issu de Soldur, a été confirmé sur le chromosome 7A ( $r^2$  allant de 27 à 53%). La résistance à SBCMV de Dic2 a été étudiée via 3 populations RIL, phénotypées sur 2 lieux (Chambon [FR] et Bologne [IT]). Deux nouveaux QTL de résistance à SBCMV ont été mis en évidence sur les chromosomes 2A [IT] et 6B [FR/IT]. Des marqueurs KASP ont été définis et testés pour suivre ces 2 QTL.



Manhattan plot pour les notes ELISA et symptômes visuels SBCMV dans les croisements avec Dic2



## WP3 - Identification de marqueurs liés finement au gène majeur *Sbm2* dans le blé dur

*QSbm.ubo-2BS=Sbm2* a été caractérisé dans 2 populations RIL, Meridiano (R) x Claudio (S) et Simeto (S) x Levante (R). L'utilisation de la puce Illumina 90K SNPs a permis l'identification de 8 SNP, convertis en KASP dans l'intervalle de confiance du QTL. Environ 2000 RIL de la population Svevo (R) x Ciccio (S) ont été génotypés avec les 2 marqueurs encadrants le QTL, KUBO9 et KUBO13. Les 291 lignées recombinantes identifiées entre ces 2 marqueurs ont été phénotypées pour leur résistance à SBCMV. Cette cartographie fine a permis de localiser la résistance dans un intervalle de 0.2cM (3.2Mb) entre les marqueurs KUBO27 et KUBO1. 600 lignées recombinantes BC1F4 Meridiano x Meridiano/Claudio 110 (S) ont permis d'affiner l'intervalle à 1.5Mb.

L'intervalle de confiance comprend 11 gènes potentiellement causaux (NBS-LRR, MAPK et membrane receptor kinase).

Une analyse RNA-seq réalisée sur 13 variétés résistantes et sensibles a permis de mettre en évidence que 9 de ces 17 gènes sont surexprimés dans les variétés résistantes et 4 sont sous-exprimés dans les variétés sensibles.

Un QTL de résistance à SBCMV a été détecté dans le panel EPO (181 lignées), phénotypé à Bologne, colocalisant avec le gène *Sbm2*. Le marqueur le plus associé est AX-89343611.

