

FsoV



Coordinatrice
Henriette Goyeau

MaBrune : Marqueurs diagnostiques des résistances à la rouille brune dans le blé tendre



Thierry C. MARCEL, INRAE Bioger



C. E. T. A. C.



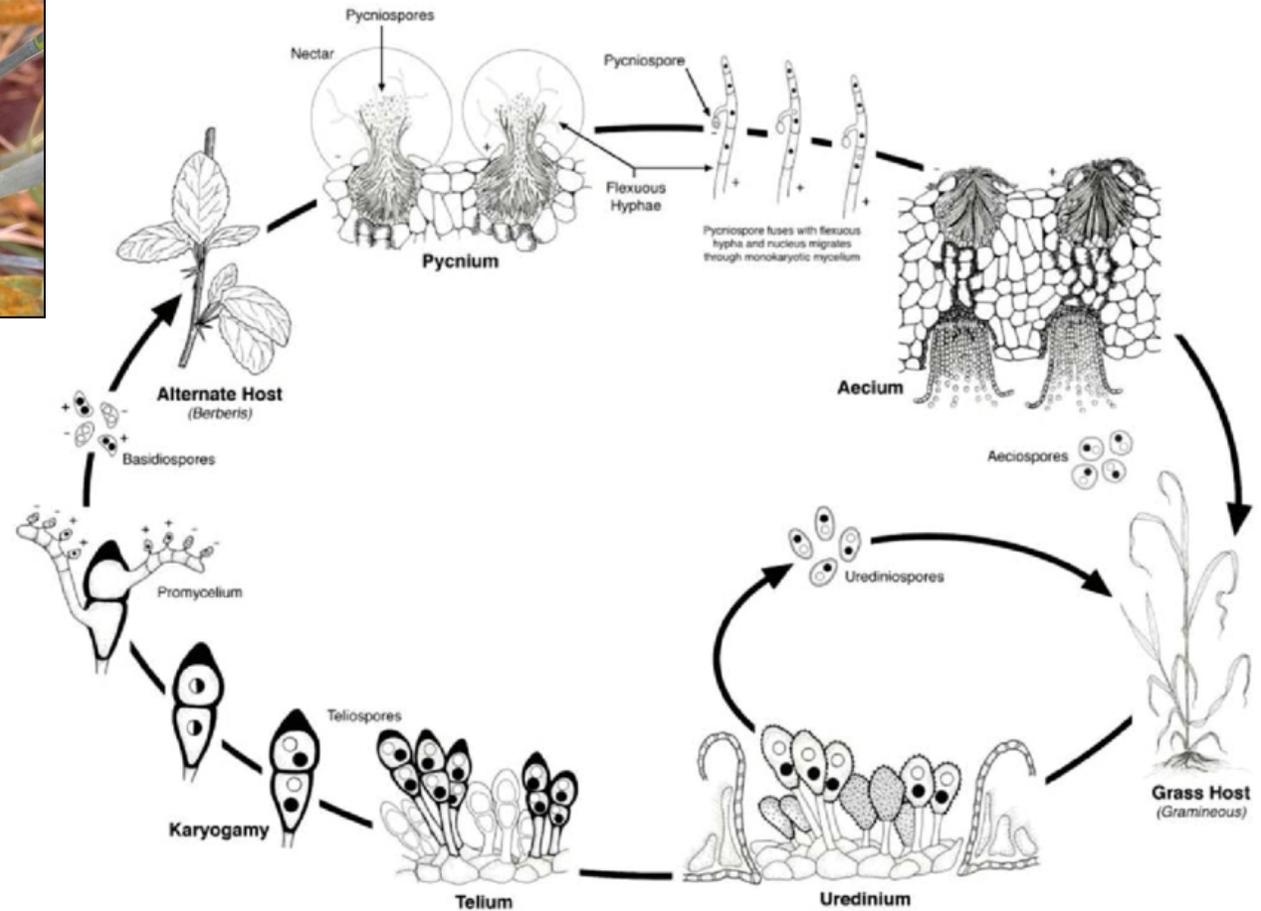
Pathosystème blé tendre – *Puccinia triticina*

La rouille brune causée par *Puccinia triticina*



Puccinia triticina

- Phylum: Basidiomycota
- Ordre: Pucciniales
- Agent pathogène biotrophe
- Hétéroïque, avec un hôte alternant: *Thalictrum speciosissimum* (rue des prés)
- 80 gènes *Lr* identifiés



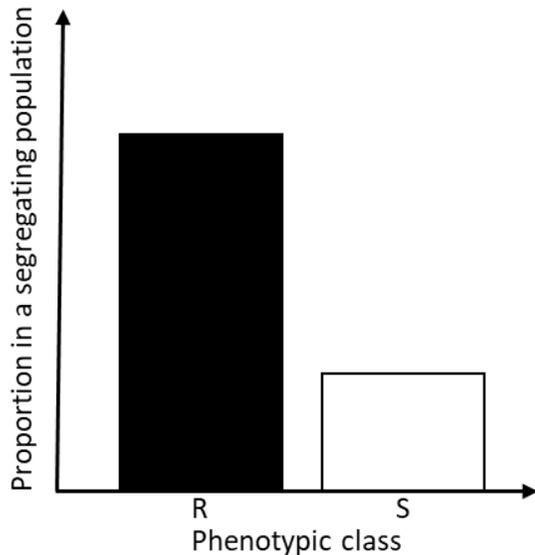
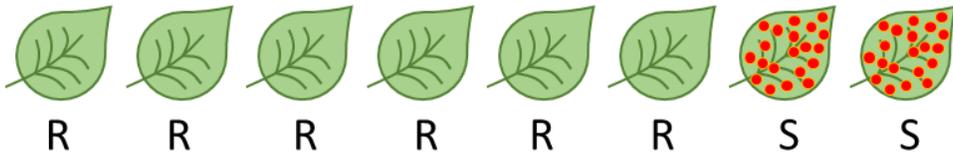
Life cycle of a heteroecious, macrocyclic cereal rust.

Illustration by Jackie Morrison, USDA-ARS.



Définitions de qualitatif et de quantitatif en phytopathologie

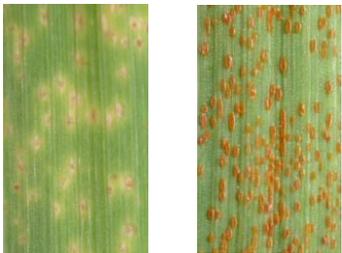
Résistance Qualitative



Vocabulary:

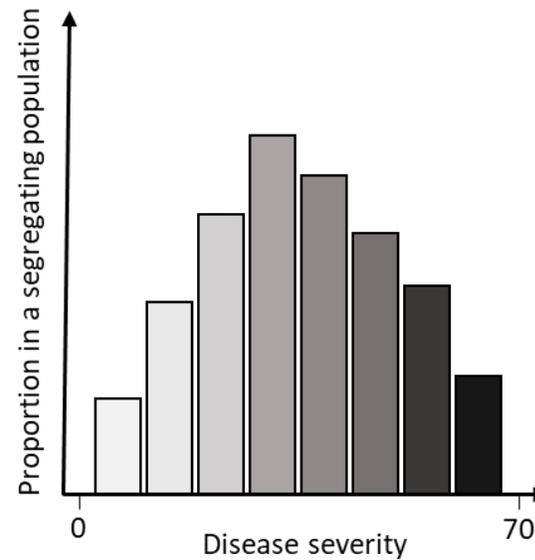
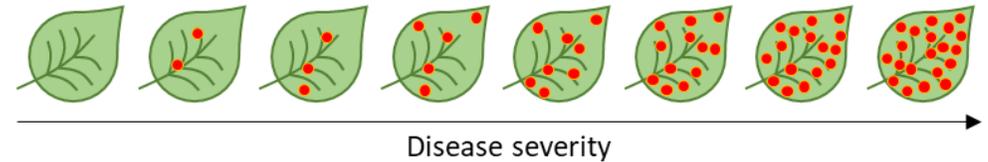
Plant side: Qualitative resistance; Vertical resistance; Total resistance; Monogenic resistance; Major gene resistance; *R*-gene resistance; Race/strain specific resistance; Resistance through hypersensitivity.

Pathogen side: Virulence; Avirulence



Gène *Lr*

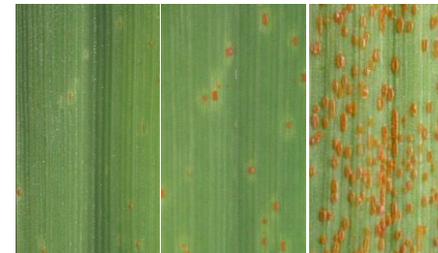
Résistance Quantitative



Vocabulary:

Plant side: Quantitative resistance; Horizontal resistance; Partial resistance; Polygenic resistance; Minor gene resistance; Basal resistance; Broad resistance; Non-specific resistance; Field resistance; Tolerance.

Pathogen side: Aggressiveness



Quantitative Trait Locus (QTL)

Lr34, Lr46, Lr67...



Continuité des projets FSOV

- FSOV 2004 K: Durabilité de la résistance partielle à la rouille brune du blé
- FSOV 2008 G: Résistance partielle à la rouille brune
- FSOV 2012 Q: Résistance durable à la rouille brune du blé
- **FSOV 2016 W: Marqueurs diagnostiques des résistances à la rouille brune dans le blé tendre**

Ressources disponibles dans la communauté

- Suivi des populations fongiques et postulation des gènes de résistance *Lr* dans les variétés élités depuis 1999 (Goyeau *et al.*, 2006; Goyeau & Lannou, 2011; Papaix *et al.*, 2011; Fontyn *et al.*, 2022)
- Lignées isogènes Thatcher pour 38 gènes *Lr*
- Panel Breedwheat de 285 variétés élités (Touzy *et al.*, 2019)
- Population recombinante Renan/Chinese-Spring (Darrier *et al.*, 2017; Rimbart *et al.*, 2018; Langlands-Perry *et al.*, 2022)
- Illumina iSelect 90K (Wang *et al.*, 2014)
- Affymetrix Axiom 410K (Kitt *et al.*, 2021; Danguy des Déserts *et al.*, 2021; Paux *et al.*, 2022)



Objectif

En se basant sur les acquis des projets précédents, MaBrune a pour objectif la réalisation d'une cartographie de précision de gènes *Lr* et QTL de résistance à la rouille brune présents dans les variétés élites de blé tendre en France.

Enjeu

L'enjeu est l'identification de marqueurs moléculaires diagnostiques de la présence de ces gènes *Lr* et QTL afin de faciliter la sélection de variétés résistantes.

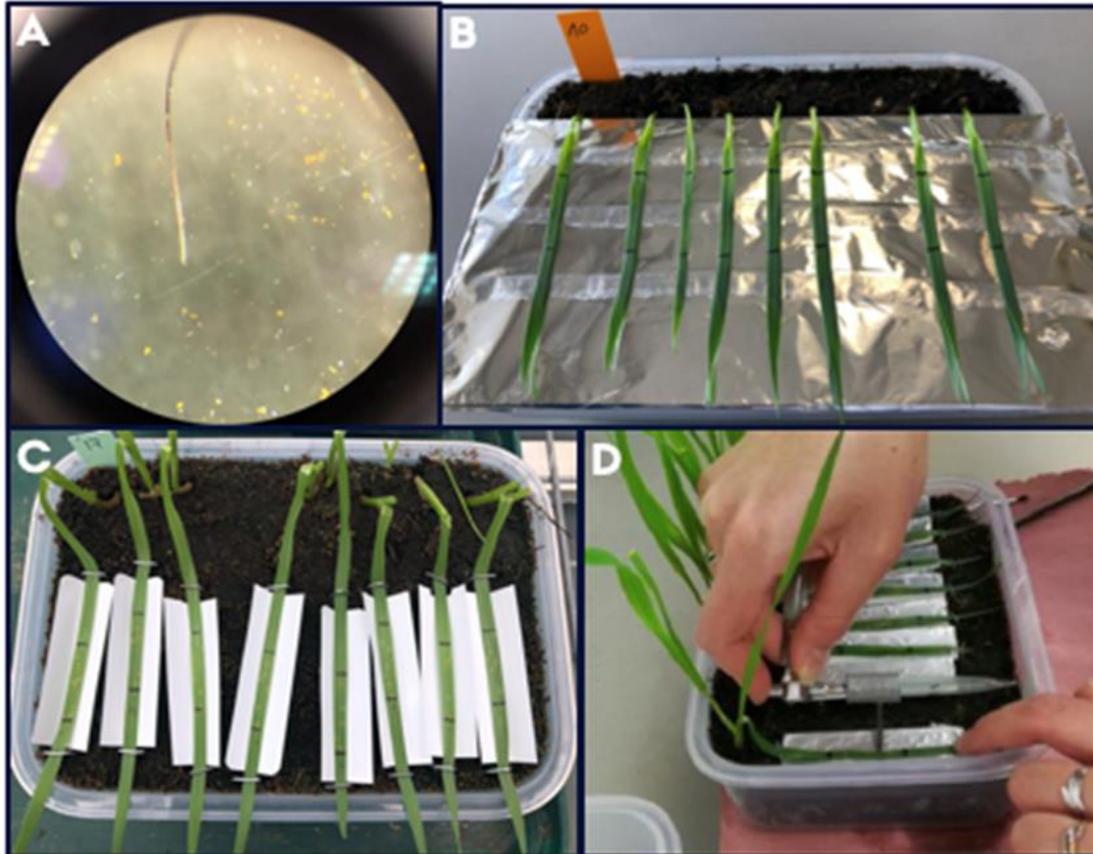
Actions

- A. Actualisation des méthodologies de phénotypage et génotypage.
- B. QTLs de résistance partielle, cartographie fine et production de marqueurs.
- C. Production de marqueurs des gènes majeurs *Lr*.
- D. Validation des marqueurs identifiés sur un panel de variétés.



Actualisation des méthodologies de phénotypage et de génotypage

Phénotypage en serre au stade jeunes plantes



Protocole de mesure de l'agressivité. A : cil servant au prélèvement des spores vu sous loupe binoculaire, B : feuilles de blé fixées sur une plaque recouvert d'aluminium, C : gouttières placées sous les feuilles à J+9, D : aspiration des spores dans une paille

- > Accélérer le phénotypage du matériel
- > Réaliser des mesures plus précises des composantes de la résistance quantitative

A : inoculation, 10 spores/feuille
→ efficacité d'infection

B : 8 feuilles par variété et par isolat, mise en chambre de rosée

Comptage pustules 2X/jour de J+6 à J+9
→ période de latence

C : mise en place des gouttières à J+9

D : récolte des spores, aspiration avec paille J+12 → sporulation



Thèse de
Cécilia Fontyn



Actualisation des méthodologies de phénotypage et de génotypage

Carte génétique intégrant les marqueurs des puces iSelect 90K et Axiom 410K

La population RIL Renan/Chinese-Spring a été génotypée avec les deux puces puis une carte génétique construite à l'aide du logiciel *Multipoint ultra-dense* (MultiQTL Ltd):

- 194,630 marqueurs SNP polymorphes
 - 10,857 SNP de iSelect 90K
 - 183,773 SNP de Axiom 410K
- 148,820 marqueurs SNP cartographiés
- 5,357 BIN génétiques
- 4,277 centiMorgans et 21 groupes de liaison

GCAT
TACG
GCAT
genes



Article

Resistance of the Wheat Cultivar 'Renan' to Septoria Leaf Blotch Explained by a Combination of Strain Specific and Strain Non-Specific QTL Mapped on an Ultra-Dense Genetic Map

Camilla Langlands-Perry^{1,2}, Murielle Cuenin¹, Christophe Bergez¹, Safa Ben Krima¹, Sandrine Gélisse¹, Pierre Sourdil³, Romain Valade² and Thierry C. Marcel^{1,*}



Thèse de Camilla Langlands-Perry

- > Comparer les QTL identifiés précédemment avec l'une ou l'autre des puces de génotypage
- > Vérifier la position des marqueurs SNP cartographiés *in silico* sur la séquence génomique de Chinese-Spring

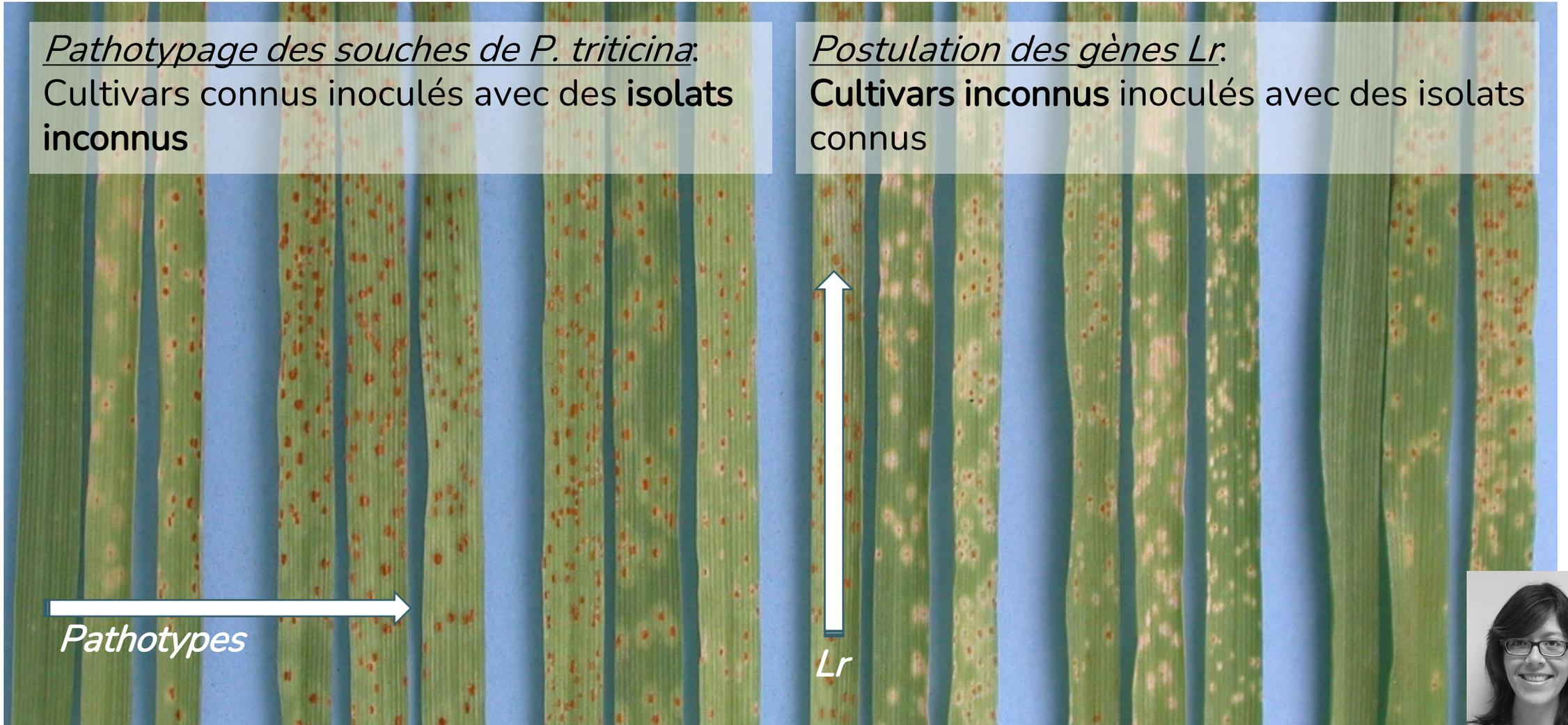


Actualisation des méthodologies de phénotypage et de génotypage

Suivi annuel des populations hôte et pathogène

Pathotypage des souches de *P. triticina*:
Cultivars connus inoculés avec des **isolats inconnus**

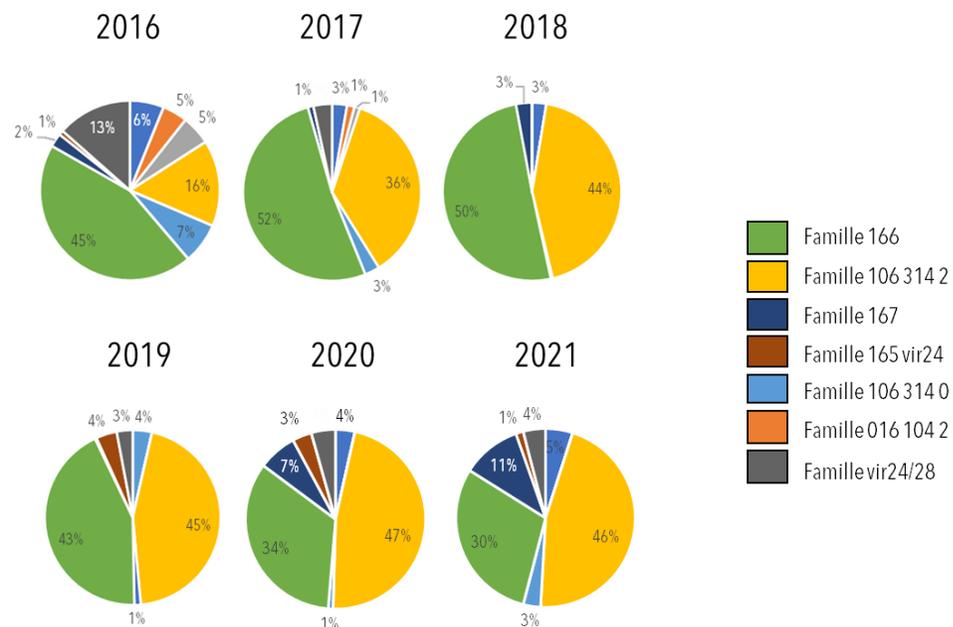
Postulation des gènes *Lr*:
Cultivars **inconnus** inoculés avec des isolats connus



Actualisation des méthodologies de phénotypage et de génotypage

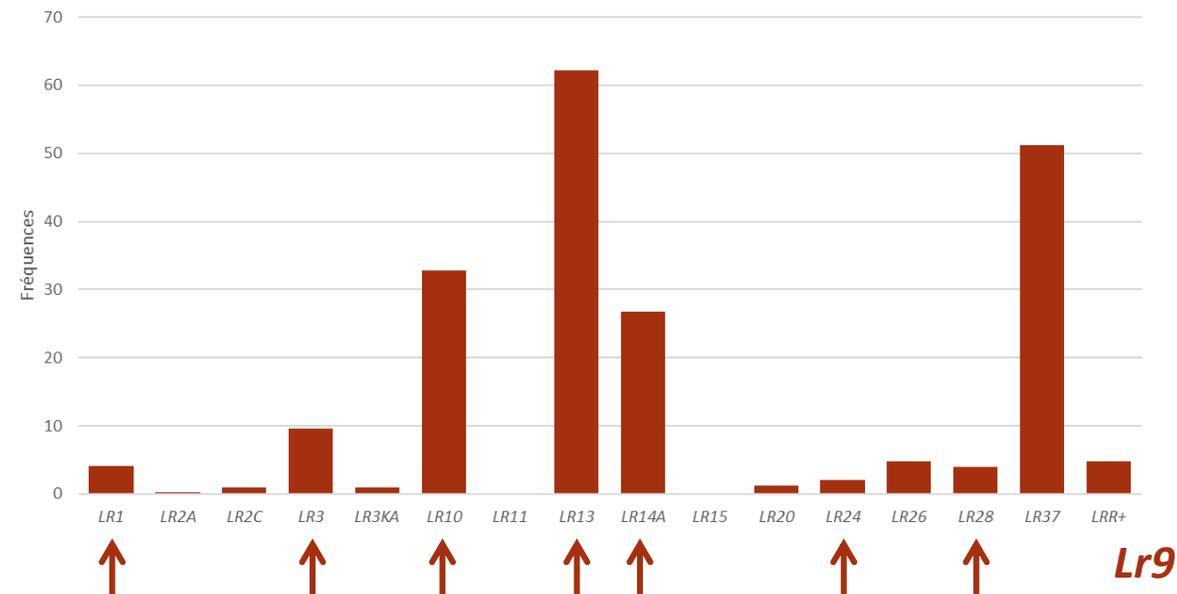
Suivi annuel des populations hôte et pathogène

Pathotypage des souches de *P. triticina*:



- > Connaitre l'efficacité des gènes de résistance
- > Détecter l'apparition de nouveaux contournements des résistances introduites

Postulation des gènes *Lr*:



- > Connaitre les gènes présents dans les variétés
- > Evaluer la valeur diagnostique des marqueurs moléculaires développés



Identification de marqueurs diagnostiques des gènes *Lr*

Stratégie pour l'identification de marqueurs par « Bulk Segregant Analysis »

- 8 gènes retenus: présents dans les variétés françaises ou non contournés (*Lr9*)
- Populations F₂ issues du croisement entre lignées quasi-isogénique des gènes *Lr* et Thatcher
- Phénotypage de 140 individus F₂, Constitution de bulks de 30 individus
- Génotypage de Thatcher, des NILs et des « bulks » (R, S et I) sur la puce Axiom TaBW410K

Gène	Déterminisme génétique	Bulks retenus	Type d'infection AVR avec B950019-A	Type d'infection AVR avec B950506-A
<i>Lr1</i> *	3:1 R dominant	1 R + 1 S		
<i>Lr3</i>	2:1:1 R dominant partiel	1 R + 1 S + 1 I		
<i>Lr9</i>	3:1 R dominant	1 R + 1 S		
<i>Lr13</i> *	3:1 R dominant	1 R + 1 S		
<i>Lr14a</i> *	3:1 R dominant	1 R + 1 S		
<i>Lr24</i>	3:1 R dominant	1 R + 1 S		
<i>Lr28</i>	1:2:1 R récessif partiel	1 R + 1 S + 1 I		
<i>Lr37</i>	1:3 R récessif	1 R + 1 S		



Identification de marqueurs diagnostiques des gènes *Lr*

Analyse des marqueurs polymorphes

- Sélection des marqueurs polymorphes entre Thatcher/Thatcher-*Lr*
- Sélection des marqueurs polymorphes entre bulk-R/bulk-S
- Sélection des marqueurs polymorphes localisés dans la région où le gène *Lr* a été cartographié

Gène	Chr	Origine	Introgression NIL (Mbp)	Introgression BSA (Mbp)	Nombre de marqueurs
<i>Lr1*</i>	5DL	<i>Triticum aestivum</i>	18	2	17
<i>Lr3</i>	6BL	<i>Triticum aestivum</i>	265	18	110
<i>Lr9</i>	6BL	<i>Aegilops umbellulata</i>	10	8,5	44
<i>Lr13*</i>	2BS	<i>Triticum aestivum</i>	534	534	637
<i>Lr14a*</i>	7BL	<i>Triticum aestivum</i>	25	16	18
<i>Lr24</i>	3DL	<i>Agropyron elongatum</i>	143	141	73
<i>Lr28</i>	4AL	<i>Aegilops speltoides</i>	137	70	104
<i>Lr37</i>	2AS	<i>Aegilops ventricosa</i>	128	128	31



- L'approche par BSA a permis de réduire l'intervalle de 5 des gènes *Lr* ciblés



Identification de marqueurs diagnostiques des gènes *Lr*

Analyse des marqueurs polymorphes

- Utilisation des données de postulation des gènes *Lr* dans les variétés françaises

Gène	Chr.	Nom du SNP	R	S	VD	FN	FP	Effectif
<i>Lr1</i>	5DL	cfn2809161	A	T	99.2 %	5.9 %	5.9 %	517
		cfn2809027	T	C	99.5 %	0 %	5.9 %	517
<i>Lr3a</i>	6BL	cfn3039991	A	G	99.7 %	0 %	3.1 %	203
		cfn0182781	G	C	99.7 %	0 %	3.0 %	306
		cfn0001653	G	C	99.7 %	0 %	2.9 %	298
<i>Lr9</i>	6BL	cfn2990662	A	G	100 %	0 %	0.0 %	53
		cfn0857299	T	A	100 %	0 %	0.0 %	53
<i>Lr24</i>	3DL	cfn2209796	T	C	99.3 %	0 %	8.3 %	145
		cfn0717832	T	C	98.1 %	0 %	26.6 %	308
<i>Lr28</i>	4AL	cfn2248852	C	G	100 %	0 %	0.0 %	402
		cfn2281514	A	C	100 %	0 %	0.0 %	306

- Marqueurs diagnostiques identifiés pour les gènes *Lr1*, *Lr3*, *Lr9*, *Lr24*, *Lr28*;
- *Lr13* (chr2BS), introgression de 534 Mbp (absence de recombinaison) dont 637 SNP;
- *Lr14a* (chr7BL), polymorphisme présence/absence (Kolodziej et al., 2021);
- *Lr37* (chr2AS), introgression de 128 Mbp dont 31 SNP.



Cartographie de précision des QTL de résistance

Stratégie suivie pour la cartographie génétique de précision des QTL de résistance

> Identification de variétés de blé tendre partiellement résistantes

- Criblage des variétés élites pour leur niveau de résistance partielle

> Cartographie génétique des QTL dans des populations recombinantes

- Construction des populations recombinants biparentales
- Génotypage et construction d'une carte génétique consensus
- Phénotypage des populations recombinants au champ

Résumé des
projets 2004,
2008, 2012

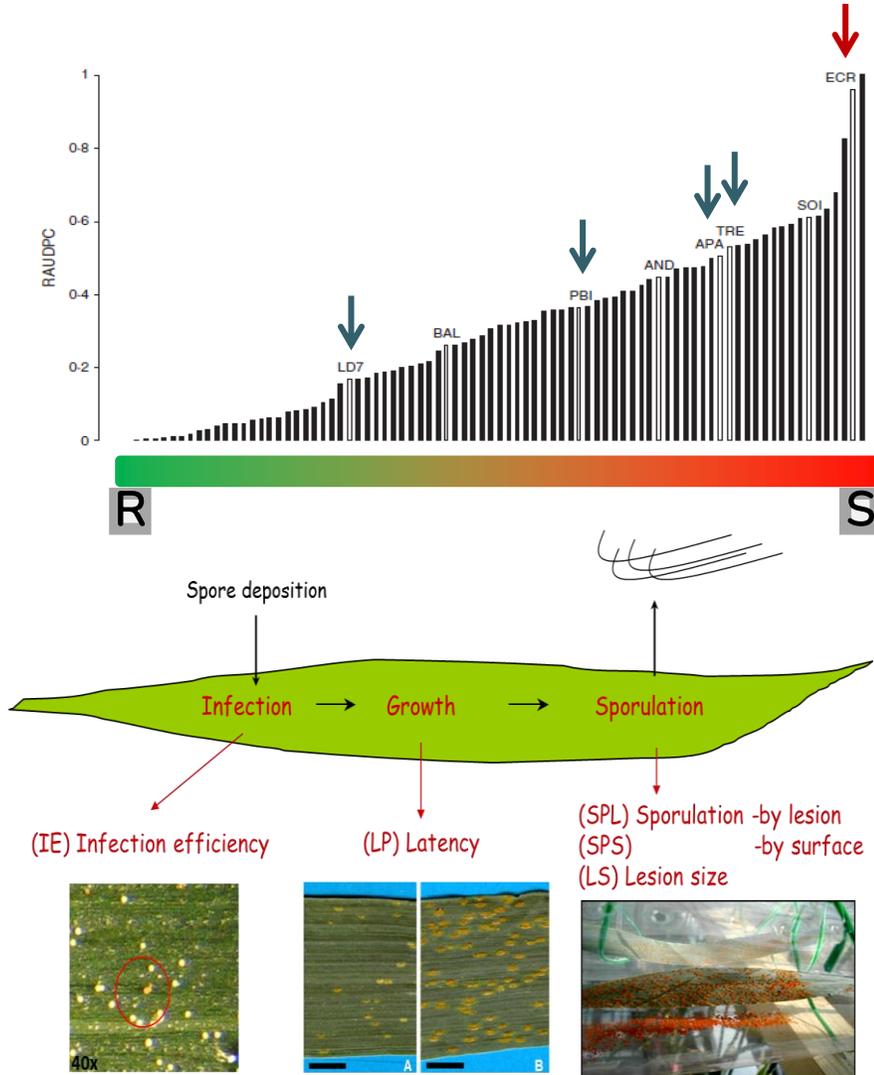
> Cartographie de précision et production de marqueurs diagnostiques (2016-2020)

- Criblage des recombinaisons dans les intervalles QTL
- Génotypage locus spécifique des individus recombinants identifiés
- Evaluation phénotypique des individus recombinants au champ



Cartographie de précision des QTL de résistance

Identification de variétés de blé tendre partiellement résistantes



- 6 variétés avec des profils de résistance différents: Apache, PBI, Trémie, LD7, Sidéral, Renan
- 2 parents sensibles: **Ecrin**, **Chinese Spring**

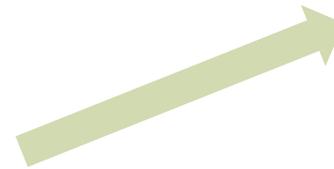


Cartographie de précision des QTL de résistance

Cartographie génétique des QTL dans les populations recombinantes

6 populations de cartographie biparentales :

- 6 parents partiellement résistants
- 2 parents sensibles
 - **Ecrin** (commun pour 5 populations)
 - **Chinese Spring**



Génotypage réalisé avec :

- Illumina iSelect 90K
- Affymetrix Axiom 410K

Populations	Abréviations	Type	Nombre lignées	Génotypage	Phénotypage
Apache x Ecrin	POP1 (AE)	SSD F7	180	iSelect 90k	2013
PBI x Ecrin	POP2 (PE)	SSD F7	115	iSelect 90k	2013
Trémie x Ecrin	POP3 (TE)	SSD F7	124	iSelect 90k	2013
LD7 x Ecrin	POP4 (LE)	HD	142	iSelect 90k	2012
Sidéral x Ecrin	POP5 (SE)	HD	98	iSelect 90k	2015
Renan x Chinese-Spring	POP6 (RCS)	SSD F6	298	TaBW420k	2015

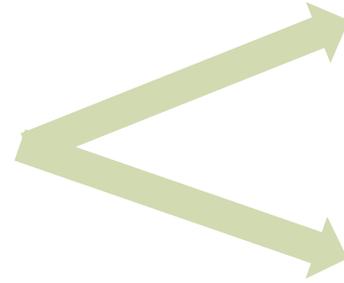


Cartographie de précision des QTL de résistance

Cartographie génétique des QTL dans les populations recombinantes

6 populations de cartographie biparentales :

- 6 parents partiellement résistants
- 2 parents sensibles
 - **Ecrin** (commun pour 5 populations)
 - **Chinese Spring**



Génotypage réalisé avec :

- Illumina iSelect 90K
- Affymetrix Axiom 410K

Phénotypage réalisé :

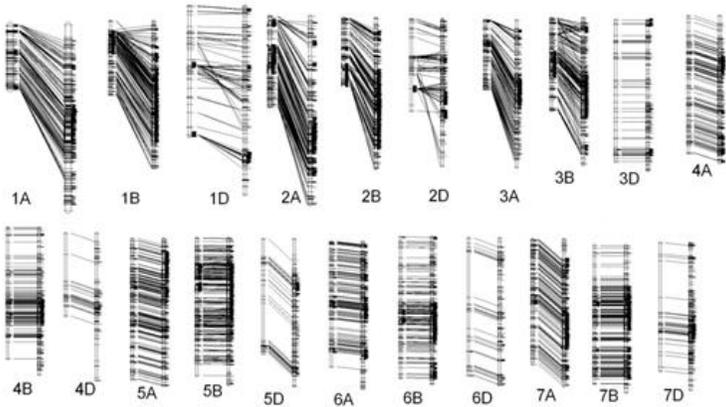
- Différentes localités au champ
- Différentes dates d'observation

Populations	Abréviations	Type	Nombre lignées	Génotypage	Phénotypage
Apache x Ecrin	POP1 (AE)	SSD F7	180	iSelect 90k	2013
PBI x Ecrin	POP2 (PE)	SSD F7	115	iSelect 90k	2013
Trémie x Ecrin	POP3 (TE)	SSD F7	124	iSelect 90k	2013
LD7 x Ecrin	POP4 (LE)	HD	142	iSelect 90k	2012
Sidéral x Ecrin	POP5 (SE)	HD	98	iSelect 90k	2015
Renan x Chinese-Spring	POP6 (RCS)	SSD F6	298	TaBW420k	2015

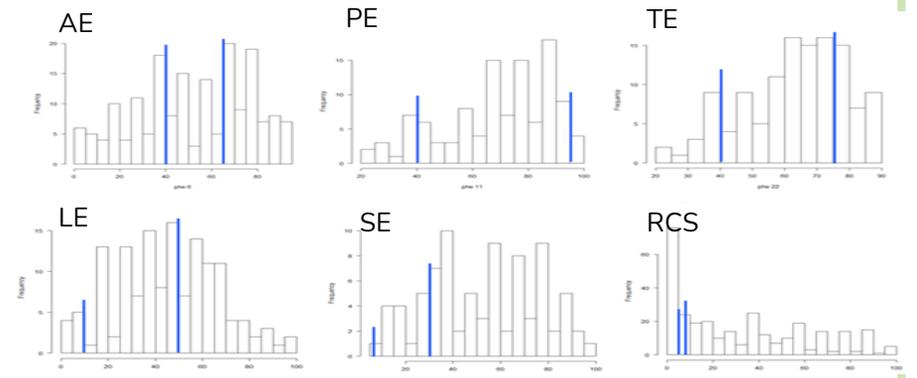


Cartographie de précision des QTL de résistance

Cartographie génétique des QTL dans les populations recombinantes biparentales

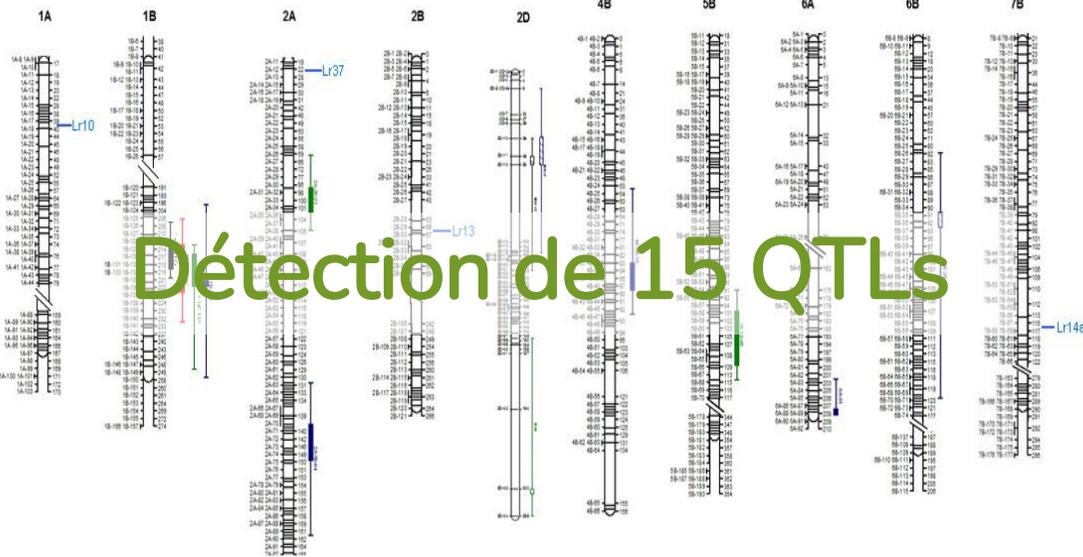


6 populations recombinantes biparentales



Construction d'une carte génétique consensus

Phénotypage de la population au champ



Détection de 15 QTLs



Cartographie de précision des QTL de résistance

Cartographie génétique des QTL dans les populations recombinantes

- 15 QTL de résistance détectés, dont:
 - 3 QTL robustes (4B, 5B, 6D)
 - 1 QTL détecté dans 5 populations (1B)
 - 3 QTL expliquent la résistance de Renan (2A, 2B, 3D)
- Est-ce que *Rptq-1B* explique un facteur de sensibilité ?
 - QTL stable et à effet fort
 - Aucune évidence pour de la spécificité d'isolat
 - Détecté dans les 5 populations ayant le même parent sensible Ecrin
- Sélection de 5 QTL pour la cartographie de précision *

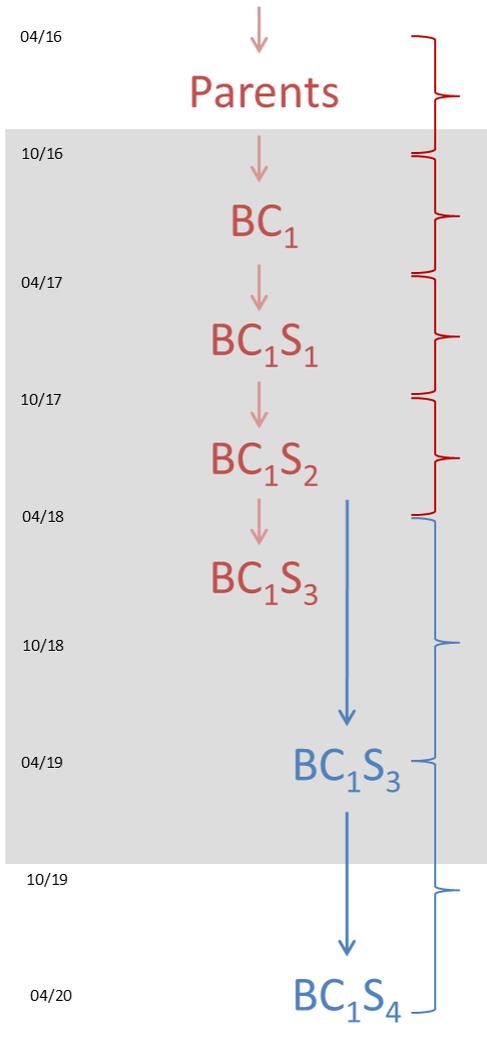
QTL	POP	R ²
<i>Rptq-4B*</i>	LE	5-8%
<i>Rptq-5B*</i>	TE	10-16%
<i>Rptq-6D*</i>	SE	6-33%
<i>Rptq-2A*</i>	RCS	5-14%
<i>Rptq-2B</i>	RCS	6-10%
<i>Rptq-3D</i>	RCS	5-10%
<i>Rptq-1B*</i>	POP1-5	10-67%



Cartographie de précision des QTL de résistance

Criblage des recombinaisons dans les intervalles QTL

Sélection d'une lignée par QTL



- Pour chaque QTL ciblé, sélection d'un descendant RIL portant le QTL ciblé mais aucun des autres QTL détectés dans la même population;
- Rétrocroisement BC₁ du descendant sélectionné avec le parent sensible ECRIN ou CHINESE-SPRING;
- Criblage de la population BC₁S₁ à l'aide de marqueurs bordant le QTL ciblé afin d'identifier des individus recombinants dans l'intervalle QTL;
- Criblage des familles BC₁S₂ des individus recombinants afin d'identifier des individus recombinants homozygotes;
- Multiplication des semences des recombinants homozygotes (BC₁S₃);
- Evaluation phénotypique et génotypage des recombinants (BC₁S₄).



Cartographie de précision des QTL de résistance

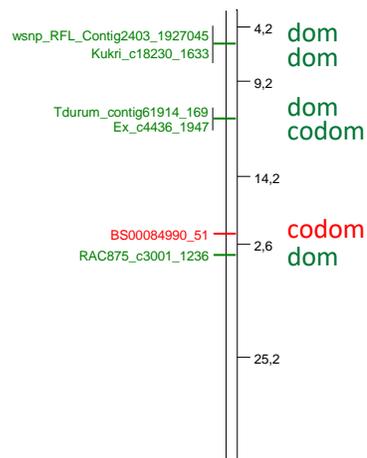
Criblage des recombinaisons dans les intervalles QTL

- Criblage BC₁S₁ et BC₁S₂ avec 4 **marqueurs bordant** et 1 **marqueur pic**
- Marqueurs SNPs convertis en marqueurs KASP @ LGC Science



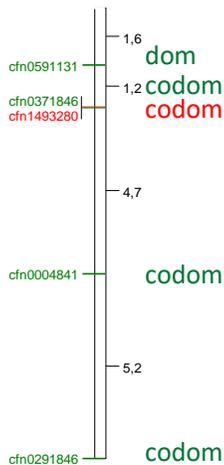
Pop_A	Pop_C	Pop_D	Pop_B	Pop_F	Pop_E
<i>Rptq-1B</i>	<i>Rptq-1B</i>	<i>Rptq-2A</i>	<i>Rptq-4B</i>	<i>Rptq-5B</i>	<i>Rptq-6D</i>

Chr1B



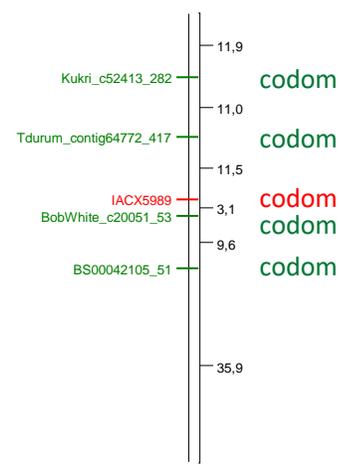
7 SNPs pour LD7/Ecrin

Chr2A



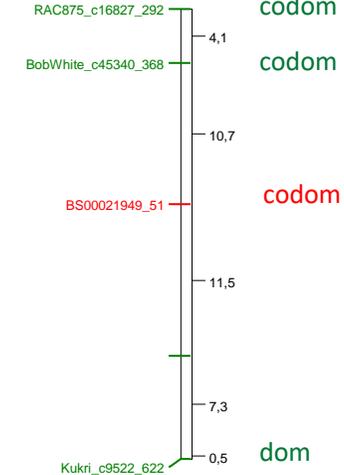
121 SNPs pour Renan/CSS

Chr4B



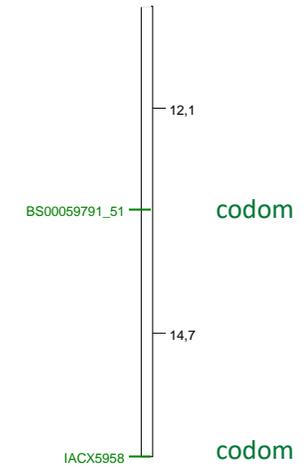
165 SNPs pour LD7/Ecrin

Chr5B



774 SNPs pour Tremie/Ecrin

Chr6D



96 SNPs pour Sideral/Ecrin

SNPs disponibles



Cartographie de précision des QTL de résistance

Criblage des recombinaisons dans les intervalles QTL

- Criblage BC₁S₁ et BC₁S₂ avec 4 **marqueurs bordant** et 1 **marqueur pic**
- Marqueurs SNPs convertis en marqueurs KASP @ LGC Science

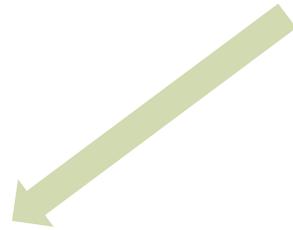


<i>Population</i>	<i>QTL</i>	<i>Cross</i>	Criblage BC ₁ S ₁ 2017		Criblage BC ₁ S ₂ 2018		BC ₁ S ₃ 2019	BC ₁ S ₄ 2020
			<i>Plant NR</i>	<i>Recomb.</i>	<i>Plant NR*</i>	<i>Recomb. NR</i>	<i>Recomb. NR</i>	<i>Recomb. NR</i>
Pop_A	<i>Rptq-1B</i>	LE106	599	182	499	63	72	72
Pop_C	<i>Rptq-1B</i>	LE146	596	48	356	45	44	43
Pop_B	<i>Rptq-4B</i>	LE116	627	181	1135	139	148	145
Pop_F	<i>Rptq-5B</i>	TE162	614	79	578	72	64	64
Pop_E	<i>Rptq-6D</i>	SE031	609	170	1041	128	115	114
Pop_D	<i>Rptq-2A</i>	RC3146	544	108	844	105	106	106
			3 589	768	4 453	552	549	544



Populations recombinantes

Génotypage et
construction de
cartes génétiques



SNPseq



Populations recombinantes

Génotypage

- Cartographie de saturation avec tous les marqueurs disponibles sur les puces SNPs dans les intervalles QTL (n=1137)
- SNPseq (design ST5229G_2): amplification ciblée des séquences contextes des marqueurs SNPs suivie de séquençage haut-débit
- Les 544 recombinants homozygotes (BC₁S₄) ont été génotypés avec 1137 marqueurs SNP ciblés; taux de réussite 57%

Genotyping seqSNP: 544 genotype_ 649 seqSNP

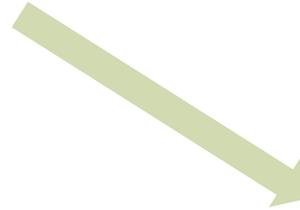
Chromosome	Population	markers	LGC_v2	LGC_failed
1B	A	168	116	65
1B	C			
2A	D	236	160	79
4B	B	223	98	139
5B	F	306	155	169
6D	E	204	120	97
	544	1137	649	549

↑ Successful ↑ Failed



Cartographie de précision et production de marqueurs diagnostiques

Populations recombinantes



Génotypage et construction de cartes génétiques

SNPseq



Phénotypage des populations au champ



Isolat BT06M140



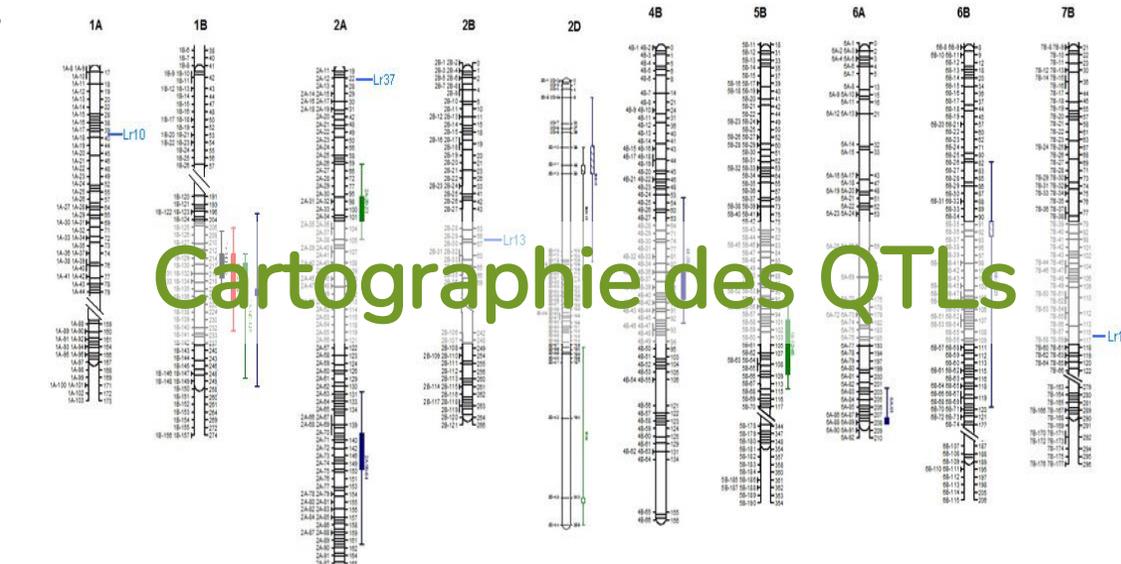
Cartographie de précision des QTL de résistance

Cartographie de précision et production de marqueurs diagnostiques

Populations recombinantes

Génotypage et construction de cartes génétiques

Phénotypage des populations au champ

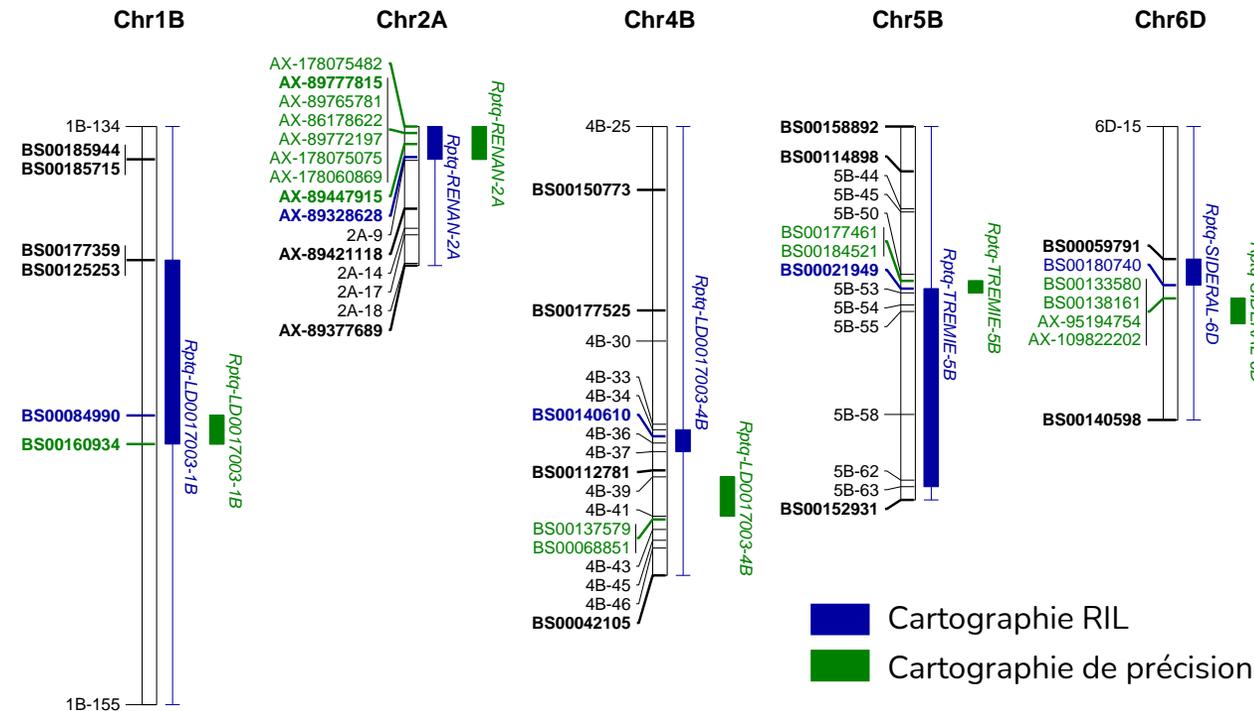
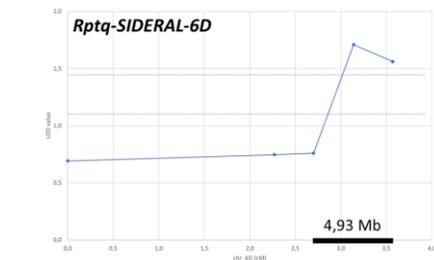
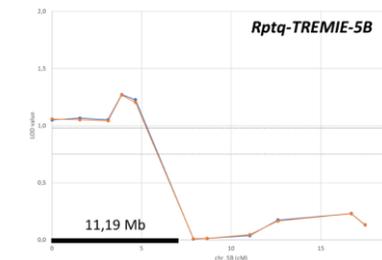
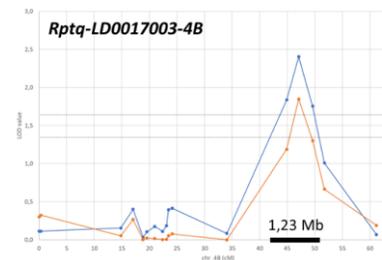
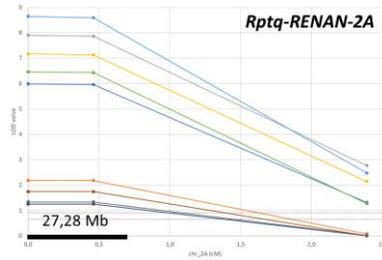


Cartographie des QTLs



Cartographie de précision des QTL de résistance

Cartographie de précision et production de marqueurs diagnostiques



- Les intervalles de 4 QTL sont réduits à des régions comprises entre 1,23 et 11,19 Mb.
- *Rptq-2A* pourrait correspondre à *Lr37*, introduit dans Renan via une petite translocation d'environ 27,28 Mb provenant de *Aegilops ventricosa*.



Ce qu'il faut retenir...

Importance du suivi des populations de *Puccinia* sp. et des gènes *Lr*

- Le suivi des populations et la postulation des gènes *Lr* dans les variétés élites sont indispensables à l'identification puis à la validation des marqueurs moléculaires diagnostiques desdits gènes *Lr*.

Identification de marqueurs diagnostiques des gènes *Lr*

- Dans 5/8 cas, l'approche par BSA a permis de réduire l'intervalle des gènes *Lr* correspondants puis d'identifier des marqueurs moléculaires diagnostiques.

Identification de marqueurs diagnostiques des QTL

- Dans 4/5 cas, l'approche de cartographie de précision a permis de fortement réduire l'intervalle comprenant les QTL et d'identifier des marqueurs associés à ces résistances.

- Transformation des marqueurs identifiés en KASP ...





BIOGER

Henriette GOYEAU
Anne-Lise BOIXEL
Sabine CADOUX
Roula SHAMSI

GDEC

Pierre SOURDILLE

IGEPP

Rémi PERRONNE
Bernard ROLLAND



merci

C. E. T. A. C.



AgriObtentions
Caussade Semences
Florimond Desprez
KWS-Momont
Lemaire Deffontaines
Lidea Seeds
Limagrain
RAGT 2n
Secobra
Syngenta
Unisigma

