

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

Thierry C MARCEL¹, Roula SHAMSI¹, Sabine CADOUX^{1,2}, Faharidine MOHAMADI³, Pierre SOURDILLE⁴, Rémi PERRONNE⁵, Bernard ROLLAND⁵, Philippe DU CHEYRON⁶, GIE RGC⁷, CETAC², Anne-Lise BOIXEL¹, Henriette GOYEAU^{1*}

1 - Université Paris Saclay, INRAE, UR BIOGER, 78850 Thiverval-Grignon, France ;

2 - Centre Technique pour l'Amélioration des Céréales, 7 Rue Coq-Héron, 75030 Paris CEDEX -01, France ;

3 - ARVALIS Institut du Végétal, 91720 Boigneville, France ;

4 - Université Clermont-Auvergne, INRAE, UMR GDEC, 63000 Clermont-Ferrand, France ;

5 - IGEPP, INRAE, Institut Agro, Univ Rennes, 35653, Le Rheu, France ;

6 - ARVALIS Institut du Végétal, 91190 Villiers-le-Bâcle, France ;

7 - GIE Recherches Génétiques Céréales, 7 Rue Coq-Héron, 75030 Paris CEDEX-01, France ;

***Coordinateur** : **Henriette GOYEAU**, henriette.goyeau@inrae.fr

1 Introduction

Le champignon basidiomycète *Puccinia triticina* Erikss est responsable de la rouille brune sur le blé tendre, le blé dur et le triticale. C'est un parasite obligatoire et biotrophe qui nécessite d'infecter un hôte vivant pour compléter son cycle de vie. La maladie se développe généralement tardivement mais peut provoquer d'importants dégâts si elle s'avère mal contrôlée. Le niveau de résistance des variétés de blé tendre françaises à la rouille brune présente une grande variabilité. Les gènes de résistance à cette maladie sont qualifiés de gènes *Lr* (pour *leaf rust*). A ce jour, 80 gènes *Lr* ont été identifiés chez le blé (Aktar-Uz-Zaman *et al.*, 2017 ; Kumar *et al.*, 2021), dont la plupart sont impliqués dans des interactions gène-pour-gène avec les isolats de rouille brune, et ont donc été contournés (Babayants *et al.*, 2015 ; Safavi & Afshari, 2012).

Au moins 14 de ces gènes *Lr* sont présents dans les variétés cultivées en France, seuls ou en combinaison de deux, trois ou quatre gènes (Goyeau & Lannou, 2011). La plupart de ces combinaisons sont contournées, car les populations françaises de *P. triticina* sont très diversifiées, avec des pathotypes complexes cumulant couramment plus de dix virulences (Goyeau *et al.*, 2006). Ces populations évoluent rapidement, en suivant l'évolution des combinaisons de gènes de résistance composant le paysage variétal (Goyeau & Lannou, 2011 ; Papaix *et al.*, 2011). Il est donc important de poursuivre la diversification des combinaisons de gènes de résistance introduits dans les variétés de blé françaises, et de suivre l'évolution des virulences dans les populations de *P. triticina*. Ce travail nécessite notamment de diagnostiquer la présence des gènes *Lr* dans les variétés, soit par une approche phénotypique de postulation de ces gènes, soit par l'utilisation de marqueurs moléculaires diagnostiques. La postulation des gènes de résistance *Lr* est réalisée à INRAE Bioger depuis plus de deux décennies. Les variétés sont inoculées avec une gamme d'isolats différentiels pour les virulences qu'ils portent, permettant de déduire la présence ou l'absence des gènes *Lr* (Goyeau & Lannou, 2011). Cette approche phénotypique peut être limitée par l'absence de certaines virulences dans les populations de l'agent pathogène (donc pas de souche différentielle

disponible, ex. *Lr9*) ou par la complexité de prédire la présence de plusieurs gènes *Lr* au sein d'une même variété (les effets des uns cachant les effets des autres). Dans ces situations, la disponibilité de marqueurs moléculaires diagnostiques de la présence des gènes *Lr* peut être tout à fait complémentaire de la méthode de postulation. Pour une bonne partie des gènes *Lr*, des marqueurs ont été proposés dans la bibliographie (McIntosh *et al.*, 2010), mais dans la plupart des cas, le pouvoir diagnostique de ces marqueurs demeure faible car ils restent génétiquement trop éloignés des gènes *Lr*.

Certains gènes *Lr* ne sont pas spécifiques de l'isolat et confèrent un niveau partiel de résistance aux variétés dans lesquelles ils ont été introduits ; c'est le cas de *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* et *Lr68* (El-Orabey *et al.*, 2019). Ces gènes de résistance partielle sont souvent pléiotropes, ayant une efficacité contre plusieurs maladies ou agents pathogènes. De nombreux gènes de résistance partielle contre la rouille brune ont été identifiés mais n'ont pas été nommés « *Lr* ». Il s'agit principalement de QTL cartographiés par analyse de liaison dans des populations recombinantes bi- ou multi-parentales (Rollar *et al.*, 2021) ou par génétique d'association (GWAS) dans des panels de variétés (Fatima *et al.*, 2020). Ces résistances partielles, également appelées résistances quantitatives, sont importantes pour l'amélioration du niveau de résistance des variétés car leur efficacité est réputée plus durable (Figlan *et al.*, 2020 ; Niks *et al.*, 2015). Les travaux conduits dans plusieurs projets FSOV précédents ont mis en évidence la présence, dans le pool génétique utilisé en France, de résistances quantitatives de bon niveau (Goyeau *et al.*, 2010), agissant sur des composantes diverses du cycle du pathogène, et donc pouvant être basées sur des mécanismes diversifiés (Azzimonti *et al.*, 2013, 2014). Le projet « Rouille Brune » (FSOV 2012 Q) a permis d'obtenir une cartographie de 15 QTL de résistance à la rouille brune provenant de 6 variétés françaises partiellement résistantes. Parmi ces QTL, 1 QTL a été identifié dans 5 des 6 populations recombinantes utilisées ayant le même parent sensible, Ecrin, suggérant que ce QTL pourrait être un facteur de sensibilité ; 3 QTL ont été identifiés pour avoir un effet particulièrement robuste et fort dans les parents LD0017003, Tremie et Sideral, respectivement ; et 3 QTL ont été identifiés qui expliquent le fort niveau de résistance de la variété



Renan à la rouille brune. Toutefois, les intervalles de confiance de ces QTL restent souvent larges, et il demeure donc difficile d'identifier des marqueurs diagnostiques sans une étape de cartographie fine de ces QTL.

Au sein du projet « MaBrune », nous avons utilisé des outils de phénotypage pour suivre les virulences dans les populations de *P. triticina* et postuler les gènes de résistance présents dans les variétés de blé françaises. L'objectif du projet était également de développer des outils moléculaires, complémentaires des outils de phénotypage, via l'identification de marqueurs moléculaires diagnostiques de la présence de gènes *Lr* et de QTL de résistance à cette maladie.

2 Matériel et méthode

► Suivi annuel des populations de *P. triticina*

De 2016 à 2021, un suivi annuel des populations françaises de *Puccinia triticina* a été réalisé. Ce suivi a impliqué la collecte de 274 souches par an en moyenne sur les variétés les plus cultivées, leur purification, leur multiplication et leur caractérisation par phénotypage sur une gamme d'hôtes différentiels. Chaque souche collectée a ainsi été inoculée sur la gamme d'hôtes différentiels au stade plantule. La procédure consiste à pulvériser une suspension de spores dans de l'huile minérale à hauteur de 3 mg de spores par mL de Soltrol® sur les plantes qui sont ensuite placées en chambre de rosée à 15°C pendant 24 heures (Goyeau *et al.*, 2006). Neuf jours plus tard, à l'issue d'une période d'incubation à 18°/22°C, les types d'infection que la souche produit sur cette gamme de variétés, ne possédant chacune qu'un seul gène de résistance bien identifié, sont notés selon l'échelle de Stakman *et al.* (1962). Chacune des 1646 souches a ainsi pu être caractérisée et dénommée par un code à 7 chiffres qui traduit son profil de virulence vis-à-vis de vingt gènes de résistance du blé (*Lr1*, *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr3*, *Lr3bg*, *Lr3ka*, *Lr10*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr15*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr20*, *Lr23*, *Lr26*, *Lr17b*, *Lr37*, *Lr24*, *Lr28*).

► Identification de marqueurs diagnostiques des gènes *Lr*

Nous avons utilisé 8 lignées quasi-isogéniques, portant les gènes de résistance *Lr1*, *Lr3*, *Lr9*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr24*, *Lr28* et *Lr37*, dans le fond génétique de la variété sensible Thatcher (Tableau 1). Ces lignées ont été sélectionnées parce qu'elles portaient un gène de résistance fréquemment postulé dans les variétés de blé tendre françaises ou un gène de résistance encore non contourné dans les populations françaises de *P. triticina* (cas de *Lr9*). Afin d'identifier des marqueurs moléculaires liés à ces gènes de résistance nous avons suivi la stratégie nommée « Bulk Segregant Analysis » (BSA), décrite par Michelmore *et al.* (1991). Les 8 lignées ont été retro-croisées avec Thatcher afin d'obtenir des grains BC₁. Après autofécondation, des populations BC₁S₁ ont été obtenues ne ségrégant que pour l'introgession portant le gène *Lr* ciblé. Selon le nombre de grains disponibles, entre 97 et 146 individus BC₁S₁ par croisement ont été semés puis inoculés avec une souche avirulente (Tableau 1), selon la procédure décrite précédemment pour le suivi annuel des populations. Pour chaque croisement, le type d'infection

de chaque individu a été observé afin d'établir les ratios de plantes ayant un type d'infection sensible ou résistant, ou intermédiaire dans le cas des gènes *Lr3* et *Lr28*. Entre 21 et 30 individus ont été sélectionnés par croisement et par type d'infection observé, constituant ainsi 18 groupes d'individus. Les ADN de ces individus ont été extraits suivant la procédure au CTAB, puis mélangés en proportions équimolaires pour chaque groupe d'individus. Les 18 groupes d'individus, ainsi que le parent récurrent Thatcher, ont été génotypés sur la puce Affymetrix Axiom 410K développée dans le cadre du projet Breedwheat (Kitt *et al.*, 2021 ; Danguy des Déserts *et al.*, 2021 ; Paux *et al.*, 2022) par la plateforme Gentyane (INRAE, Clermont-Ferrand, France). Les marqueurs SNP polymorphes entre les groupes d'individus sensibles et résistants ont été retenus pour évaluation de leur valeur diagnostique, c'est-à-dire capacité de détecter la présence ou l'absence du gène *Lr* considéré. Seuls les marqueurs ayant une valeur diagnostique supérieure à 98 % ont été retenus (Tableau 2). Cette valeur diagnostique des marqueurs polymorphes a été déterminée sur des panels de variétés de blé pour lesquelles étaient disponibles à la fois : le génotypage Affymetrix Axiom 410K et la postulation de la présence/absence des gènes *Lr*. La postulation des gènes *Lr* dans les nouvelles variétés inscrites au catalogue français est réalisée à INRAE Bioger depuis 1999. Sur la durée du projet MaBrune, le phénotypage en serre de 184 variétés nouvellement inscrites, vis-à-vis de vingt isolats standards de *P. triticina* aux virulences connues, a permis de postuler les gènes de résistance portés par ces variétés ; déduction résultant de l'analyse de leur profil de types d'infection vis-à-vis des virulences portées par chacun des isolats (Goyeau & Lannou, 2011).

► Cartographie de précision des QTL de résistance

Cinq QTL de résistance à *P. triticina* ont été choisis parmi ceux identifiés précédemment pour l'amplitude de leur effet (c.à.d. le pourcentage de variabilité expliquée R²) et la robustesse de leur effet à travers différents environnements (Tableau 3). Quatre de ces QTL proviennent des populations LD0017003/Ecrin, Tremie/Ecrin et Sideral/Ecrin qui ont été génotypés sur la puce Illumina Infinium iSelect 90K (Wang *et al.*, 2014) ; Ecrin étant le parent sensible. Le cinquième QTL est porté par la variété Renan et a été identifié dans la population Renan/Chinese-Spring, génotypée avec la puce Affymetrix Axiom 410K (Kitt *et al.*, 2021 ; Danguy des Déserts *et al.*, 2021 ; Paux *et al.*, 2022). Afin de construire une carte génétique pouvant servir de pont entre les marqueurs présents sur ces deux puces de génotypage, 159 individus de la population Renan/Chinese-Spring ont également été génotypés sur la puce Illumina Infinium iSelect 90K par TraitGenetics GmbH (Gatersleben, Germany). La nouvelle carte génétique de Renan/Chinese-Spring, combinant les marqueurs des deux puces, a été construite à l'aide du logiciel MultiPoint (Ronin *et al.*, 2017) et a été décrite par Langlands-Perry *et al.* (2022). Pour chacun des 5 QTL choisis, un individu de la population d'origine a été sélectionné qui porte l'allèle de résistance du QTL ciblé et les allèles de sensibilité des autres QTL détectés dans cette même population (Tableau 3) ; Rptq-1B a été identifié dans 5 populations différentes mais c'est

un individu de la population LD0017003/Ecrin qui a été sélectionné. Les individus sélectionnés ont été retro-croisés avec le parent sensible de la population d'origine, Ecrin ou Chinese-Spring, afin d'obtenir des grains BC1. Après autofécondation, des populations BC1S1 ont été obtenues, ne ségrégant que pour l'allèle résistant ou sensible du QTL ciblé. Ces populations ont été criblées à l'aide de 2 à 5 marqueurs SNP, encadrant l'intervalle de confiance du QTL, convertis en marqueur KASP (Kompetitive Allelic Specific PCR) par LGC Genomics Ltd (Hoddesdon, Royaume-Uni), afin d'identifier des individus recombinants. Ces mêmes marqueurs ont été utilisés pour cribler les familles BC1S2 des individus recombinants afin d'identifier des individus recombinants homozygotes (donc génétiquement fixés dans l'intervalle du QTL considéré). Les individus recombinants homozygotes ont ensuite été génotypés par une approche de SNP-seq, ciblant l'ensemble des marqueurs SNP des deux puces ayant été cartographiés dans l'intervalle des QTL ciblés, par LGC Genomics Ltd (Hoddesdon, Royaume-Uni). Ces mêmes individus recombinants homozygotes ont été évalués au cours d'essais plein champ multi-locaux pour leur niveau de résistance à l'isolat BT06M140 appartenant au pathotype P5 (virulent pour *Lr1*, *Lr2c*, *Lr3*, *Lr10*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr15*, *Lr17*, *Lr17b*, *Lr20*, *Lr23*, *Lr26*, *Lr27+Lr31*, *Lr37*). L'inoculation a été réalisée par pulvérisation d'une suspension de spores dans de l'huile minérale Soltrol® (Phillips Petroleum) (2mL par mètre linéaire à concentration de 9 mg spores/mL). Ces données de génotype et de phénotype ont permis de réaliser une nouvelle analyse de liaison à l'aide du logiciel R/qtl afin de réduire l'intervalle de confiance des 5 QTL ciblés. Les positions des marqueurs sur le génome de référence du blé RefSeq v1.0 (IWGSC, 2018) ont permis d'évaluer la taille physique de ces intervalles.

3 Résultats

► Suivi annuel des populations de *P. triticina*

De 2016 à 2021, une trentaine de pathotypes, cumulant de 10 à 16 virulences, a été détectée chaque année dans les populations collectées. Des changements de populations ont eu lieu sur la période d'étude en réponse à l'évolution des résistances portées par les variétés cultivées, ce qui s'est traduit par une chute des niveaux de résistance de certaines variétés (ex. Oregrain, Némou ou Filon). La fréquence des races virulentes sur *Lr28*, détectées dès l'inscription de variétés porteuses de ce gène majeur de résistance en 2011, a fortement augmenté avec le succès de certaines

variétés portant *Lr28*. Ainsi, les pathotypes virulents 28 n'ont cessé de progresser pour représenter en 2017 pratiquement la moitié de la population échantillonnée. Les pathotypes virulents 28, au départ diversifiés (une dizaine de pathotypes répartis dans 4 familles différentes en 2016), appartiennent désormais à 87 % à la famille 106 314 2 (virulente *Lr28*, avirulente *Lr3* et *Lr24*) qui est apparue en 2015. Une seconde famille, la famille 166 (avirulente *Lr28* et *Lr24*, virulente *Lr3*), se maintient depuis 2011 au-dessus de 40 %, et partage maintenant le paysage avec les pathotypes virulents 28. Depuis 2019, des pathotypes virulents sur *Lr24*, mais également combinant les virulences 24 et 28, sont de nouveau retrouvés dans les échantillonnages presque exclusivement issus de RGT Cesario (variété porteuse du gène *Lr24*). La famille 106 314 0 qui a dominé pendant 10 ans (2006-2015), en constituant 30 à 50 % de la population française a, quant à elle, fortement régressé (tout comme les familles avirulentes sur *Lr1* absentes des échantillonnages depuis 2018) : 7 % en 2016 puis un maintien en faible fréquence les années suivantes (1 à 3 %) suite à la disparition des variétés qui l'ont fortement favorisée auparavant (Figure 1).

► Identification de marqueurs diagnostiques des gènes *Lr*

Des croisements entre les lignées quasi-isogéniques porteuses de gènes *Lr* et le parent récurrent sensible Thatcher ont permis d'obtenir des descendants BC₁S₁ ségrégant pour chacun des 8 gènes *Lr* ciblés (Tableau 1). Les types d'infection résistant et sensible ont été visuellement déterminés au sein de chaque descendance ; pour les gènes *Lr3a* et *Lr28* un type d'infection intermédiaire (entre résistant et sensible) a été mis en évidence. Ainsi, les ratios de ces types d'infection ont montré le caractère dominant des résistances *Lr1*, *Lr9*, *Lr13*, *Lr14a* et *Lr24* ; le caractère partiellement dominant des résistances *Lr3a* et *Lr28* ; et le caractère récessif de la résistance *Lr37* (Tableau 1). Suite au génotypage des groupes de plantes résistantes, intermédiaires et sensibles, sur la puce TaBW410K, entre 17 et 637 SNP polymorphes ont été identifiés pour chaque gène *Lr* ciblé. La cartographie in silico de ces marqueurs sur la séquence de référence RefSeq v1.0 de la variété de blé Chinese Spring a permis de délimiter un intervalle physique dans lequel le gène de résistance correspondant doit être localisé. Cet intervalle est très variable d'un gène *Lr* à un autre, les gènes *Lr1*, *Lr3a*, *Lr9* et *Lr14a* étant localisés dans des intervalles de moins de 20 millions de paires de base (Mb), *Lr24*, *Lr28* et *Lr37* dans des intervalles de 70 à 141 Mb, et *Lr13* dans un intervalle de 534 Mb indicatif d'une (quasi-)absence de

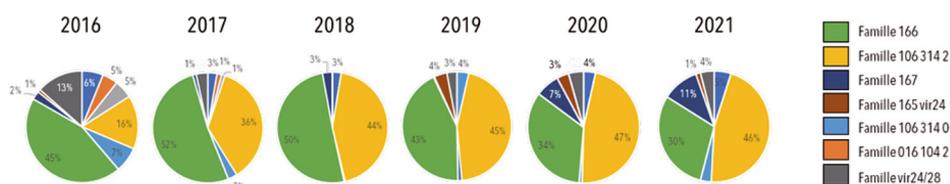


Figure 1: Evolution des différentes familles de pathotypes de *Puccinia triticina* d'après les enquêtes annuelles conduites en France sur la période 2016-2021. Une famille est composée de pathotypes différents sur 2 ou 3 virulences maximum et qui présentent le même génotype SSR (19 marqueurs microsatellites). Ces familles sont désignées soit par le code de leur pathotype majoritaire, soit par les 3 premiers chiffres du code du pathotype dominant de la famille.

Tableau 1. Résultats de la « Bulk Segregant Analysis » suite aux croisements entre lignées quasi-isogéniques porteuse des gènes *Lr* ciblés et le parent sensible récurrent Thatcher.

La dominance des gènes, le nombre de marqueurs polymorphes entre les groupes d'individus sensibles et résistants, et la taille délimitée par ces marqueurs sont indiqués.

Gène	Lignée Thatcher	Isolat utilisé	Effectif analysé	Ratio ¹ R:S ou R:I:S	Dominance	Nb de SNP	Intervalle (Mb) ²
<i>Lr1</i>	RL6003	B950019-A	140	78:22	dominant	17	2
<i>Lr3a</i>	RL6002	B950019-A	140	55:22:23	dominant partiel	110	18
<i>Lr9</i>	RL6010	B950019-A	146	72:28	dominant	44	9
<i>Lr13</i>	RL6001	8950019-A	145	77:23	dominant	637	534
<i>Lr14a</i>	RL6013	B950506-A	97	69:31	dominant	18	16
<i>Lr24</i>	RL6064	8950019-A	113	71:29	dominant	73	141
<i>Lr28</i>	RL6079	B950019-A	146	26:53:21	dominant partiel	104	70
<i>Lr37</i>	RL6081	8950506-A	106	32:68	récessif	31	128

¹ R : résistant, I : intermédiaire, S : sensible ;

² Millions de paires de bases (Mb) sur le génome de référence du blé (RefSeq v1.0).

Tableau 2. Marqueurs diagnostiques identifiés pour 5 gènes *Lr* de résistance du blé à *Puccinia triticina*.

Gène	Chr.	Probe	Nom du SNP	R ¹	S ²	VD ³	FN ⁴	FP ⁵	Effectif ⁶
<i>Lr1</i>	5DL	AX-89495847	cfn2809161	A	T	99.2 %	5.9 %	5.9 %	517
		AX-89713092	cfn2809027	T	C	99.5 %	0 %	5.9 %	517
<i>Lr3a</i>	6BL	AX-89705828	cfn3039991	A	G	99.7 %	0 %	3.1 %	203
		AX-89542260	cfn0182781	G	C	99.7 %	0 %	3.0 %	306
<i>Lr9</i>	6BL	AX-89454213	cfn0001653	G	C	99.7 %	0 %	2.9 %	298
		AX-89672751	cfn2990662	A	G	100 %	0 %	0.0 %	53
<i>Lr24</i>	3DL	AX-89563490	cfn0857299	T	A	100 %	0 %	0.0 %	53
		AX-89471973	cfn2209796	T	C	99.3 %	0 %	8.3 %	145
<i>Lr28</i>	4AL	AX-89505010	cfn0717832	T	C	98.1 %	0 %	26.6 %	308
		AX-89351673	cfn2248852	C	G	100 %	0 %	0.0 %	402
		AX-89676287	cfn2281514	A	C	100 %	0 %	0.0 %	306

¹ Allèle résistant au SNP ;

² Allèle sensible au SNP ;

³ Valeur diagnostique du SNP ;

⁴ Pourcentage de faux négatifs ;

⁵ Pourcentage de faux positifs ;

⁶ Nombre de variétés pour lesquelles les données à la fois de génotypage et de phénotypage étaient disponibles et qui ont permis d'identifier un ou plusieurs marqueurs diagnostiques.

Tableau 3. Résultats de la cartographie de précision de 5 QTL de résistance à la rouille brune du blé, causée par *Puccinia triticina*.

Le nombre d'individus recombinants identifiés, le nombre de marqueurs obtenus pour la caractérisation de ces recombinants, et la taille de l'intervalle QTL après cartographie fine sont indiqués.

Nom du QTL	Parent donneur	R ² 1	SSD ou DH ²	Parent récurrent	Nb de recomb.	Nb de SNP	Intervalle (Mb) ³
<i>Rptq-1B</i>	LD0017003	10-67 %	Ld7/Ecr146	Ecrin	72	7	4,08
<i>Rptq-2A</i>	Renan	5-14 %	RCS-3146	Chinese Spring	106	27	27,28
<i>Rptq-4B</i>	LD0017003	5-8 %	Ld7/Ecr116	Ecrin	145	73	1,23
<i>Rptq-5I3</i>	Tremie	10-16 %	Tre/Ecr162	Ecrin	64	94	11,19
<i>Rptq-6D</i>	Sideral	6-33 %	Sid/Ecr031	Ecrin	114	55	4,93

¹ Pourcentage de la variabilité phénotypique expliquée par le QTL lors de l'analyse de la population biparentale avant cartographie fine (le R² varie selon le trait phénotypique considéré) ;

² Individus choisis pour les croisements (SSD : « Single Seed Descent », DH : « Double Haploid ») ;

³ Millions de paires de bases (Mb) sur le génome de référence du blé (RefSeq v1.0).

recombinaison entre l'introgession du chromosome 2BS portant *Lr13* et Thatcher (Tableau 1). Notons toutefois que ces estimations sont faites par rapport à la séquence de référence de la variété Chinese Spring et que la taille des intervalles estimés peut varier selon la variété considérée.

La présence de quatorze gènes *Lr* de résistance spécifique à la rouille brune (*Lr1*, *Lr2a*, *Lr2c*, *Lr3*, *Lr3ka*, *Lr10*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr15*, *Lr20*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr28*, *Lr37*) a été postulée dans plus de 500 variétés de blés cultivées inscrites en France, dont 184 variétés postulées entre 2016 et 2021 au cours du projet MaBrune. Dans ces 184 variétés les plus récentes, ce sont les gènes *Lr37* (101 variétés), *Lr13* (81 variétés), *Lr14a* (63 variétés), *Lr28* (43 variétés), *Lr10* (29 variétés), *Lr3* (27 variétés), *Lr1* (18 variétés) et *Lr24* (17 variétés) qui ont été le plus souvent introduits, seuls ou en combinaisons. Les données de génotypage de ces variétés sur la puce TaBW410K sont également disponibles ; ce qui nous a permis de déterminer une valeur diagnostique (de la présence du gène *Lr*) de tous les marqueurs

polymorphes identifiés par l'approche de génotypage en groupe (BSA). Seulement deux ou trois marqueurs diagnostiques ont été identifiés pour 5 des 8 gènes *Lr* ciblés (Tableau 2). Pour les gènes *Lr13*, *Lr14a* et *Lr37* aucun marqueur ayant une valeur diagnostique supérieure à 98 % n'a été identifié.

► Cartographie de précision des QTL de résistance

Une cartographie génétique de précision a été réalisée pour 5 QTL de résistance choisis pour leur robustesse dans des essais multi-locaux et l'ampleur de leur effet sur le phénotype ; le pourcentage de variabilité phénotypique expliquée étant particulièrement important pour le QTL *Rptq-1B* (Tableau 3 et Figure 2), précédemment identifié dans les 5 populations biparentales ayant le même parent sensible Ecrin. De 2 marqueurs SNP encadrant *Rptq-6D*, à 4-5 marqueurs SNP encadrant les autres QTL (Figure 3), ont été convertis en marqueurs KASP, puis utilisés pour cribler les populations BC1S1 et BC1S2 afin d'identifier

des individus recombinants dans les régions QTL. Ce criblage a permis d'identifier de 64 à 145 individus recombinants homozygotes fixés par QTL (Tableau 3). Tous ces individus ont été génotypés par une approche de SNP-seq ciblant les marqueurs SNP, provenant des puces TaBW410K et iSelect90K, cartographiés dans les régions QTL. Ainsi, de 7 à 94 marqueurs polymorphes ont été obtenus selon le QTL (Tableau 3).

Tous les individus recombinants fixés ont également été évalués en plein champ en 2021, après inoculation avec l'isolat BT06M140. Chaque population recombinante - par QTL - a été évaluée sur 3 sites répartis entre le nord, le centre/ouest et le sud de la France. Des effets significatifs du lieu de phénotypage et de la répétition ont été observés pour toutes les populations (données non présentées). C'est pourquoi les analyses QTL ont été réalisées indépendamment pour chaque lieu, répétition et date d'observation. Les 5 QTL suivis ont à nouveau été détectés dans ces populations de recombinants homozygotes mais la plupart du temps avec un effet relativement faible et pour seulement un ou deux des traits phénotypiques mesurés (Figure 2). Il n'y a que Rptq-2A, provenant de la variété Renan, qui a été identifié sur les 3 sites d'évaluation et pour toutes les répétitions.

Les intervalles de confiance des 5 QTL (LOD-1) ont été comparés entre la cartographie initiale dans les populations recombinantes et la cartographie de précision réalisée au cours du projet MaBrune (Figures 2 & 3). Cet intervalle a été significativement réduit pour Rptq-1B et Rptq-5B, et correspondent à des régions de 4,08 Mb et 11,19 Mb, respectivement. Les intervalles de confiance de Rptq-4B et Rptq-6D n'ont pas été réduits mais sont sensiblement différents des intervalles précédents et correspondent à des régions de seulement 1,23 Mb et 4,93 Mb, respectivement. Enfin, pour Rptq-2A, aucun individu recombinant n'a été identifié dans cet intervalle de confiance (LOD-1) qui est donc resté strictement identique à celui déterminé précédemment et correspond à une région de 27,28 Mb.

4 Discussion

La sélection de variétés résistantes aux maladies est un levier important de la protection des cultures, notamment afin de réduire l'utilisation de produits phytosanitaires. Toutefois, les populations des agents pathogènes peuvent s'adapter aux résistances génétiques qui perdent alors leur efficacité. Il est donc crucial d'optimiser la gestion de ces résistances génétiques afin qu'elles restent efficaces le plus longtemps possible ; c'est ce que l'on appelle la durabilité des résistances. Cette gestion durable des résistances nécessite d'avoir à disposition des outils permettant de connaître les gènes de résistance introduits dans les variétés et le comportement des populations d'agents pathogènes vis-à-vis de ces derniers.

Dans un premier temps, les outils de phénotypage sont indispensables car ils permettent de détecter la présence des gènes de résistance sans même avoir de connaissances sur la position génétique de ces derniers. Ces outils de phénotypage nécessitent d'avoir une bonne connaissance des populations de l'agent

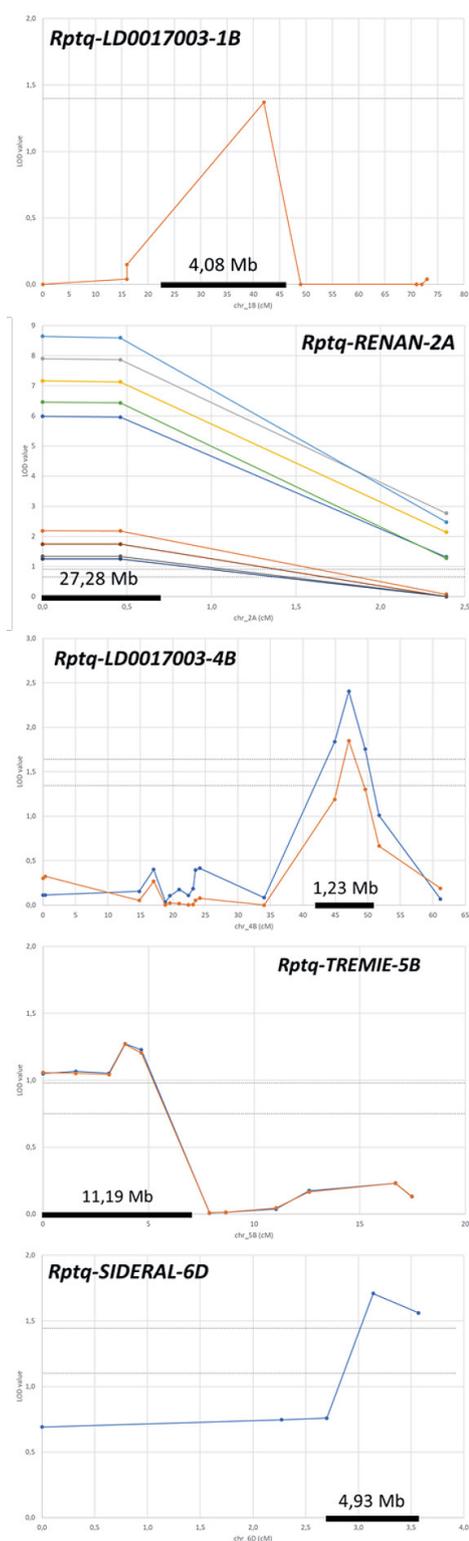


Figure 2 : Profils LOD de 5 QTL de résistance obtenus après cartographie génétique de précision. L'axe-x représente la distance génétique (en centiMorgans) et l'axe-y la valeur LOD. Pour chaque QTL, les profils LOD de différentes couleurs représentent des traits phénotypiques différents (lieux, répétitions, dates d'observation) pour lesquels un effet significatif a été observé. Les lignes en pointillés indiquent le seuil de significativité après 1000 tests de permutation. Les barres noires sur l'axe-x correspondent à l'intervalle de confiance du QTL (LOD-1) ; la distance physique de cet intervalle sur la RefSeq v1.0 (IWGSC, 2018) est indiquée en Mb (106 paires de base).

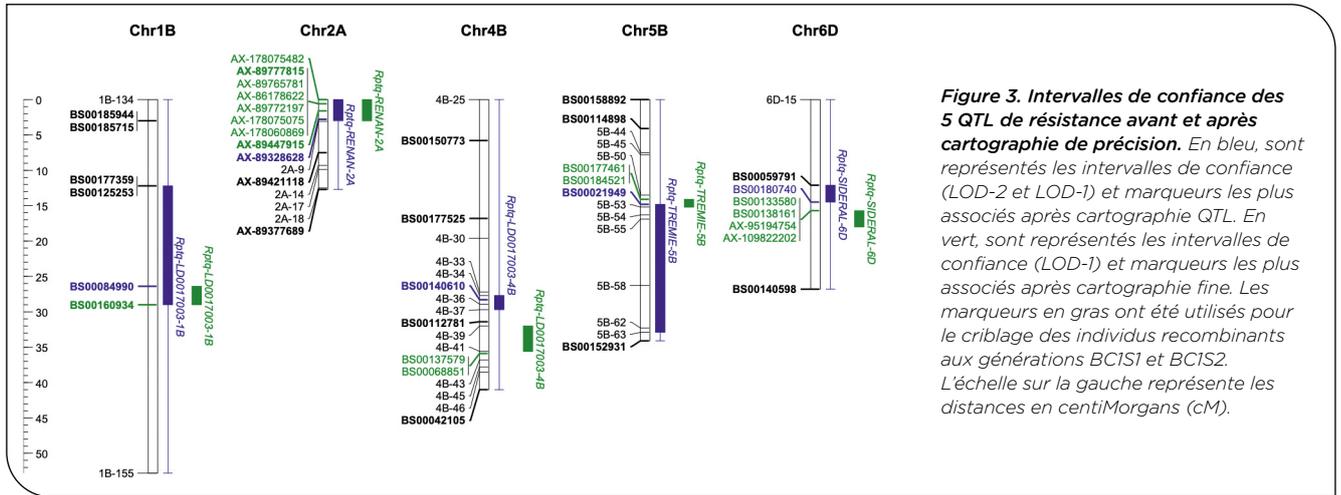


Figure 3. Intervalles de confiance des 5 QTL de résistance avant et après cartographie de précision. En bleu, sont représentés les intervalles de confiance (LOD-2 et LOD-1) et marqueurs les plus associés après cartographie QTL. En vert, sont représentés les intervalles de confiance (LOD-1) et marqueurs les plus associés après cartographie fine. Les marqueurs en gras ont été utilisés pour le criblage des individus recombinants aux générations BC1S1 et BC1S2. L'échelle sur la gauche représente les distances en centimorgans (cM).

pathogène, raison pour laquelle le suivi annuel des populations de *P. triticina* est réalisé à INRAE Bioger depuis 1999 (Goyeau *et al.*, 2006 & 2012). Ces suivis de populations permettent de mesurer l'efficacité des gènes de résistance, via l'estimation des fréquences de virulences présentes dans les populations, et ainsi de comprendre comment les variétés cultivées influencent l'évolution des populations de rouille brune (Fontyn *et al.*, 2022). Ces évolutions nécessitent de mettre régulièrement à jour les isolats utilisés pour la postulation des gènes de résistance. Parmi les 80 gènes de résistance à la rouille brune identifiés (Kumar *et al.*, 2021), 14 sont postulés dans les variétés françaises à l'aide de 20 isolats différentiels issus du suivi annuel des populations. Sur les 184 variétés de blé postulées au cours du projet MaBrune, 183 possédaient au moins un gène de résistance et 155 une combinaison d'au moins deux gènes de résistance ; le gène *Lr37* étant le plus fréquemment postulé dans les variétés de blé tendre françaises et souvent en combinaison avec les gènes *Lr13* ou *Lr14a*. Toutefois, la combinaison de plusieurs gènes de résistance au sein d'une même variété peut rendre compliqué leur postulation par des approches phénotypiques, les effets des uns masquant les effets des autres. L'utilisation de marqueurs moléculaires diagnostiques de la présence des gènes *Lr* permet de contourner cette difficulté et d'accélérer leur identification. Le développement de ces marqueurs moléculaires diagnostiques est donc important afin d'introduire les gènes de résistance dans les variétés et d'optimiser leur déploiement dans le paysage cultivé.

Dans le cadre du projet MaBrune, nous avons suivi une stratégie qui consiste à analyser des individus, ségrégant pour le gène de résistance ciblé, puis regroupés par phénotype résistant ou sensible (« Bulk Segregant Analysis » ; Michelmore *et al.*, 1991). Cette stratégie a été appliquée à 7 gènes de résistance *Lr* fréquemment présents dans les variétés de blé tendre françaises, ainsi qu'au gène *Lr9*, absent dans les variétés françaises et non contourné en France. C'est une stratégie relativement rapide, peu coûteuse, et particulièrement bien adaptée pour l'identification de marqueurs liés à des gènes de résistance majeurs tels que les gènes *Lr* (Aoun *et al.*, 2017). Cette stratégie nous a permis d'identifier des marqueurs diagnostiques à plus de 98 % pour 5 des 8 gènes *Lr* ciblés dans ce projet : *Lr1*, *Lr3*, *Lr9*, *Lr24* et *Lr28*. Parmi ces derniers, le gène *Lr1* a été

cloné par Cloutier *et al.* (2007), ce qui nous a permis de constater que le marqueur diagnostique identifié le plus proche se trouve à 1,43 Mb du gène codant pour *Lr1* (données non présentées). Ces marqueurs diagnostiques vont maintenant pouvoir être utilisés en complément des postulations par phénotypage pour identifier les gènes *Lr* présents dans les variétés, et notamment le gène *Lr9* qui n'est actuellement pas contourné. Pour les 3 autres gènes *Lr* ciblés, *Lr13*, *Lr14a* et *Lr37*, plusieurs marqueurs SNP ont été identifiés (637, 18 et 31, respectivement) mais aucun n'avait une valeur diagnostique satisfaisante (>98 %). Après le début du projet MaBrune, les gènes *Lr13* et *Lr14a* ont également été clonés (*Lr13* : Hewitt *et al.*, 2021 ; Yan *et al.*, 2021 ; *Lr14a* : Kolodziej *et al.*, 2021). *Lr13* encode un récepteur de l'immunité de type NLR (« nucleotide-binding site leucine-rich repeat immunoreceptors »), et est allélique du gène de résistance à la rouille jaune *Yr27* (Athiyannan *et al.*, 2022). *Lr14a* est un gène de résistance atypique du fait qu'il encode une protéine transmembranaire de type ankyrin (Kolodziej *et al.*, 2021). Des marqueurs diagnostiques de ces deux gènes *Lr* sont proposés dans les publications correspondantes qui viennent donc compléter la liste de marqueurs diagnostiques identifiés dans le projet MaBrune. Finalement, le gène *Lr37* se trouve sur le chromosome 2AS, étroitement lié aux gènes de résistance *Yr17* et *Sr38*, dans une petite translocation provenant de *Aegilops ventricosa* présente notamment dans la variété Renan (Blaszczyk *et al.*, 2004). Contrairement aux autres gènes *Lr* ciblés dans ce projet, *Lr37* est récessif (Kloppers & Pretorius, 1994) et considéré par certains comme un gène de résistance partielle malgré son implication dans des interactions spécifiques avec les isolats de *P. triticina* (Omara *et al.*, 2021). Ces particularités du gène *Lr37* pourraient expliquer la difficulté de postuler ce gène dans les variétés, notamment au stade plantule, et donc d'identifier des marqueurs diagnostiques par l'approche de BSA que nous avons suivie.

Nous nous sommes également intéressés à la cartographie de précision et à l'identification de marqueurs moléculaires liés à 5 QTL de résistance partielle, identifiés précédemment dans différentes variétés de blé tendre françaises. Ces 5 QTL ont été choisis parce qu'ils avaient un effet important sur le phénotype et étaient répétables dans les différents lieux d'évaluation. Pour ce faire, nous avons suivi une

stratégie proposée par Yeo *et al.* (2017) consistant à sélectionner un descendant de la population originale qui ne possède l'allèle de résistance qu'au seul QTL ciblé (et les allèles de sensibilité pour les autres QTL identifiés dans la même population). Les descendants choisis sont ensuite croisés avec le parent sensible récurrent, les individus de la génération BC1S1 criblés pour l'identification de plantes recombinantes dans l'intervalle QTL, et les individus de la génération BC1S2 criblés pour des individus recombinants fixés (c.à.d. homozygotes). Cette stratégie nous a permis d'identifier avec succès de nombreux individus recombinants dans les intervalles des QTL ciblés. Toutefois, nous avons rencontré des difficultés dans l'évaluation du phénotype de ces plantes. Malgré la fixation des recombinaisons, les phénotypes mesurés au champ en 2021 étaient généralement peu répétables et les effets phénotypiques étaient faibles. Cela peut s'expliquer par des effets des QTL finalement faibles et difficiles à mettre en évidence, ou par des infections dans les essais qui ne seraient pas seulement dues à l'isolat inoculé mais aussi à la population de rouille brune locale. Sur certains sites, une importante pression précoce de rouille jaune a également masqué le développement

plus tardif de la rouille brune. Malgré tout, les résultats obtenus sont encourageants et nous ont permis de positionner 4 QTL dans des intervalles physiques de 1,23 à 11,19 Mb, ainsi que d'identifier des marqueurs moléculaires les plus associés pouvant être utilisés pour suivre et introduire ces QTL dans les variétés. Dans le cas de Rptq-2A, provenant de la variété Renan, 106 individus recombinants ont été identifiés mais toutes ces recombinaisons étaient en dehors de l'intervalle LOD-1 du QTL, ce qui n'a pas permis de préciser sa position. Par conséquent, Rptq-2A reste positionné dans un intervalle physique relativement large de 27,28 Mb. Nous avons vu que Renan portait une translocation provenant de *A. ventricosa* sur le chromosome 2AS (Blaszczyk *et al.*, 2004). Il est probable que Rptq-2A soit localisé dans cette translocation. Celle-ci est associée à une suppression de recombinaisons (Danguy des Déserts *et al.*, 2021), expliquant notre difficulté à réduire l'intervalle de ce QTL. D'autre part, il est également probable que Rptq-2A corresponde au gène de résistance *Lr37* bien que l'isolat utilisé pour les phénotypes ait été virulent *Lr37*. De nouvelles évaluations phénotypiques vont être réalisées afin de valider ces résultats et si possible la valeur diagnostique des marqueurs identifiés.

Références bibliographiques

- Aktar-Uz-Zaman M, Tuhina-Khatun M, Hanafi MM, Sahebi M.** (2017). Genetic analysis of rust resistance genes in global wheat cultivars: an overview. *Biotechnol Biotechnol Equip* 31(3): 431-445.
- Aoun M, Kolmer JA, Rouse MN, Chao S, Bulbula WD, Elias EM, Maricelis A.** (2017) Inheritance and bulked segregant analysis of leaf rust and stem rust resistance in durum wheat genotypes. *Phytopathology* 107(12): 1496-1506.
- Athiyannan N, Abrouk M, Boshoff WHP, Cauet S, Rodde N, Kudrna D, Mohammed N, Bettgenhaeuser J, Botha KS, Derman SS, Wing RA, Prins R, Krattinger SG.** (2022) Long-read genome sequencing of bread wheat facilitates disease resistance gene cloning. *Nat Genet* 54(3): 227-231.
- Azzimonti G, Lannou C, Sache I, Goyeau H.** (2013) Components of quantitative resistance to leaf rust in wheat cultivars: diversity, variability and specificity. *Plant Pathol* 62: 970-981.
- Azzimonti G, Marcel TC, Robert O, Paillard S, Lannou C, Goyeau H.** (2014). Diversity, specificity and impacts on field epidemics of QTLs involved in components of quantitative resistance in the wheat leaf rust pathosystem. *Mol Breed* 34: 549-567.
- Babayants O, Babayants L, Gorash A, Vasilev A, Traskovetskaya V, Galaev A.** (2015). Physiologic specialization of *Puccinia triticina* Erikss. and effectiveness of *Lr-genes* in the south of Ukraine during 2013-2014. *Chil J Agric Res* 75: 443-450.
- Błaszczyk L, Goyeau H, Huang XQ, Röder M, Stepień L, Chełkowski J.** (2004) Identifying leaf rust resistance genes and mapping gene *Lr37* on the microsatellite map of wheat. *Cell Mol Biol Lett* 9: 869-878.
- Cloutier S, McCallum BD, Loutre C, Banks TW, Wicker T, Feuillet C, Keller B, Jordan MC.** (2007) Leaf rust resistance gene *Lr1*, isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the large *psr567* gene family. *Plant Mol Biol* 65(1): 93-106.
- Danguy des Déserts A, Bouchet S, Sourdille P, Servin B.** (2021) Evolution of recombination landscapes in diverging populations of bread wheat. *Genome Biol Evol* 13: evab152.
- El-Orabey WM, Hamwieh A, Ahmed, SM.** (2019) Molecular markers and phenotypic characterization of adult plant resistance genes *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* and *Lr68* and their association with partial resistance to leaf rust in wheat. *J Genet* 98(3): 82.
- Fatima F, McCallum BD, Pozniak CJ, Hiebert CW, McCartney CA, Fedak G, You FM, Cloutier S.** (2020) Identification of new leaf rust resistance loci in wheat and wild relatives by array-based SNP genotyping and association genetics. *Front Plant Sci* 11.
- Figlan S, Ntushelo K, Mwadzingeni L, Terefe T, Tsilo TJ, Shimelis H.** (2020) Breeding wheat for durable leaf rust resistance in Southern Africa: variability, distribution, current control strategies, challenges and future prospects. *Front Plant Sci* 11(549).
- Fontyn C, Zippert A-C, Delestre G, Marcel TC, Suffert F, Goyeau H.** (2022) Is virulence phenotype evolution driven exclusively by *Lr* gene deployment in French *Puccinia triticina* populations? bioRxiv: 2022.03.16.484559.
- Goyeau H, Berder J, Czerepak C, Gautier A, Lanen C, Lannou C.** (2012). Low diversity and fast evolution in the population of *Puccinia triticina* causing durum wheat leaf rust in France from 1999 to 2009, as revealed by an adapted differential set. *Plant Pathol* 61(4): 761-772.
- Goyeau H, Lannou C.** (2011) Specific resistance to leaf rust expressed at the seedling stage in cultivars grown in France from 1983 to 2007. *Euphytica* 178(1): 45-62.
- Goyeau H, Lannou C, Pariaud B, Azzimonti G, du Cheyron P, Couleaud G, Maumené C.** (2010) La résistance génétique du blé à la rouille brune causée par *Puccinia triticina* : comment évaluer sa durabilité pour mieux la gérer ? *Phytoma* 631 : 21-25.

- Goyeau H, Park R, Schaeffer B, Lannou C.** (2006) Distribution of pathotypes with regard to host cultivars in French wheat leaf rust populations. *Phytopathology* 96(3): 264-273.
- Hewitt T, Zhang J, Huang L, Upadhyaya N, Li J, Park R, Hoxha S, McIntosh R, Lagudah E, Zhang P.** (2021) Wheat leaf rust resistance gene *Lr13* is a specific Ne2 allele for hybrid necrosis. *Mol Plant* 14(7): 1025-1028.
- IWGSC.** (2018) Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* 361(6403): eaar7191.
- Kitt J, Danguy des Déserts A, Bouchet S, Servin B, Rimbart H, De Oliveira R, Choulet F, Balfourier F, Sourdille P, Paux E.** (2021) Genotyping of 4506 Bread Wheat Accessions with the TaBW410K SNP Array. Zenodo. DOI: 10.5281/zenodo.4518374.
- Kloppers FJ, Pretorius ZA.** (1994) Expression and inheritance of leaf rust resistance gene *Lr37* in wheat seedlings. *Cereal Res Commun* 22(1-2): 91-97.
- Kolodziej MC, Singla J, Sanchez-Martin J, Zbinden H, Simkova H, Karafiatova M, Dolezel J, Gronnier J, Poretti M, Glauser G, Zhu W, Köster P, Zipfel C, Wicker T, Krattinger SG, Keller B.** (2021) A membrane-bound ankyrin repeat protein confers race-specific leaf rust disease resistance in wheat. *Nat Commun* 12(1): 956.
- Kumar S, Bhardwaj SC, Gangwar OP, Sharma A, Qureshi N, Kumaran VV, Khan H, Prasad P, Miah H, Singh GP, Sharma K, Verma H, Forrest KL, Trethowan RM, Bariana HS, Bansal UK.** (2021). *Lr80*: A new and widely effective source of leaf rust resistance of wheat for enhancing diversity of resistance among modern cultivars. *Theor Appl Genet* 134(3): 849-858.
- Langlands-Perry C, Cuenin M, Bergez C, Krima SB, Gélisse S, Sourdille P, Valade R, Marcel TC.** (2022) 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. *Genes* 13(1).
- McIntosh RA, Dubcovsky J, Rogers WJ, Morris C, Appels R, Xia XC.** (2010) Catalogue of gene symbols for wheat: 2017 supplement available at <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV.** (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9828-9832.
- Niks RE, Qi X, Marcel TC.** (2015) Quantitative resistance to biotrophic filamentous plant pathogens: concepts, misconceptions, and mechanisms. *Annu Rev Phytopathol* 53(1): 445-470.
- Omara RI, Shahin AA, Ahmed SM, Mostafa YS, Alamri SA, Hashem M, Elsharkawy MM.** (2021) Wheat resistance to stripe and leaf rusts conferred by introgression of slow rusting resistance genes. *J Fungi* 7(8): 622.
- Paux E, Lafarge S, Balfourier F, Derory J, Charmet G, Alaux M, Perchet G, Bondoux M, Baret F, Barillot R, Ravel C, Sourdille P, Le Gouis J, on behalf of the BREEDWHEAT Consortium.** (2022) Breeding for economically and environmentally sustainable wheat varieties: an integrated approach from genomics to selection. *Biology* 11(1): 149.
- Rollar S, Serfling A, Geyer M, Hartl L, Mohler V, Ordon F.** (2021) QTL mapping of adult plant and seedling resistance to leaf rust (*Puccinia triticina* Eriks.) in a multiparent advanced generation intercross (MAGIC) wheat population. *Theor Appl Genet* 134(1): 37-51.
- Ronin YI, Mester DI, Minkov DG, Akhunov E, Korol AB.** (2017) Building ultra-high-density linkage maps based on efficient filtering of trustworthy markers. *Genetics* 206: 1285-1295.
- Safavi SA, Afshari F.** (2012) Virulence factors of *Puccinia triticina* on wheat and effectiveness of Lr genes for leaf rust resistance in Ardabil. *Arch Phytopathol Plant Prot* 46(10): 1246-1254.
- Stakman EC, Stewart DM, Loegering WQ.** (1962) Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. *U.S. Agric Res Serv E617*: 1-53.
- Wang S, Wong D, Forrest K, Allen A, Chao S, Huang BE, Maccaferri M, Salvi S, Milner SG, Cattivelli L.** (2014) Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90,000 single nucleotide polymorphism array. *Plant Biotechnol J* 12: 787-796.
- Yan X, Li M, Zhang P, Yin G, Zhang H, Gebrewahid, TW, Zhang J, Dong L, Liu D, Liu Z, Li Z.** (2021) High-temperature wheat leaf rust resistance gene *Lr13* exhibits pleiotropic effects on hybrid necrosis. *Mol Plant* 14(7): 1029-1032.
- Yeo FKS, Bouchon R, Kuijken R, Loriaux A, Boyd C, Niks RE, Marcel TC.** (2017) High-resolution mapping of genes involved in plant stage-specific partial resistance of barley to leaf rust. *Mol Breed* 37(4): 45.

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

Thierry C MARCEL¹, Roula SHAMSI¹, Sabine CADOUX^{1,2}, Faharidine MOHAMADI³, Pierre SOURDILLE⁴, Rémi PERRONNE⁵, Bernard ROLLAND⁵, Philippe DU CHEYRON⁶, GIE RGC⁷, CETAC², Anne-Lise BOIXEL¹, Henriette GOYEAU^{1*}

1 - Université Paris Saclay, INRAE, UR BIOGER, 78850 Thiverval-Grignon, France ; 2 - Centre Technique pour l'Amélioration des Céréales, 7 Rue Coq-Héron, 75030 Paris CEDEX -01, France ; 3 - ARVALIS Institut du Végétal, 91720 Boigneville, France ; 4 - Université Clermont-Auvergne, INRAE, UMR GDEC, 63000 Clermont-Ferrand, France ; 5 - IGEPP, INRAE, Institut Agro, Univ Rennes, 35653, Le Rheu, France ; 6 - ARVALIS Institut du Végétal, 91190 Villiers-le-Bâcle, France ; 7 - GIE Recherches Génétiques Céréales, 7 Rue Coq-Héron, 75030 Paris CEDEX-01, France ; *Coordinateur : Henriette GOYEAU, henriette.goyeau@inrae.fr

Le champignon basidiomycète *Puccinia triticina* Erikss est responsable de la rouille brune sur le blé tendre, le blé dur et le triticale. L'objectif du projet MaBrune est d'identifier des marqueurs moléculaires diagnostiques de la présence de gènes *Lr* et de QTL de résistance à cette maladie. A ce jour, 80 gènes *Lr* ont été identifiés dans le blé, dont la plupart sont impliqués dans des interactions gène-pour-gène avec les isolats de rouille brune; mais seulement certains de ces gènes *Lr* ont été postulés dans les variétés de blé tendre françaises. Dans un projet FSOV précédent, 15 QTL de résistance ont été identifiés pour expliquer la résistance partielle de 6 variétés de blé tendre (Apache, Tremie, Sideral, LD0017003, PBI04006, Renan; Figure 1).



Figure 1. Feuilles des variétés sensible ECRIN et partiellement résistance LD0017003 après inoculation avec la souche de *P. triticina* BT06M140 (photo de TC Marcel)

« Bulked Segregant Analysis » de 8 gènes *Lr*

Nous avons croisé 8 lignées quasi-isogéniques, portant les gènes de résistance *Lr1*, *Lr3*, *Lr9*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr24*, *Lr28* et *Lr37*, avec la variété récurrente sensible Thatcher. Pour chaque gène, 30 BC₁S₁ sensibles et 30 BC₁S₁ résistantes ont été génotypés en « bulk » sur une puce Affymetrix Axiom 410K .

✓ Identification de marqueurs diagnostiques pour 5 gènes *Lr* (Tableau 1)

Tableau 1. Marqueurs diagnostiques pour 5 gènes *Lr*

Gène	Chr.	Probe	VD ¹	FN ²	FP ³
<i>Lr1</i>	5DL	AX-89495847	99.2 %	5.9 %	5.9 %
		AX-89713092	99.5 %	0 %	5.9 %
<i>Lr3a</i>	6BL	AX-89705828	99.7 %	0 %	3.1 %
		AX-89542260	99.7 %	0 %	3.0 %
<i>Lr9</i>	6BL	AX-89672751	100 %	0 %	0.0 %
		AX-89563490	100 %	0 %	0.0 %
<i>Lr24</i>	3DL	AX-89471973	99.3 %	0 %	8.3 %
		AX-89505010	98.1 %	0 %	26.6 %
<i>Lr28</i>	4AL	AX-89351673	100 %	0 %	0.0 %

¹ Valeur diagnostique du SNP ; ² Pourcentage de faux négatifs ; ³ Pourcentage de faux positifs.

Cartographie fine de 5 QTL de résistance

Nous avons croisé des descendants ne portant l'allèle résistant que pour le QTL ciblé avec le parent sensible (ECRIN ou CHINESE SPRING; Figure 1). Le développement de marqueurs KASP encadrant les QTL a permis d'identifier des individus recombinants (entre 64 et 145 par QTL) que nous avons fixé en BC₁S₂. Ces individus recombinants fixés ont été phénotypés au champ et génotypés par une approche de SNP-seq.

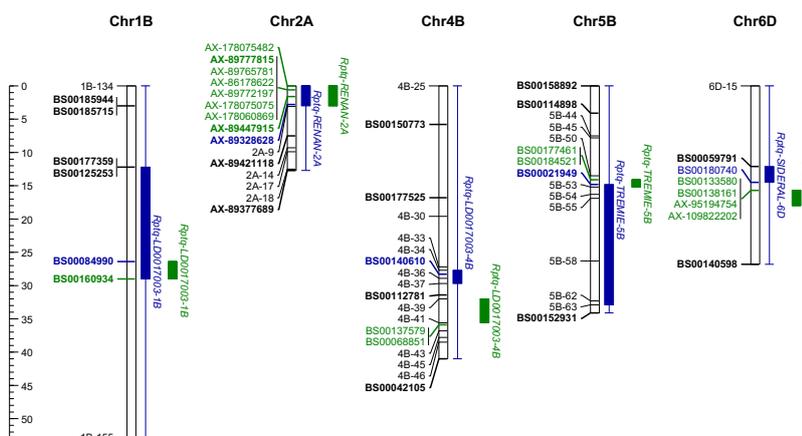


Figure 2. Intervalles de confiance des 5 QTL de résistance avant (bleu) et après (vert) cartographie de précision

✓ Les intervalles de 4 QTL sont réduits à des régions comprises entre 1,23 et 11,19 Mb (Figure 2)

✓ *Rptq-2A* pourrait correspondre à *Lr37*, introduit dans Renan via une petite translocation d'environ 27,28 Mb provenant de *Aegilops ventricosa* (Figure 2)

FSOV 2016 W



Centre d'Etudes Technique pour l'Amélioration des Céréales
C. E. T. A. C.

