

PERSIST : Préserver et améliorer l'efficacité des gènes de résistance à la septoriose: le cas du gène *Stb16q*

Jean-Noel THAUVIN¹, Gaele MARLIAC¹, Florence CAMBON¹, Carolina ORELLANA TORREJON², Benjamin NOWAK³, Madison VAN'T KLOOSTER², Ellen GOUEMAND DUGUE⁴, Gabriel BEUDIN⁵, Laure DUCHALAIS⁶, Delphine HOURCADE⁷, Lilian GOUT², Gert KEMA⁸, Romain VALADE⁷, Anne GENISSEL², Frederic SUFFERT², Marc-Henri LEBRUN², Cyrille SAINTENAC^{1*}

1 - Université Clermont Auvergne, INRAE, GDEC, 5 chemin de beaulieu, 63000 Clermont-Ferrand, FRANCE

2 - Université Paris-Saclay, INRAE, UR 1290 BIOGER, Palaiseau, FRANCE

3 - Université Clermont Auvergne, INRAE, Territoires, 9 avenue Blaise Pascal, 63170 Aubières, FRANCE

4 - Florimond-Desprez Veuve & Fils SAS, 3 rue Florimond-Desprez, BP 41, 59242 Cappelle-en-Pévèle, FRANCE

5 - RAGT, Rue Émile Singla, Site de Bourran, 12 000 Rodez

6 - ancienne adresse : RAGT, Rue Émile Singla, Site de Bourran, 12 000 Rodez ;

adresse actuelle : AgriObtentions, Ferme de Gauvilliers, 78660 Orsonville, FRANCE

7 - ARVALIS Institut du Végétal, Boigneville, FRANCE

8 - Laboratory of Phytopathology, Wageningen University & Research, Wageningen, 6700 AA, THE NETHERLANDS

*Coordinateur : Cyrille SAINTENAC, cyrille.saintenac@inrae.fr

1 Introduction

La septoriose (*Septoria tritici* blotch, STB) est une des maladies les plus dommageables pour les cultures de blé en France (Fones and Gurr, 2015). Cette maladie, entraînant l'apparition de nécroses sur les feuilles, est causée par le champignon *Zymoseptoria tritici*. Ce dernier présente une très grande diversité génétique (Feurtey *et al.*, 2023). Lors d'un épisode épidémique moyen, plusieurs millions de génotypes différents de *Z. tritici* sont présents par hectare de culture de blé (McDonald *et al.*, 2022). Cette caractéristique résulte de la capacité de ce champignon à réaliser un ou plusieurs cycles de reproduction sexuée par an et donc à constamment brasser son patrimoine génétique au sein des populations françaises. Cette singularité rend la lutte contre cet agent pathogène particulièrement difficile en raison de sa capacité à évoluer rapidement et ainsi à contourner les méthodes de lutte mises en place, tant chimique que génétique (Croll and McDonald, 2017; McDonald and Mundt, 2016; Stam and McDonald, 2018). Afin de réduire l'utilisation des produits phytosanitaires, la filière doit soutenir la sélection de variétés durablement résistantes. A ce jour, 23 gènes *Stb* ont été cartographiés génétiquement (Brown *et al.*, 2015; Langlands-Perry *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2018), dont certains sont présents dans les variétés françaises de blé comme *Stb6* (Saintenac *et al.*, 2018), *Stb9* (Chartrain *et al.*, 2009), *Stb15* (Hafeez *et al.*, 2023), *Stb16q* (Saintenac *et al.*, 2021), *Stb18* (Tabib Ghaffary *et al.*, 2011) et *Stb20q* (Langlands-Perry *et al.*, 2021). Plusieurs dizaines de QTL de résistance ont également été identifiés sur l'ensemble du génome du blé (Yang *et al.*, 2022). Depuis le contournement récent de *Stb16q*, la population française de *Z. tritici* est capable d'attaquer l'ensemble des gènes *Stb* connus. Il est donc nécessaire d'identifier les régions génomiques impliquées dans la résistance de certaines variétés de blé à *Z. tritici* mais également d'identifier de nouvelles sources de résistance à *Z. tritici* dans la diversité génétique du blé et d'introduire ces résistances dans les variétés actuelles. En effet, il existe encore un réservoir important de résistances nouvelles dans la diversité génétique du blé et de ces espèces proches.

De plus, il est nécessaire de comprendre comment les gènes de résistance présents dans les variétés de blé élites sont contournés par *Z. tritici*, afin de mettre en place des stratégies de déploiement des résistances existantes et nouvelles qui préservent leur durabilité.

Grace aux projets FSOV 2004 et 2008, dont l'objectif était d'identifier de nouvelles sources de résistance à la septoriose, un gène présentant un large spectre de résistance vis-à-vis de *Z. tritici* a été découvert chez un blé synthétique. Ce gène, nommé *Stb16q*, a été cartographié sur l'extrémité du bras long du chromosome 3D. Le clonage de ce gène (projet FSOV 2012 F), a montré qu'il code un récepteur kinase riche en cystéines. Ce projet a permis de montrer que *Stb16q* avait été introduit très récemment dans les variétés de blé cultivés et de développer des marqueurs diagnostiques pour suivre ce gène de résistance dans les programmes de sélection (Saintenac *et al.*, 2021). Ces projets ont facilité l'introduction de *Stb16q* dans des variétés élites françaises de blé comme la variété Cellule. Cette introduction s'est accompagnée d'un déploiement majeur de ce gène sur le territoire Français en quelques années. Malheureusement, l'apparition relativement rapide de souches virulentes capable d'attaquer Cellule et leur diffusion en France, a réduit fortement l'efficacité de ce gène. L'objectif du projet PERSIST était i) d'étudier comment utiliser un gène contourné pour combattre la septoriose en se focalisant sur *Stb16q*, ii) de déterminer comment *Stb16q* avait été contourné par *Z. tritici*, iii) d'étudier comment son introduction avait façonné les populations françaises de *Z. tritici*, et iv) d'étudier la possibilité de créer de nouveaux allèles de ce gène avec un spectre de résistance plus large.

2 Matériel et méthode

► Matériel végétal

Une collection de 75 accessions de blé a été étudiée. Parmi celles-ci, 17 étaient des variétés françaises élites inscrites au catalogue national de 2006 à 2020. Vingt étaient des blés synthétiques issus d'un précédent projet FSOV, cinq étaient originaires du programme



FSOV PYRAMID et quatre lignées étrangères, toutes portant le gène *Stb16q*. De même, 26 lignées de diverses origines, ne portant pas le gène *Stb16q* mais identifiées comme résistantes lors de précédents projets avaient été incluses dans cette collection.

Une population haploïde doublée de 156 individus issue du croisement entre TA4152-19 et l'accèsion ND495 a été fournie par Justin Faris (USDA). Une population haploïde doublée de 154 individus a été réalisée dans le cadre de ce projet à partir de F1 issus du croisement entre l'accèsion sensible Chinese spring et le mutant EMS TA4152-19-236 portant une mutation délétaire dans le gène *Stb16q*. Une population haploïde doublée de 60 individus issue du croisement entre la variété Nogal et l'accèsion Bio110 et une population HD entre Apache et Balance ont été fournies par Florimond Desprez.

► Évaluation du niveau de résistance des accessions de blé à *Z. tritici*

Au stade plantule, le protocole de phénotypage utilisé est décrit dans (Saintenac *et al.*, 2021). Trois plantules par accèsion de blé ont été évaluées. La deuxième feuille de chaque plantule a été inoculée au pinceau avec une solution de spores à 1×10^6 spores/ml. Ces plantules ont été placées pendant trois jours sous bâche pour maintenir une humidité relative de 100% et ensuite maintenues sous une photopériode de 16h, une hygrométrie de 85% et une température de 21°C le jour et de 18°C la nuit. Le phénotypage a été réalisé de manière visuelle à 14, 18 et 21 dpi. Deux essais ont été réalisés avec les isolats cfz008 et cfz023 virulents sur les variétés portant le gène *Stb16q*. Ces isolats proviennent de feuilles de blé infectées de la variété Cellule (cfz008, 2016, Nord de la France), ou de la variété Filon (cfz023, 2017, centre de la France) portant toutes les deux le gène *Stb16q*.

Cette collection a été phénotypée lors de douze essais au champ (6 par an en 2020 et 2021) en conditions naturelles d'inoculation. Deux répétitions de deux lignes de pépinières ont été évalués visuellement à deux dates. Des plantes de la variété Cellule étaient présents pour indiquer le niveau de virulence des populations naturelles sur le gène *Stb16q*. La hauteur et la précocité des différentes accessions ont également été évaluées.

► Identification des QTL de résistance

Le génotypage des populations HD a été réalisé soit avec la puce SNP de génotypage 90K (TA4152-19 x ND495), soit avec la puce 35K breadwheat (EMS TA4152-19-236 x CS), soit avec des marqueurs DarT (Nogal x Bio110 et Apache x Balance). L'analyse QTL a été réalisée sous l'environnement R en utilisant le package R/QTL et la fonction composite interval mapping.

► Analyse génétique de la virulence des isolats de *Z. tritici* capables d'attaquer *Stb16q*

Deux approches génétiques complémentaires ont été utilisées. Un croisement de *Z. tritici* a été réalisé entre un isolat avirulent (IPO323, Hollande) et un isolat virulent (cfz008, France) vis-à-vis de variétés portant le gène *Stb16q*. L'isolat cfz008 provient de feuilles infectées de la variété Cellule prélevées en 2016 dans un essai variétal du Nord de la France. Une centaine de descendants ont été obtenus à partir d'un croisement réalisé en serre sur des blés infectés par les deux parents pour éviter les

contaminations par d'autres isolats (WUR, Hollande). Ils ont été phénotypés pour leur capacité à attaquer la variété résistante Cellule et une lignée isogénique issue de la variété sensible de blé Chinese spring portant uniquement le gène *Stb16q*. Le génome du parent IPO323 a été séquencé en 2011 et il correspond au génome de référence de l'espèce (Goodwin *et al.*, 2011). Le génome du parent cfz008 a été entièrement séquencé (long reads PacBio, plateforme Gentiane, unité INRAE GDEC) et l'annotation d'IPO323 a été transférée sur cette nouvelle séquence. Ces descendants ont été génotypés par GBS (couverte 10x de chaque génome, unité INRAE AGAP, Montpellier). Les séquences générées pour chaque individu ont été alignées soit sur le génome de référence d'IPO323, soit sur le génome de l'isolat cfz008 afin d'identifier des marqueurs biparentaux. Au total, 50 000 SNPs bien distribués sur l'ensemble des chromosomes ont été obtenus. L'analyse QTL a été réalisée sous l'environnement R en utilisant le logiciel R/QTL. La recherche des gènes candidats dans la région du QTL a été réalisée à l'aide de la nouvelle annotation du génome d'IPO323 (Lapalu *et al.*, 2023). D'autre part, une analyse d'associations génotype-phénotype à l'échelle du génome (GWAS) a été réalisée à l'aide de populations françaises échantillonnées sur quatre années (virulents et avirulents sur Cellule) afin d'identifier des *loci* pouvant être impliqués dans le contournement de *Stb16q*.

► Dynamique d'évolution de la virulence *Stb16q*

Afin d'évaluer au niveau moléculaire la dynamique de la virulence des populations de *Z. tritici* vis-à-vis de *Stb16q* sur le territoire Français, une collecte de feuilles de blé infectées par *Z. tritici* issues de variétés portant le gène *Stb16q* ou ne portant pas le gène a été réalisée sur toute la France entre 2017 et 2020. Au total, 10, 13, 10 et 12 sites ont été échantillonnés en 2017, 2018, 2019 et 2020 respectivement (Figure 1). L'ensemble de ces feuilles ont été stockées à 4°C pour une conservation longue. En parallèle, une collection de souches monospores a été isolée à partir de ces feuilles. Une collection de 286 souches provenant de six sites différents et deux années (2018 et 2019) a été obtenue. Un pathotypage de ces souches a été réalisé sur les variétés Cellule, Apache et Rubisko.

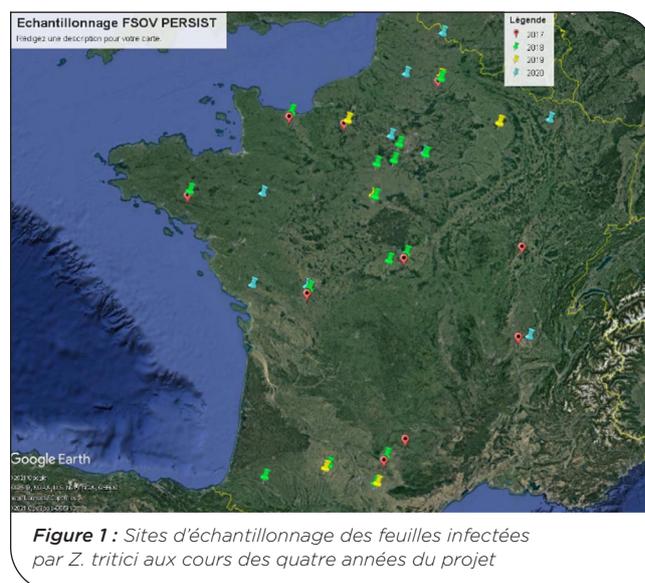


Figure 1 : Sites d'échantillonnage des feuilles infectées par *Z. tritici* aux cours des quatre années du projet

► Édition du domaine extracellulaire de *Stb16q*

Afin d'éditer le plus de bases possible du domaine extracellulaire de *Stb16q*, 12 guides répartis de manière homogène sur le domaine extracellulaire de *Stb16q* ont été identifiés et commandés à la société Proteogenix sur 4 vecteurs différents sous le contrôle du promoteur ubiquitine. Ces quatre vecteurs ainsi que le vecteur contenant la Cas9 cytosine deaminase ont été co-bombardés sur des embryons immatures âgés de deux semaines par biolistique. Les embryons ont ensuite été mis en culture sur différents milieux de culture pour favoriser la régénération tel que décrit dans le protocole suivant (Tassy *et al.*, 2014).

3 Résultats

► 1 - Identification de fonds génétiques efficaces contre les populations virulentes vis-à-vis du gène *Stb16q*

Pour cette analyse, une collection de 75 accessions blé a été évaluée au stade plantule avec deux souches (cfz008 et cfz023) et au stade adulte. À l'exception de Nogal qui est résistante à l'isolat cfz008, mais sensible à l'isolat cfz023, aucune des 17 variétés Françaises portant le gène *Stb16q* ne présentaient de résistance au stade plantule contre les deux souches cfz008 et cfz023. De plus, aucune de ces variétés n'étaient résistantes au stade adulte dans les essais où la pression sur le gène *Stb16q* était présente. Parmi les accessions autres que les variétés récentes portant le gène *Stb16q*, six blés synthétiques (95-5, 95-62, II-16, II-28, II-30, TA4152-19) ont montré une résistance intéressante dans l'ensemble des essais (totalement résistante au stade plantule aux deux souches et avec une note inférieure à 2,5 au champ). De plus, deux blés synthétiques ont été identifiés comme résistants uniquement au stade adulte dans les essais où les variétés portant le gène *Stb16q* étaient attaquées. Parmi les accessions ne portant pas le gène *Stb16q*, dix accessions de blé ont montré une résistance forte à *Z. tritici* aux stades plantule et adulte, et trois accessions uniquement au stade adulte. Ces essais ont ainsi permis de mettre en évidence 20 accessions de blé résistantes aux isolats virulents sur les variétés portant le gène *Stb16q*, ce qui permettra d'améliorer le niveau de résistance des variétés élites.

► 2 - Identification des régions génomiques impliquées dans la résistance large spectre du blé synthétique TA4152-19 et de la variété Nogal

2.1 Identification des résistances à *Z. tritici* chez TA4152-19

Parmi les accessions portant le gène *Stb16q*, le blé synthétique TA4152-19 est résistant vis-à-vis de tous les isolats testés et virulents sur les variétés de blé portant le gène *Stb16q*. Ces isolats proviennent de feuilles de blé infectées issues majoritairement de la variété Cellule, mais aussi d'autres variétés de blé portant le gène *Stb16q* et prélevées sur des essais variétaux réalisés en France à partir de 2016. De plus, comme décrit ci-dessus, ce blé synthétique a montré un niveau de résistance important dans l'ensemble des essais au champ conduits en 2020 et 2021. Ce blé synthétique porte les gènes de résistance *Stb6* et *Stb16q*. Afin d'identifier

les autres résistances présentes chez cette accession, deux populations bi-parentales ont été étudiées pour leur résistance à *Z. tritici* au stade plantule. La première population est issue du croisement entre TA4152-19 et une variété de blé de printemps ND495, alors que la seconde population résulte du croisement entre la lignée mutante EMS TA4152-19-236 et l'accession de blé de printemps Chinese spring. La lignée EMS TA4152-19-236 porte une mutation dans le gène *Stb16q* qui l'inactive. L'utilisation de cette lignée permet d'étudier les régions génomiques, autres que *Stb16q*, impliquées dans la résistance de TA4152-19, en utilisant des isolats avirulents sur les variétés portant *Stb16q*.

La première population a été phénotypée avec deux isolats de *Z. tritici* virulents (cfz008, cfz023) vis-à-vis du gène *Stb16q*, collectés, en France, en différents lieux et à différentes dates. Plusieurs traits phénotypiques associés à l'infection ont été mesurés comme le pourcentage de nécrose foliaire et le taux de sporulation des lésions à différentes dates de l'infection (14, 18, 21 dpi). Le génotypage de la population avec la puce SNP 90K a permis d'identifier 13911 SNP polymorphes entre les deux parents et utilisables pour l'analyse QTL. Le phénotypage avec l'isolat cfz008 a permis de mettre en évidence quatre QTL présents sur les chromosomes 1B (co-localise avec *Stb11*), 3D, 6D (co-localise avec *Stb18*) et 7B. L'analyse QTL avec les données issues de l'isolat cfz023 ont mis en évidence la présence de deux QTL dont un présent sur le chromosome 6D qui co-localise avec le gène *Stb18* et l'autre sur le chromosome 7B, dans les mêmes intervalles que ceux identifiés avec l'isolat cfz008. L'ensemble des QTL de résistances provient de l'accession TA4152-19.

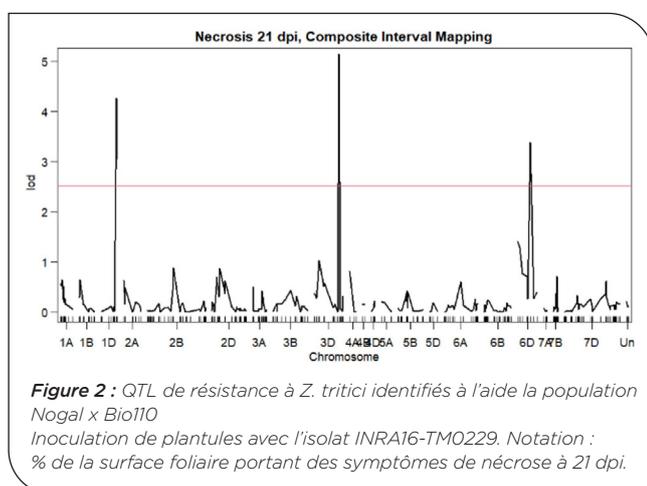
La seconde population a été phénotypée avec la souche IPO9415 prélevée en France en 2009 sur la variété Premio et la souche IPO92006 originaire du Portugal. Ces deux souches possèdent des spectres de virulence assez différents sur le groupe de variétés de blé différentielles portant les différents gènes *Stb* connus. L'isolat IPO9415 est avirulent vis-à-vis des gènes *Stb2*, *Stb5* et *Stb16q* et possiblement *Stb10* et *Stb11* alors que l'isolat IPO92006 est avirulent vis-à-vis de *Stb11* et *Stb16q*. Cette stratégie permet d'identifier un plus grand nombre de QTL présents chez l'accession TA4152-19. Cette population a été génotypée avec la puce SNP 35K ce qui a permis d'obtenir 11900 SNP utilisables pour la cartographie. L'analyse QTL avec la souche IPO9415 a mis en évidence un QTL majeur provenant de TA4152-19, expliquant jusqu'à 49% de la variabilité phénotypique, localisé sur le chromosome 5D dans la région du gène *Stb20q*. Aucun QTL n'a été détecté avec la souche IPO92006, la plupart des individus étant sensibles.

En conclusion, cette approche a permis de mettre en évidence, en plus des gènes *Stb6* et *Stb16q*, cinq QTL de résistance chez l'accession TA4152-19. Le QTL identifié sur le chromosome 1B co-localise avec le gène *Stb11*, alors que ceux identifiés sur le chromosome 6D et sur le chromosome 5D co-localisent respectivement avec les gènes *Stb18* et *Stb20q*. Ainsi, la résistance à large spectre de cette accession semble être la conséquence de la présence de cinq régions génomiques portant des gènes *Stb* connus (*Stb6*, *Stb11*, *Stb16q*, *Stb18*, *Stb20q*) et de deux régions génomiques portant des QTL de résistance à *Z. tritici* (QTL3D, QTL7B).

2.2 Identification des résistances à *Z. tritici* chez la variété Nogal

La variété Nogal, inscrite en 2006 et portant le gène *Stb16q*, est également résistante à plusieurs souches de *Z. tritici* virulentes sur les variétés portant le gène *Stb16q*. Nous avons ainsi phénotypé la population biparentale Nogal x Bio110 avec l'isolat cfz008 avirulent sur Nogal, et virulent sur l'accèsion Bio110. Cette population avait été génotypée avec des marqueurs Darts dont 763 sont utilisables en cartographie. L'analyse QTL a montré la présence d'un seul QTL majeur sur le chromosome 1D chez Nogal co-localisant avec le gène *Stb10*. Le phénotypage de la population HD Cellule x Nogal avec l'isolat cfz008 virulent sur Cellule et avirulent sur Nogal, a confirmé la présence d'un gène majeur de résistance sur le chromosome 1D chez Nogal grâce au génotypage avec les marqueurs SSR gwm848, cfd72 et gwm458 liés au gène *Stb10*. Cette population a également été phénotypée avec l'isolat INRA16-TM0229 prélevée sur la variété Renan en Ile de France en 2016 et avirulent vis-à-vis du gène *Stb16q*. L'analyse QTL avec INRA16-TM0229 a montré la présence de trois régions impliquées dans la résistance chez Nogal (Figure 2). Comme attendu, le premier QTL co-localise avec le gène *Stb16q*. Les deux autres co-localisent avec les gènes *Stb10* (chromosome 1D) et *Stb18* (chromosome 6D). Le gène *Stb18* ayant été cartographié chez la variété Balance avec un autre isolat de *Z. tritici*, nous avons utilisé la population Apache x Balance afin de vérifier si l'isolat INRA16-TM0229 possède bien le gène d'avirulence *AvrStb18*. L'analyse de ces données a révélé la présence d'un QTL majeur provenant de Balance sur le chromosome 6D au niveau de *Stb18* détecté par l'isolat INRA16-TM0229 validant l'avirulence de cet isolat vis-à-vis de *Stb18*.

La détection de *Stb18* chez Nogal avec la souche INRA16-TM0229 questionne sur la non détection de ce gène par l'isolat cfz008 chez Nogal alors que ce locus a été identifié chez l'accèsion TA4152-19 avec cfz008. Il serait nécessaire d'évaluer la population Apache x Balance avec l'isolat cfz008 afin de déterminer si ce dernier est avirulent vis-à-vis de *Stb18*. Ces résultats permettraient de déterminer si un problème de détection de QTL est survenu lors de l'étude de la population Nogal x Bio110 avec l'isolat cfz008 ou s'il existe un autre gène ou un allèle particulier de *Stb18* chez TA4152-19.



Afin d'identifier les deux gènes de résistance *Stb10* et *Stb18* chez Nogal, nous avons développé une population de tilling à partir de la variété Nogal par traitement à l'agent chimique EMS. Nous avons obtenu une population de 399 familles M₂. Douze plantes par famille pour l'ensemble des familles, soit 4075 plantes, ont été phénotypées avec l'isolat cfz008 avirulent pour Nogal, mais virulent pour *Sbt16q*. Au total, 13 familles M₂ ont été identifiées comme sensibles à cette souche suggérant la présence d'une mutation dans le gène *Stb10* au sein de ces familles. Ces 13 familles ont été multipliées et les descendants M₃ ont été phénotypés avec l'isolat cfz008 et l'isolat IPO92006 avirulent sur Cellule et Nogal et virulent sur *Stb10* et *Stb18*. Ce phénotypage a confirmé la sensibilité de 12 familles à l'isolat cfz008, la treizième étant vraisemblablement un faux positif. Parmi ces douze familles, une seule est attaquée par l'isolat IPO92006 suggérant la présence d'une mutation dans un gène ayant un rôle général dans la résistance à *Z. tritici*, car cette mutation supprimerait la résistance conférée par les gènes *Stb10* et *Stb16q*. Les descendants M₄ des 12 familles ont ensuite été phénotypés avec quatre isolats virulents sur les variétés portant le gène *Stb16q* et prélevés en 2016 et 2017 dans différents départements de France majoritairement sur la variété Cellule (LG008 : dpt78; cfz008: dpt59; cfz014 : dpt28; SE17-128 : dpt21). Une des douze familles a montré peu de pycnides après inoculation avec tous les isolats, un phénotype déjà observé avec l'isolat cfz008 sur les générations M₂ et M₃ suggérant une mutation particulière à l'origine de ce phénotype. De manière intéressante, deux familles étaient résistantes à l'isolat cfz014 alors qu'elles étaient sensibles aux trois autres isolats, les neuf autres familles étant sensibles à l'ensemble des quatre isolats. Ces résultats suggèrent la présence de mutations dans différents gènes impliqués dans la résistance chez ces familles sensibles et possiblement la présence d'un autre gène de résistance chez Nogal.

L'approche RenKSeq développée dans un précédent projet FSOV a été utilisée pour séquencer les RLK chez les 12 familles Nogal sensibles à cfz008. Cependant, aucun gène candidat avec une mutation chez l'ensemble de ces 12 familles n'a été identifié. De plus, aucun gène candidat portant une mutation chez plusieurs familles n'a été identifié dans la région de *Stb10*.

Finalement, nous avons créé une lignée isogénique portant la région génomique de Nogal avec le gène *Stb10* dans le fond génétique de l'accèsion sensible Chinese spring. Nogal a tout d'abord été croisé avec Chinese spring. Les individus F1 ont été rétro-croisés avec Chinese spring et la descendance a été phénotypée avec l'isolat cfz008 (Phénotype sensible des F1) et génotypée avec les marqueurs SSR wms458, wms848 et cfd72 situé au niveau du gène *Stb10*. Chaque descendant à l'état hétérozygote a été utilisé pour les rétrocroisements. Les BC5F1 ont ensuite été autofécondés et un descendant à l'état homozygote pour les trois marqueurs a été sélectionné. Cependant, cette lignée dont l'introgession a été validée par un génotypage sur la puce 35K, était sensible à la souche cfz008 suggérant que la présence unique de ce locus n'est pas suffisante pour conduire à la résistance vis-à-vis de la souche cfz008, alors que ce locus est responsable de la résistance de Nogal lors de l'étude de la population Nogal x Bio110 avec cet isolat.

D'autres régions génomiques pourraient donc être nécessaires pour la résistance à cet isolat. Ce résultat suggère un fonctionnement différent des autres gènes de résistance étudiés précédemment.

► 3 - Étude des populations de *Z. tritici* capables d'attaquer *Stb16q*

3.1 Analyse génétique de la virulence des isolats de *Z. tritici* capables d'attaquer *Stb16q*

Afin d'identifier le ou les gènes impliqué/s dans la virulence/avirulence des isolats de *Z. tritici* vis-à-vis des cultivars portant le gène *Stb16q*, deux approches génétiques complémentaires ont été utilisées (analyse génétique d'un croisement entre un isolat virulent et un isolat avirulent, et analyses de populations virulentes et avirulentes par GWAS).

3.1.1 Cartographie génétique des loci impliqués dans la virulence de l'isolat cfz008 vis-à-vis de *Stb16q*

Afin d'identifier le ou les gènes impliqué/s dans la virulence des isolats *Z. tritici* vis-à-vis des cultivars portant le gène *Stb16q*, nous avons réalisé un croisement entre un isolat virulent (cfz008) et un isolat avirulent (IPO323) vis-à-vis de la variété Cellule portant le gène *Stb16q*. Tous les descendants sont virulents sur la variété Taichung-29 et la lignée de Chinese Spring sans le gène *Stb16q* (CS-16). La moitié des descendants sont incapables d'attaquer la variété Cellule et la lignée de Chinese Spring portant le gène *Stb16q* (CS+16), tandis que l'autre moitié des descendants est capable d'attaquer ces deux cultivars résistants (> 10% de la surface inoculée sporulante). Cette proportion de descendants avirulents/virulent (50-50) suggère la ségrégation d'un gène majeur responsable du caractère virulent de l'isolat cfz008. Parmi les descendants virulents, il existe une importante variation quantitative de la capacité à attaquer aussi bien le cultivar Cellule que la lignée CS+16 (10-70% de la surface inoculée sporulante). Ainsi, certains descendants sont soit 2 fois moins, soit 2 fois plus agressifs que le parent virulent cfz008 sur ces cultivars résistants (valeur moyenne du parent virulent cfz008 : 35% de la surface inoculée sporulante). Cette distribution quantitative suggère la ségrégation d'autres gènes impliqués dans l'agressivité vis-à-vis des variétés portant *Stb16q*. L'analyse de cartographie de QTLs identifie un seul locus correspondant à une région de 75 Kb située sur le chromosome 11 de *Z. tritici* (Figure 3).

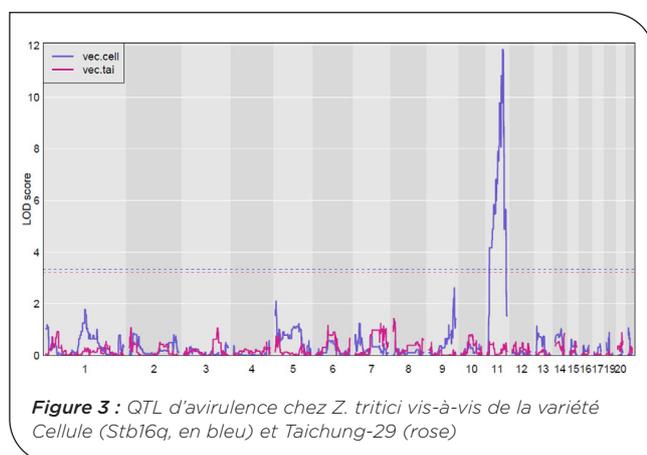


Figure 3 : QTL d'avirulence chez *Z. tritici* vis-à-vis de la variété Cellule (*Stb16q*, en bleu) et Taichung-29 (rose)

La recherche des gènes candidats dans cette région a été réalisée à l'aide de la nouvelle annotation du génome d'IPO323 (Lapalu *et al.*, 2023). Parmi les 30 gènes de cette région, 24 sont exprimés au cours de l'infection dont six codent des petites protéines sécrétées (effecteurs). Nous nous sommes focalisés sur ces six effecteurs, car les trois gènes d'avirulence déjà identifiés chez *Z. tritici* correspondent à ce type de protéines (Amezrou *et al.*, 2022; Kema *et al.*, 2018; Meile *et al.*, 2018; Zhong *et al.*, 2017). L'analyse du polymorphisme de ces gènes candidats entre IPO323 et cfz008 a été réalisée. Les gènes candidats ne présentant pas de différence de séquence entre les deux parents ont été éliminés. L'analyse fonctionnelle des gènes candidats restant (complémentation de cfz008 avec l'haplotype d'IPO323, délétion du gène chez IPO323) est en cours afin d'identifier le gène dont la modification permet à l'isolat cfz008 d'attaquer les variétés portant le gène de résistance *Stb16q*.

3.1.2 Étude de génétique d'association de la virulence des populations de *Z. tritici* vis-à-vis de *Stb16q*

La deuxième approche a reposé sur une étude de génétique d'association basée sur une collection de souches de *Z. tritici* prélevées sur le territoire au cours des dernières années. Cette collection comprenait 105 isolats de *Z. tritici* dont environ la moitié proviennent de variétés portant le gène *Stb16q* virulents. Ces isolats ont été phénotypés sur la variété Cellule ainsi que sur deux lignées isogéniques issues de la variété de blé Chinese spring possédant ou non le gène *Stb16q*. Trois expérimentations indépendantes ont été réalisées et ont mis en évidence le caractère quantitatif de la virulence vis-à-vis de *Stb16q*. Les génomes de l'ensemble de ces souches ont été séquencés (60x, Illumina). Les génomes complets de deux isolats virulents sur les variétés portant *Stb16q*, LG008 (2017, Grignon) et SE17-128 (2017, Flagey-Echegeaux) ont également été séquencés dans le cadre de ce projet grâce à la technologie PacBio générant de longs fragments (PacBio, plateforme Gentiane, unité INRAE GDEC). Les séquences des isolats de la collection ont été alignés sur la référence IPO323, mais également sur les génomes disponibles des isolats virulents (CFZ8, LG008, SE17-128) pour identifier les polymorphismes entre isolats. Ces données ont permis de conduire des analyses de génétique d'association et de mettre en évidence plusieurs loci associés au caractère avirulent/virulent des isolats. Cependant, aucun loci détecté par cette méthode ne correspond au locus identifié par cartographie génétique sur le chromosome 11. Ces analyses suggèrent l'implication possibles de différentes régions de *Z. tritici* dans la virulence et l'agressivité vis-à-vis du gène *Stb16q*.

3.2 Dynamique d'apparition des isolats virulents sur les variétés portant le gène *Stb16q*

La base de données Vigiculture® regroupe plusieurs milliers d'observations de symptômes de septoriose sur des parcelles de blé réalisées de mars à juin et répertoriées dans treize régions françaises. Plusieurs informations sont présentes dans cette base de données comme la variété, la localisation des parcelles ou encore le précédent cultural. Comme les populations de *Z. tritici* sont variables en taille et structure dans le

temps et l'espace, nous avons, dans un premier temps, estimé la pression de cette maladie par région et par an, soit pour les 15 variétés les plus représentées dans le réseau, soit pour la variété sensible Apache, les deux stratégies ayant des avantages et des inconvénients. Ces approches ont permis de mettre en évidence des régions comme la Normandie où la pression de septoriose est moyenne, voire forte chaque année contrairement à d'autres régions où la pression varie fortement en fonction des années. De même, ces analyses ont permis de montrer que certaines années comme 2016 étaient très favorables à la maladie alors que d'autres l'étaient moins. Nous avons ensuite regardé l'évolution des symptômes pour la variété Cellule et les variétés portant *Stb16q*, sensée refléter la fréquence de la virulence *Stb16q* dans les populations du champignon, en fonction des années et des régions. Nous avons observé une augmentation régulière du niveau des symptômes sur cette variété depuis son déploiement en 2013 jusqu'en 2019. Il ressort qu'une première baisse significative de résistance de Cellule ait été observée en 2016. Ce constat a également été fait en utilisant les données de la base Arvalis, qui regroupe près d'une trentaine de sites à l'échelle française (Figure 4). De façon intéressante, nous avons observé la même tendance sur la variété Rubisko, qui inscrite comme résistante en 2012, a connu une baisse de son niveau de résistance en 2016 (Figure 4).

Tous ces éléments étayent l'hypothèse d'un essor des populations de *Z. tritici* virulentes à partir de l'année 2016, une année à très forte pression parasitaire et donc propice à la multiplication de la fraction virulente de la population pathogène. Même s'il est difficile d'estimer l'origine spatiale et temporelle du contournement du gène *Stb16q*, des symptômes sur Cellule ont été observés dans plusieurs régions de France lors des premières cultures de cette variété, suggérant l'apparition indépendantes de virulences dans différentes régions de France, corroborée par les connaissances synthétisées dans cet article de synthèse (McDonald *et al.*, 2022). Enfin, lors d'une analyse complémentaire, nous avons comparé les notations maladies sur la variété Cellule avec celles de la variété Apache au cours des années et en fonction des régions. De manière surprenante, alors que les symptômes étaient beaucoup plus importants sur

Apache que sur Cellule en 2013, cette tendance s'est inversée dans les années suivantes et dans plusieurs régions comme en Normandie, en Rhône-Alpes ou en Ile de France. Ces observations témoignent d'une adaptation assez forte de la population de *Z. tritici* vis-à-vis de la variété Cellule et pourrait expliquer le fait que toutes les variétés Françaises portant *Stb16q* sont devenues sensibles à *Z. tritici* durant la même période que Cellule.

Afin de compléter les analyses des données réseaux, un échantillonnage de feuilles infectées par *Z. tritici* de variétés possédant le gène *Stb16q* et un isolement de souches ont été réalisés. Cette expérimentation a montré que la grande majorité des isolats prélevés sur Cellule sont virulents sur Cellule, alors que les isolats prélevés sur les variétés ne portant pas le gène *Stb16q* ne sont pas virulents sur la variété Cellule. Cette observation suggère que la virulence vis-à-vis de *Stb16q* structure la population de *Z. tritici*. Ces échantillons seront utilisés pour caractériser la dynamique des haplotypes du gène *Avr-Stb16q* dès qu'il sera identifié.

3.3 Dans quelle mesure la reproduction sexuée permet-elle le maintien de l'avirulence *AvrStb16q* dans les populations du *Z. tritici* ?

Des études récentes ont montré que l'avirulence *AvrStb6* est maintenue lors de la reproduction sexuée du champignon sur des variétés possédant le gène *Stb6* (Kema *et al.*, 2018). Cette découverte met en évidence un mécanisme pouvant expliquer le maintien de souches avirulentes dans les populations de *Z. tritici* en dépit du déploiement d'un gène de résistance à large échelle, et donc le prolongement de son efficacité. Nous avons souhaité tester l'existence de ce mécanisme dans le cas de l'avirulence *AvrStb16q*. Cette partie a été réalisée majoritairement dans le cadre de la thèse de Carolina Orellana-Torrejon, codirigée par Frédéric Suffert (INRAE BIOGER) et Sébastien Saint-Jean (INRAE ECOSYS) non financée par le projet PERSIST, et dont l'objectif était d'estimer l'impact d'associations variétales de blé sur la dynamique annuelle d'adaptation des populations de *Z. tritici* à *Stb16q* (Orellana-Torrejon *et al.*, 2022a, 2022b). Plusieurs essais de croisements de souches virulentes et avirulentes ont été réalisés en conditions

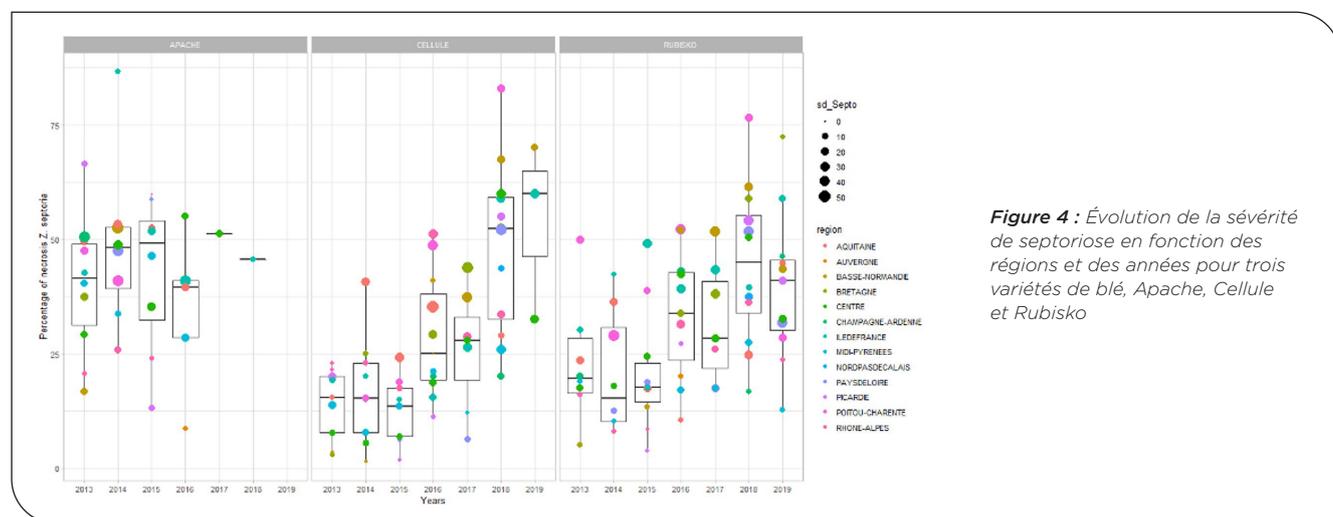


Figure 4 : Évolution de la sévérité de septoriose en fonction des régions et des années pour trois variétés de blé, Apache, Cellule et Rubisko

semi-contrôlées. Vingt-cinq inoculations, dont plusieurs combinaisons de deux souches virulentes ou avirulentes *AvrStb16q*, ont été réalisées sur les variétés Cellule et Apache en serre. Ces plantes inoculées, une fois sénescentes, ont été transférées à l'extérieur pour favoriser la reproduction sexuée de *Z. tritici*. Une fois ce processus terminé, les débris de chaque plante ont été disposés en enceintes humides sous des boîtes de Petri ouvertes pour récupérer les ascospores issues de la reproduction sexuée. La quantité d'ascospores éjectées par gramme de débris végétaux a été le critère utilisé pour estimer l'intensité de cette reproduction. Cette expérimentation a été répétée trois années de suite, de 2018 à 2020. Plusieurs descendants de quelques croisements ont été génotypés à l'aide de marqueurs SSR pour valider le lien de parenté avec les isolats inoculés et mettre en évidence, dans certains cas, l'implication d'isolats « extérieurs ». La ségrégation d'*AvrStb16q* dans la descendance a pu être vérifiée par un phénotypage « en bulk » (Suffert *et al.*, 2023). Ces expériences ont montré que le croisement entre un isolat virulent et un isolat avirulent *Stb16q* était possible sur Cellule mais également, et de manière surprenante, entre deux souches avirulentes, donc en l'absence de symptômes sur la plante pendant la phase asexuée de *Z. tritici*. Ces résultats sont détaillés dans un article scientifique publié dans le journal *Fungal Genetics and Biology* (Orellana-Torrejón *et al.*, 2022). Le fait qu'une infection des tissus vivants, conduisant à des nécroses sporulantes, ne soit pas un passage obligé pour que *Z. tritici* se reproduise de manière sexuée pose de nombreuses questions quant aux mécanismes de reproduction sexuée et aux conséquences de cette phase sur le maintien des avirulences dans les populations pathogènes. De tels mécanismes peuvent expliquer le maintien d'*AvrStb6* mais aussi d'autres avirulences alors que les résistances correspondantes ont été ou sont largement utilisées. De tels mécanismes permettraient d'expliquer la non fixation des allèles de virulence et donc le prolongement d'une certaine efficacité du gène de résistance dans certaines conditions. Ces conditions semblent réunies dans les mélanges variétaux, qui favorisent le contact entre souches virulentes et avirulentes (Orellana-Torrejón *et al.*, 2022a, 2022b) et où plusieurs scénarios d'interactions entre souches générant des croisements peuvent conduire à une fréquence plus élevée de descendants avirulents (Orellana-Torrejón *et al.*, 2022).

► 4 - Élargir le spectre de résistance du gène *Stb16q*

La durée de vie d'un gène de résistance à la septoriose est généralement courte due à l'apparition de populations virulentes vis-à-vis de ce gène. L'objectif de cette partie est d'évaluer la capacité à éditer un gène de résistance à la septoriose dans une variété cultivée afin de créer un nouvel allèle de ce gène capable de conférer une résistance vis-à-vis des populations virulentes nouvellement apparues.

Nous avons ainsi tenté de créer de nouveaux allèles de *Stb16q* en éditant la partie extracellulaire du gène. La partie extracellulaire étant impliquée dans la reconnaissance du champignon, ces nouveaux allèles

pourraient conférer une résistance avec un spectre différent de l'allèle de *Stb16q* présent dans la variété Cellule, c'est-à-dire qu'ils pourraient reconnaître des isolats de *Z. tritici* apparus récemment et virulents vis-à-vis de l'allèle *Stb16q* présent chez Cellule. Pour atteindre cet objectif, nous avons utilisé le système Crispr-CAS9 cytosine base editor. Ce système permet de générer des substitutions au niveau des cytosines présentes sur les régions ciblées par les guides utilisés.

Dans un premier temps, nous avons évalué le taux de régénération de la variété Cellule, l'objectif étant de montrer que l'approche était réalisable directement sur une variété élite. Après deux séries de test, seulement 2% des embryons ont montré une capacité de croissance sur milieu sélectif après bombardement des embryons par un gène de sélection. La régénération, même faible étant possible, nous avons ensuite réalisé le design des guides pour le système CRISPR. Nous avons réalisé 12 guides répartis de manière aléatoire sur la partie extracellulaire de *Stb16q*, la difficulté étant d'introduire un nombre minimum de mutations mais suffisant assez afin d'obtenir un phénotype. Ces 12 guides permettaient de cibler 19 bases et 15 acides aminés dont deux situés dans le motif conservé CX8CX2C des domaines DUF26. Ces douze guides, synthétisés par un prestataire de service et répartis sur quatre vecteurs différents, ont été bombardés avec la CAS9 cytosine deaminase sur ~3500 embryons immatures de Cellule. De manière inattendue, quasiment l'ensemble des calcs ont nécrosés suite aux repiquages sur les différents milieux sélectifs (Figure 5). Quelques rares plantes ont été tout de même régénérées mais suite à un criblage PCR, se sont toutes révélées négatives. Ces résultats restent encore inexpliqués. De nouveaux bombardements de cette variété ont été récemment effectués montrant toujours la présence importante de nécrose suggérant une incompatibilité de cette variété à la régénération.

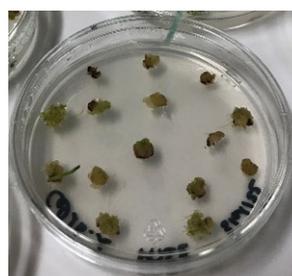


Figure 5 : Nécroses typiques des calcs de la variété Cellule observées après bombardement des embryons immatures avec les 12 guides et la CAS9

Finalement, afin d'identifier de la variabilité génétique au sein du gène *Stb16q*, nous avons phénotypé la population de tilling Nogal avec la souche IPO92006 avirulente sur *Stb16q*. Cette expérimentation a permis de mettre en évidence quatre familles sensibles portant une mutation dans le gène *Stb16q*. Cependant, seulement une mutation a été retrouvée dans la partie extracellulaire du gène. D'après des expérimentations de modélisation, cette mutation ne semble pas affecter la structure de la protéine et il est encore difficile de comprendre pourquoi et comment elle impacte la reconnaissance du champignon. Cette mutation sera analysée plus en détail dans de futurs projets de recherche afin de mieux comprendre comment s'opère la reconnaissance du champignon par le gène *Stb16q*.

4 Discussion

Le projet PERSIST a permis :

- D'identifier vingt accessions de blé présentant vraisemblablement de nouvelles sources de résistance à la septoriose. Ces accessions peuvent être utilisées dans les programmes de prebreeding pour améliorer la résistance à la septoriose.
- De montrer que la résistance large spectre (et notamment vis-à-vis des isolats virulents contre le gène *Stb16q*) des accessions TA4152-19 et Nogal était due à la présence de plusieurs QTL de résistance chez chacune de ces accessions.
- D'identifier les régions génomiques impliquées dans ces résistances large spectre vis-à-vis d'isolats virulents sur le gène *Stb16q*. Ces analyses ont notamment permis de montrer la présence de huit QTL de résistance dont trois étant cartographiés au niveau des gènes *Stb10*, *Stb18* et *Stb20q*. Beaucoup de ressources génétiques et génomiques ont été générées dans ce projet permettant d'identifier ces gènes prochainement afin de fournir des marqueurs diagnostiques à la filière.
- De mieux comprendre la dynamique spatiotemporelle des épidémies de septoriose sur les dix dernières années en France en fonction des régions et des années. Cette analyse a notamment permis de mettre en évidence que certaines années (en l'occurrence 2016), du fait de pressions parasitaires exceptionnelles, peuvent apparaître comme « charnières » dans la dynamique de contournement d'un gène *Stb* en favorisant la diffusion d'une nouvelle virulence sur le territoire.
- D'analyser le contournement du gène *Stb16q* à l'échelle du génome. Ce contournement s'est fait progressivement et a conduit à la mise en place de populations du champignon très virulentes sur les cultivars portant le gène *Stb16q*. Un locus impliqués dans la virulence de *Z. tritici* vis-à-vis du cultivar résistant Cellule a été identifié sur le chromosome 11 de *Z. tritici*. Les gènes candidats de ce locus sont en cours de validation fonctionnelle afin d'identifier le gène dont la modification permet aux isolats virulents d'attaquer les variétés portant le gène de résistance *Stb16q*. Cette validation permettra d'analyser les événements mutationnels responsables de la virulence, et leur dispersion sur le territoire.
- En cohérence avec les données publiées sur l'avirulence vis-à-vis du gène *Stb6*, des souches avirulentes pour *Stb16q* peuvent se croiser (se reproduire de manière sexuée) sur une variété de blé portant le gène *Stb16q* et transmettre des allèles avirulents à leur descendance, prolongeant ainsi l'efficacité de la résistance.
- D'identifier des variants alléliques du gène *Stb16q* pour comprendre le mode de fonctionnement de ce gène. L'impact de la mutation identifiée au sein de domaine extracellulaire de *Stb16q* sur la reconnaissance du ligand sera analysé dans les années à venir.

Références bibliographiques

- Amezrou, R., Audéon, C., Compain, J., Gélisse, S., Ducasse, A., Sainenac, C., Lapalu, N., Orford, S., Croll, D., Amselem, J., Fillinger, S., Marcel, T.C., (2023). A secreted protease-like protein in *Zymoseptoria tritici* is responsible for avirulence on *Stb9* resistance gene in wheat (preprint). *Plant Pathogens* 12;19(5).
- Brown, J.K.M., Chartrain, L., Lasserre-Zuber, P., Sainenac, C., (2015). Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genetics and Biology* 79, 33-41.
- Chartrain, L., Sourdille, P., Bernard, M., Brown, J.K.M., (2009). Identification and location of *Stb9*, a gene for resistance to septoria tritici blotch in wheat cultivars Courtot and Tonic. *Plant Pathology* 58, 547-555. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.02013.x>
- Croll, D., McDonald, B.A., 2017. The genetic basis of local adaptation for pathogenic fungi in agricultural ecosystems. *Molecular Ecology* 26, 2027-2040.
- Feurtey, A., Lorrain, C., McDonald, M.C., Milgate, A., Solomon, P.S., Warren, R., Puccetti, G., Scalliet, G., Torriani, S.F.F., Gout, L., Marcel, T.C., Suffert, F., Alassimone, J., Lipzen, A., Yoshinaga, Y., Daum, C., Barry, K., Grigoriev, I.V., Goodwin, S.B., Genissel, A., Seidl, M.F., Stukenbrock, E.H., Lebrun, M.-H., Kema, G.H.J., McDonald, B.A., Croll, D., (2023). A thousand-genome panel retraces the global spread and adaptation of a major fungal crop pathogen. *Nat Commun* 14, 1059.
- Fones, H., Gurr, S., (2015). The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genetics and Biology* 79, 3-7.
- Goodwin, S.B., Ben M'Barek, S., Dhillon, B., Wittenberg, A.H.J., Crane, C.F., Hane, J.K., Foster, A.J., Van Der Lee, T.A.J., Grimwood, J., Aerts, A., Antoniw, J., Bailey, A., Bluhm, B., Bowler, J., Bristow, J., Van Der Burgt, A., Canto-Canché, B., Churchill, A.C.L., Conde-Ferràez, L., Cools, H.J., Coutinho, P.M., Csukai, M., Dehal, P., De Wit, P., Donzelli, B., Van De Geest, H.C., Van Ham, R.C.H.J., Hammond-Kosack, K.E., Henrissat, B., Kilian, A., Kobayashi, A.K., Koopmann, E., Kourmpetis, Y., Kuzniar, A., Lindquist, E., Lombard, V., Maliepaard, C., Martins, N., Mehrabi, R., Nap, J.P.H., Ponomarenko, A., Rudd, J.J., Salamov, A., Schmutz, J., Schouten, H.J., Shapiro, H., Stergiopoulos, I., Torriani, S.F.F., Tu, H., De Vries, R.P., Waalwijk, C., Ware, S.B., Wiebenga, A., Zwiers, L.-H., Oliver, R.P., Grigoriev, I.V., Kema, G.H.J., (2011). Finished Genome of the Fungal Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola* Reveals Dispensome Structure, Chromosome Plasticity, and Stealth Pathogenesis. *PLoS Genet* 7, e1002070.
- Hafeez, A.N., Chartrain, L., Feng, C., Cambon, F., Clarke, M., Griffiths, S., Hayta, S., Jiang, M., Keller, B., Kirby, R., Kolodziej, M.C., Powell, O.R., Smedley, M., Steuernagel, B., Xian, W., Wingen, L.U., Cheng, S., Sainenac, C., Wulff, B.B.H., Brown, J.K.M., (2023). *Septoria tritici* blotch resistance gene *Stb15* encodes a lectin receptor-like kinase (preprint).

Kema, G.H.J., Mirzadi Gohari, A., Aouini, L., Gibriel, H.A.Y., Ware, S.B., Van Den Bosch, F., Manning-Smith, R., Alonso-Chavez, V., Helps, J., Ben M'Barek, S., Mehrabi, R., Diaz-Trujillo, C., Zamani, E., Schouten, H.J., Van Der Lee, T.A.J., Waalwijk, C., De Waard, M.A., De Wit, P.J.G.M., Verstappen, E.C.P., Thomma, B.P.H.J., Meijer, H.J.G., Seidl, M.F., (2018). Stress and sexual reproduction affect the dynamics of the wheat pathogen effector AvrStb6 and strobilurin resistance. *Nat Genet* 50, 375-380.

Langlands-Perry, C., Cuenin, M., Bergez, C., Krifa, S.B., Gélisse, S., Sourdille, P., Valade, R., Marcel, T.C., (2021). 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, 100.

Lapalu, N., Lamothe, L., Petit, Y., Genissel, A., Delude, C., Feurtey, A., Abraham, L.N., Smith, D., King, R., Renwick, A., Appert, M., Sucher, J., Steindorff, A.S., Goodwin, S.B., Kema, G.H.J., Grigoriev, I.V., Hane, J., Rudd, J., Stukenbrock, E., Croll, D., Scalliet, G., Lebrun, M.-H., (2023). Improved gene annotation of the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* based on combined Iso-Seq and RNA-Seq evidence (preprint). *Genomics*.

McDonald, B.A., Mundt, C.C., (2016). How Knowledge of Pathogen Population Biology Informs Management of Septoria Tritici Blotch. *Phytopathology*® 106, 948-955.

McDonald, B.A., Suffert, F., Bernasconi, A., Mikaberidze, A., (2022). How large and diverse are field populations of fungal plant pathogens? The case of *Zymoseptoria tritici*. *Evolutionary Applications* 15, 1360-1373.

Meile, L., Croll, D., Brunner, P.C., Plissonneau, C., Hartmann, F.E., McDonald, B.A., Sánchez-Vallet, A., (2018). A fungal avirulence factor encoded in a highly plastic genomic region triggers partial resistance to septoria tritici blotch. *New Phytol* 219, 1048-1061.

Orellana-Torrejon, C., Vidal, T., Boixel, A., Gélisse, S., Saint-Jean, S., Suffert, F., 2022a. Annual dynamics of *Zymoseptoria tritici* populations in wheat cultivar mixtures: A compromise between the efficacy and durability of a recently broken-down resistance gene? *Plant Pathology* 71, 289-303.

Orellana-Torrejon, C., Vidal, T., Gazeau, G., Boixel, A.-L., Gélisse, S., Lageyre, J., Saint-Jean, S., Suffert, F., (2022). Multiple scenarios for sexual crosses in the fungal pathogen *Zymoseptoria tritici* on wheat residues: Potential consequences for virulence gene transmission. *Fungal Genetics and Biology* 163, 103744.

Orellana-Torrejon, C., Vidal, T., Saint-Jean, S., Suffert, F., (2022b). The impact of wheat cultivar mixtures on virulence dynamics in *Zymoseptoria tritici* populations persists after interseason sexual reproduction. *Plant Pathology* 71, 1537-1549.

Saintenac, C., Cambon, F., Aouini, L., Verstappen, E., Ghaffary, S.M.T., Poucet, T., Marande, W., Berges, H., Xu, S., Jaouannet, M., Favery, B., Alassimone, J., Sánchez-Vallet, A., Faris, J., Kema, G., Robert, O., Langin, T., (2021). A wheat cysteine-rich receptor-like kinase confers broad-spectrum resistance against *Septoria tritici* blotch. *Nat Commun* 12, 433.

Saintenac, C., Lee, W.-S., Cambon, F., Rudd, J.J., King, R.C., Marande, W., Powers, S.J., Bergès, H., Phillips, A.L., Uauy, C., Hammond-Kosack, K.E., Langin, T., Kanyuka, K., (2018). Wheat receptor-kinase-like protein Stb6 controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Nature Genetics* 50, 368-374.

Stam, R., McDonald, B.A., (2018). When resistance gene pyramids are not durable-the role of pathogen diversity: R-gene pyramid durability and pathogen diversity. *Molecular Plant Pathology* 19, 521-524.

PERSIST : Préserver et améliorer l'efficacité des gènes de résistance à la septoriose : le cas du gène *Stb16q*

Jean-Noël THAUVIN¹, Gaëlle MARLIAC¹, Florence CAMBON¹, Carolina Orellana TORREJON², Benjamin NOWAK³, Madison VAN'T KLOOSTER², Eïlen GOUEMEND-DUGUE⁴, Gabriel BEUDIN⁵, Laure DUCHALAIS⁶, Delphine HOURCADE⁷, Lilian GOUT², Gert KEMA⁸, Romain VALADE⁷, Anne GENISSEL², Frederic SUFFERT², Marc-Henri LEBRUN², Cyrille SAINTENAC^{1*}

- 1 - Université Clermont Auvergne, INRAE, GDEC, 5 chemin de beaulieu, 63000 Clermont-Ferrand, FRANCE
- 2 - Université Paris-Saclay, INRAE, UR 1290 BIOGER, Palaiseau, FRANCE
- 3 - Université Clermont Auvergne, INRAE, Territoires, 9 avenue Blaise Pascal, 63170 Aubière, FRANCE
- 4 - Florimond-Desprez Veuve & Fils SAS, 3 rue Florimond-Desprez, BP 41, 59242 Cappelle-en-Pévèle, FRANCE

- 5 - RAGT, Rue Émile Singla, Site de Bourran, 12 000 Rodez
 - 6 - ancienne adresse : RAGT, Rue Émile Singla, Site de Bourran, 12 000 Rodez, adresse actuelle : AgriObtentions, Ferme de Gauvilliers, 78660 Orsonville, FRANCE
 - 7 - ARVALIS Institut du Végétal, Boigneville, FRANCE
 - 8 - Laboratory of Phytopathology, Wageningen University & Research, Wageningen, 6700 AA, THE NETHERLANDS
- *Coordinateur : Cyrille SAINTENAC, cyrille.saintenac@inrae.fr

Résumé: Le projet PERSIST avait pour objectif de mieux comprendre la dynamique de contournement des gènes de résistance à la septoriose dont le gène *Stb16q* et d'identifier des stratégies/solutions pour limiter ces contournements et améliorer l'efficacité de ces gènes. L'étude des réseaux Vigiculture® et Arvalis a montré une perte progressive de l'efficacité du gène *Stb16q* sur le territoire français variable en fonction des régions. Des analyses complémentaires ont permis d'identifier des candidats pour le gène d'avorulence *AvrStb16q*, de montrer que l'avorulence se transmet par reproduction sexuée sur des variétés portant le gène *Stb16q* et de montrer une forte structuration de la population virulente *Stb16q* suggérant la possibilité d'utiliser efficacement ce gène dans certains contextes de culture. De plus, ce projet a permis d'identifier des accessions de blé et des QTL de résistance permettant de conférer une résistance contre les isolats virulents vis-à-vis de *Stb16q*, ressources pouvant être utilisées pour développer de nouvelles variétés de blé résistantes vis-à-vis de la population de *Z. tritici* virulente sur *Stb16q*.

Introduction: La septoriose est l'une des maladies les plus dommageables pour la culture du blé en France (Figure 1). Chaque année, les pertes de rendement sont estimées entre 350 et 700 millions d'euros pour la France. Seulement 23 gènes majeurs de résistance ont été cartographiés génétiquement et tous sont contournés par la population française de *Z. tritici*. A titre d'exemple, le gène *Stb16q* utilisé récemment dans les variétés de blé françaises a perdu son efficacité suite à l'apparition de populations de *Z. tritici* virulentes contre ce gène. Afin de limiter ces contournements et préserver les résistances introduites dans les variétés Françaises, il est ainsi important de comprendre comment s'opère ces contournements mais il est également crucial d'étudier comment utiliser ces gènes même contournés pour construire des résistances efficaces. Le projet PERSIST avait pour objectif d'apporter des éléments de réponses en se focalisant sur l'étude du gène *Stb16q*.



Figure 1: Symptômes causés par le champignon *Z. tritici*

1 – Apparition et diffusion de la virulence *Stb16q* sur le territoire français

L'analyse des données des réseaux Vigiculture® et Arvalis a permis de montrer une adaptation progressive de la population de *Z. tritici* au gène *Stb16q* comme à d'autres résistances (Rubisko). Elle a également mis en avant que l'année 2016, une année à forte pression parasitaire, avait été charnière pour la diffusion de cette virulence (Figure 2). L'étude de croisement entre isolats de *Z. tritici* a montré que l'avorulence vis-à-vis du gène *Stb16q* pouvait se transmettre lors de la reproduction sexuée du champignon sur des blés portant le gène *Stb16q* (Figure 3) permettant de prolonger l'efficacité du gène de résistance.

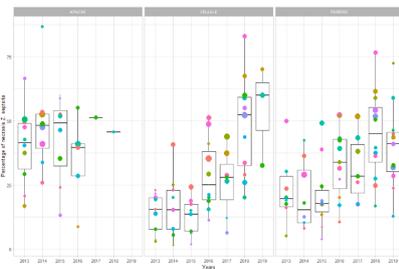


Figure 2: Evolution des sévérités de septoriose sur les variétés de blé Apache, Cellule (*Stb16q*) et Rubisko dans différentes régions de France entre 2012 et 2019

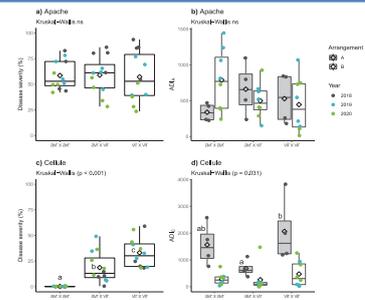


Figure 3: Impact de co-inoculation d'isolats de *Z. tritici* avirulents (avr) et/ou virulents (vir) sur le gène *Stb16q* sur la sévérité de maladies (a et c) et l'intensité de la reproduction sexuée (ADIC, b et d) sur les variétés Apache (sans *Stb16q*) et Cellule (avec *Stb16q*) sur trois années et avec deux protocoles différents (A et B).

2 – Identification du gène d'avorulence *AvrStb16q*

Deux approches de génétique ont été utilisées pour identifier le gène *AvrStb16q*. Une étude QTL à partir de la population bi-parentale issue du croisement entre l'isolat IPO323 avirulent vis-à-vis de *Stb16q* et l'isolat cfz008 prélevé sur la variété Cellule et virulent *Stb16q*. Cette analyse a permis de mettre en évidence un QTL majeur présent sur le chromosome 11 (Figure 4). Six gènes exprimés lors de l'infection de *Z. tritici* et codant de petites protéines secrétées ont été identifiés dans la région et sont en cours de validation fonctionnelle. Une analyse de génétique d'association à partir d'une collection d'isolats virulents et avirulents de *Z. tritici* vis-à-vis de *Stb16q* a révélé d'autres QTL impliqués dans la virulence de *Z. tritici*. L'identification du gène *AvrStb16q* permettra de mieux comprendre les événements moléculaires à l'origine du contournement mais également de suivre cette virulence dans les populations françaises afin d'adapter le déploiement de *Stb16q*.

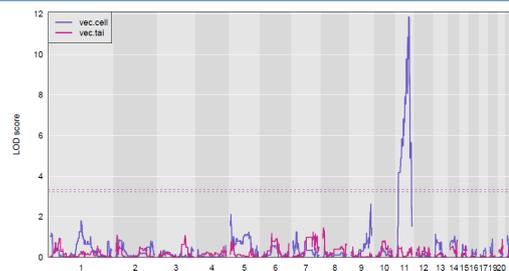


Figure 4: QTL impliqué dans la virulence *Stb16q* identifié suite au phénotypage de la variété Cellule (bleu) ou Taichung-29 (rose) avec les descendants du croisement entre l'isolat IPO323 et cfz008.

3 – Identification de géniteurs et de régions génomiques pour la résistance à la septoriose

Une collection de 75 variétés de blé comprenant notamment 17 variétés Françaises portant le gène *Stb16q* et 35 blés synthétiques ont été évalués pour leur résistance à la septoriose au cours de 12 essais au champ et lors de deux essais au stade plantule avec deux isolats virulents contre le gène *Stb16q*. Ces essais ont mis en évidence 20 accessions de blé résistantes à la septoriose sur l'ensemble des essais. L'analyse QTL de populations réalisées à partir du blé synthétique TA4152-19, résistant dans l'ensemble des essais au champ et pour lequel aucune souche virulente n'a été identifiée à ce jour, montre la présence de sept QTL de résistance présents chez cette accession, les deux gènes *Stb6*, *Stb16q*, trois QTL positionnés sur les gènes *Stb11*, *Stb18*, *Stb20q* et un QTL situé sur le chromosome 3D et un sur le 7B. De même, l'étude de deux populations produites à partir de la variété Nogal, résistante à plusieurs souches virulentes *Stb16q* montre la présence de trois QTL de résistance chez cette variété situés au niveau des gènes *Stb10*, *Stb16q* et *Stb18* (Figure 5). Ces combinaisons de QTL de résistance expliquant vraisemblablement la résistance large spectre observée chez ces accessions, pourrait être utilisées pour développer de nouvelles variétés résistantes.

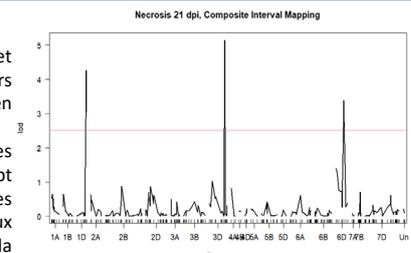


Figure 5: Un QTL sur le chromosome 1D (*Stb10*), sur le 3D (*Stb16q*) et sur le 6D (*Stb18*) ont été identifiés à partir de l'analyse de la population Nogal x Bio110.