

9^{ème} RENCONTRE SCIENTIFIQUE DU FSOV

Jeudi 4 Avril 2024

Centre de conférences
Athènes Services



FsoV 

Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale



Le Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale (FSOV), est un fonds de soutien créé dans le cadre de l'accord interprofessionnel relatif au renforcement des moyens de l'obtention variétale dans le domaine des céréales à paille. Dans ce cadre, il a vocation à financer des programmes de recherche rapprochant partenaires publics, privés, et instituts techniques, et visant à apporter par la création variétale, des solutions concrètes aux préoccupations des producteurs de céréales à paille : économies d'intrants, adaptation aux changements climatiques, ou encore une production de haute qualité technologique pour ne citer que les plus évidents. En ce sens, le FSOV symbolise ainsi la volonté et l'engagement de notre filière à promouvoir ce progrès génétique.

Aujourd'hui, avec presque 120 programmes de recherche subventionnés depuis sa création en 2001, le FSOV a su démontrer son intérêt et sa pertinence pour la création variétale et la filière céréalière dans toute sa diversité d'espèce : le blé tendre, le blé dur ou l'orge bien sûr, mais aussi l'avoine, le seigle, le triticale, l'épeautre ou encore le riz.

Ce recueil est un témoignage de cette contribution du FSOV, avec présenté ici l'aboutissement des travaux réalisés dans le cadre de l'appel à projets du FSOV 2018, soit 14 programmes de recherches particulièrement diversifiés. J'espère que cette lecture, saura vous convaincre de l'impact de ces travaux pour le développement à court terme de nouveaux outils technologiques, moléculaires ou méthodologiques performants et innovants.

Les défis à relever par l'agriculture au cours des prochaines années sont colossaux : changements climatiques, souveraineté alimentaire, décarbonation, dans un contexte politique et réglementaire de plus en plus contraignant. Toutefois, plus que jamais, nous pensons que l'innovation variétale doit tenir un rôle central, fort et fédérateur au sein de notre filière, et c'est dans ce but que nous avons choisi de retenir 12 nouveaux programmes en réponse à l'appel à proposition du FSOV 2023. Mais nous vous en parlerons une prochaine fois...

Thomas Bourgeois

Président du Comité d'engagement du FSOV



semae

Toutes les semences pour demain

Section Semences de Céréales à paille & Protéagineux

44 rue du Louvre - 75001 Paris

Tél. : 01 42 33 85 05 - E-mail : fsov@semae.fr

www.fsov.org

SOMMAIRE

FSOV 2018 B	RémoBlé : Améliorer la remobilisation de l'azote pour augmenter la concentration en protéines du blé	6
FSOV 2018 C	PROsIT : Qualification des protéines d'intérêt pour la qualité brassicoles des orges	16
FSOV 2018 D	DéLiBéré-JNO : Développement de lignées de Blé Adaptées et résistantes à la Jaunisse Nanisante (JNO)	28
FSOV 2018 E	Fus'eye : Nouvel outil de phénotypage spectral au champ pour quantifier la fusariose de l'épi sur céréales	35
FSOV 2018 H	PolyBléD : Quelles nouvelles polyploïdisations réaliser pour améliorer l'adaptation du blé tendre aux contraintes à venir ?	51
FSOV 2018 I	ResistaMicro : Comprendre et Maîtriser les infections de Microdochium pour améliorer la résistance du blé à la « Microdochiose »	64
FSOV 2018 J	CRACQ : Clonage et caractérisation d'un gène de maintien du rendement en conditions de stress thermique et hydrique	77
FSOV 2018 K	TritiRB : Caractérisation de sources de résistance durables à la rouille brune chez le Triticale	90
FSOV 2018 M	DéBAT : Analyse de Diversité d'un Panel de Pré-breeding de Blé tendre par une Approche Transcriptomique	102
FSOV 2018 N	PERSIST : Préserver et améliorer l'efficacité des gènes de résistance à la septoriose : le cas du gène Stb16q	113
FSOV 2018 O	PHENOTOL : Phénotypage variétal de la tolérance et des traits associés	123
FSOV 2018 P	ExIGE : Prédictions génomiques multi-environnementales chez le blé tendre « exotique », valeurs per se et en croisement	133
FSOV 2018 R	PLASTIX : Plasticité des composantes de rendement des céréales à pailles	155
FSOV 2018 S	DivR : Des outils moléculaires pour la sélection de résistances diversifiées et efficaces contre la septoriose du blé	166

RémoBlé : améliorer la remobilisation de l'azote pour augmenter la concentration en protéines du blé

Fabien CHARDON^{1*}, Emmanuelle BANCEL², Catherine RAVEL², Anne MARMAGNE¹, Manon LARDOS¹, Céline MASCLAUX-DAUBRESSE¹, Séverine ROUGEOL², Amélie BRESSON², Esther RODRIGUEZ DE HARO², Lilian FAURIE², David ALVAREZ², Sibille PERROCHON², Katia BEAUCHENE⁴, Aida ROUAHI⁵, Valérie HERTEMAN⁶, Pierre MARTRE⁵, Pierrick VARENNE⁶, Jean-Charles DESWARTE³, Jacques LE GOUIS²

1 - INRAE - Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin (JJPB), 78000 Versailles

2 - INRAE - Université Clermont-Auvergne, UMR GDEC, 63000 Clermont-Ferrand

3 - ARVALIS - Institut du Végétal, ZA des graviers, Route de Chateaufort, 91190 Villiers-le-Bâcle

4 - ARVALIS - Institut du Végétal, 45 voie Romaine, Ouzouer-le-Marché, 41240 Beauce-la-Romaine

5 - INRAE - Institut Agro/SupAgro Montpellier, UMR LEPSE, 34060 Montpellier

6 - LIMAGRAIN EUROPE - Rue Henri Mondor, 63360 Saint-Beauzire

*Coordinateur du projet : Fabien CHARDON, fabien.chardon@inrae.fr

1 Introduction

Dans un contexte marqué par une demande mondiale croissante en produits céréaliers, l'amélioration des variétés de blé est devenue impérative. Cependant, les avancées en termes de rendement sont souvent accompagnées d'une diminution de la concentration en protéines, orientant l'usage des grains et limitant leur valorisation économique. Ainsi, en moyenne et à fertilisation azotée constante, un progrès génétique de 10 q/ha se traduit par une baisse de 1% en protéines (Oury et Godin, 2007). Parallèlement, les préoccupations environnementales, notamment liées au réchauffement climatique, restreignent l'utilisation de la fertilisation azotée nécessaire à la croissance des cultures, car c'est une source importante d'émission de gaz à effet de serre. Ainsi, la nécessité de comprendre la relation complexe entre le rendement et la concentration en protéines émerge comme un défi majeur pour l'agriculture moderne.

Le projet RémoBlé répond à cet enjeu en se focalisant sur la compréhension fine des mécanismes physiologiques liés au locus spécifique *NAM-B1* (également appelé *GPC-B1*), récemment identifié comme un élément clé influençant la concentration en protéines, sans compromettre le rendement, tout en régulant la sénescence chez un blé sauvage (*Triticum turgidum ssp. dicoccoides*) (Uauy et al 2006a ; Distelfeld et al 2006). Cet effet positif se manifeste notamment à travers un trait de sélection connu sous le nom de GPD (Grain Protein Deviation), qui représente l'écart à la régression négative entre rendement en grain et concentration en protéines (Monaghan et al., 2001). La sénescence et la remobilisation de l'azote chez les céréales jouent un rôle crucial dans la nutrition des plantes et la qualité des grains. La remobilisation de l'azote, qui représente 50-90% de l'azote présent dans le grain à maturité est un processus vital pour assurer un rendement optimal tout en maintenant une teneur en protéines adéquate. Pendant la phase de sénescence, les plantes dégradent l'appareil photosynthétique, libérant ainsi l'azote stocké dans les feuilles et permettant sa remobilisation vers les grains en développement. Une bonne synchronisation de la sénescence avec la remobilisation est essentielle pour garantir un remplissage efficace des grains et

maximiser le potentiel de rendement. Cependant, les mécanismes sous-jacents de la sénescence et de la remobilisation de l'azote restent incomplètement compris.

La cartographie fine du locus *NAM-B1* sur le chromosome 6B a révélé que le gène causal est un facteur de transcription NAC, homologue du gène *AtNAP* d'*Arabidopsis* (Guo et Gan 2006) et du gène *OsNAP* du riz (Liang et al., 2014 ; Chen et al., 2014), décrits comme des régulateurs positifs de la sénescence et qui modifient le rendement et la durée de remplissage des grains. Une copie de ce gène, *NAM-A1*, présente sur le génome A du blé, a également été associée à la régulation de la teneur en protéines (Cormier et al., 2015). Par ailleurs, une autre copie, appelée *GPC-2*, est présente sur les chromosomes du groupe 2 du blé hexaploïde, présentant un profil de transcription similaire à *GPC-B1* (Uauy et al., 2006b). Les niveaux de transcription des différents gènes *NAM* augmentent progressivement pendant la phase de remplissage des grains, suggérant leur implication dans la sénescence. Des études utilisant l'interférence ARN pour réduire les niveaux de transcription de ces gènes ont montré un retard de la sénescence et une diminution de plus de 30% de la teneur en azote, zinc et fer dans le grain (Uauy et al., 2006b). L'allèle fonctionnel de *NAM-B1*, trouvé chez *T. turgidum ssp. dicoccoides*, avait été rapporté comme absent chez le blé tendre (*T. aestivum ssp. aestivum*). Ce n'est qu'en 2012, que Hagenblad et al. (2012) ont rapporté la présence de cet allèle fonctionnel dans seulement quelques ressources patrimoniales.

L'effet positif de *NAM-B1* sur la teneur en protéine des grains a été démontré initialement chez le blé dur, provoquant une augmentation de 10% à 15% (Distelfeld et al ; 2007). L'allèle fonctionnel de *NAM-B1* a déjà été intégré dans des programmes de sélection au Canada pour augmenter la teneur en protéines du blé de printemps (dePauw et al., 2007). Cette stratégie a conduit à une augmentation significative de la concentration en protéines sans observer d'effet négatif notable sur le rendement. Par la suite, d'autres introgressions ont été réalisées dans des pools génétiques adaptés aux conditions des États-Unis d'Amérique (Brevis et Distelfeld, 2010), de l'Inde (Kumar et al., 2011), de l'Argentine (Tabbita et al., 2013), et de



l'Australie (Eagles *et al.*, 2014). Dans toutes ces études, la stratégie d'introgession s'est avérée fructueuse montrant que le locus *NAM-B1* pouvait être utilisé pour améliorer la teneur en protéine, de 5 % à 10 % selon les génotypes, sans trop affecter le rendement des variétés, bien que l'effet du gène soit parfois modulé par l'environnement. Ces résultats laissent entrevoir la possibilité d'appliquer cette stratégie à des lignées adaptées aux conditions nord-européennes.

Rapidement après la découverte de Uauy, l'allèle fonctionnel du gène *NAM-B1* du blé sauvage a été introduit dans des variétés de blé tendre d'hiver spécifiquement adaptées aux conditions françaises. Ce travail a conduit à l'obtention de lignées quasi-isogéniques. Les premières évaluations sur le terrain de ce matériel, dans le cadre du projet FSOV 2014E NIL-N, ont démontré que, en moyenne, l'allèle fonctionnel du locus *NAM-B1* favorise le remplissage des grains en protéines par rapport à son homologue non-fonctionnel. Le projet vise à répondre à trois questions clés : Quels sont les effets du locus *NAM-B1* sur le rendement et la teneur en protéines des grains dans des lignées de blé d'hiver ? Quel est son impact sur l'initiation de la sénescence et la remobilisation de l'azote des feuilles vers le grain ? Peut-on identifier des marqueurs moléculaires associés à la sénescence et à la remobilisation de l'azote pour une sélection plus efficace des variétés de blé ?

2 Matériel et méthode

► 2.1 Matériel végétal

L'allèle fonctionnel du gène *NAM-B1* a été transféré par rétrocroisement dans deux fonds génétiques : la variété Skerzco (INRA, 2011) qui montre un écart positif à la relation négative entre le rendement et la concentration en protéines (GPD+) et la variété Arlequin (Nickerson, 2007) qui montre un écart négatif (GPD-). Les lignées donneuses de l'allèle fonctionnel *NAM-B1* proviennent de J. Dubcovsky (Davis, USA). Le tri des lignées s'est fait d'abord grâce au marqueur PCR (Xuhw89) situé à 0,1 cM du gène d'intérêt. Ce marqueur a été transformé ensuite en marqueur KASPAR dans le cadre du projet FSOV 2010H (coord. P. Sourdille). Sur la base des données de génotypage, la similitude entre lignées soeurs est supérieure à 96 %.

► 2.2 Évaluation au champ

Réseau expérimental

Les deux couples de lignées isogéniques ont été expérimentés pendant deux ans sur trois sites : INRAE Clermont-Ferrand (63) (2019, 2020), Limagrain Verneuil-l'Étang (77) (2019, 2020), Arvalis Ouzouer-le-Marché (41) (2019) et Arvalis Saint-Bonnet-de-Mure (69) (2020). A Clermont-Ferrand et Verneuil-l'Étang, trois traitements azotés ont été appliqués : dose bilan (X), dose sub-optimale concentrée sur les premiers apports (X-60 kg N/ha) et dose sub-optimale concentrée sur les apports tardifs (X-60 kg N/ha). A Ouzouer-le-Marché et Saint-Bonnet-de-Mure une combinaison de traitements azoté et hydrique a été appliquée : dose bilan (X) et dose sub-optimale apport précoce (X-80 kg N/ha) irriguées, et dose sub-optimale

apport précoce (X-80 kg N/ha) pluviale. Au total, les deux couples de lignées ont donc été testés dans 18 environnements. Trois blocs de répétitions ont été implantés dans tous les environnements sauf à Saint-Bonnet-de-Mure où il y avait quatre blocs.

Phénotypage

Pour chaque combinaison de l'environnement, la variété et la répétition, deux micro-parcelles adjacentes ont été semées. La première parcelle a été utilisée pour des prélèvements destructifs à la floraison et à la maturité. Ils ont permis de mesurer la matière sèche aérienne et la concentration en azote (méthode Dumas). La quantité d'azote absorbée avant la floraison et remobilisée vers le grain est estimée en soustrayant la quantité d'azote des parties végétatives à maturité à la quantité d'azote à floraison. L'efficacité de remobilisation est estimée en divisant la quantité d'azote mobilisée par la quantité d'azote absorbée à floraison dans les parties aériennes. La deuxième parcelle a été utilisée pour (i) des mesures d'indice de végétation (*Normalized Difference Vegetation Index*, NDVI) par GreenSeeker (Clermont-Ferrand), drone (Verneuil-l'Étang et Saint-Bonnet-de-Mure) et portique (Ouzouer-le-Marché), (ii) des observations de la date d'épiaison, (iii) des estimations des composantes du rendement, nombre d'épis par m² et poids de mille grains (PMG), (iv) de la hauteur des plantes, et (v) du rendement machine et de la concentration en protéines (spectrométrie dans le proche infra-rouge, NIRS).

Apport de la modélisation

Le modèle Sirius a été mis en œuvre en utilisant l'ensemble des données provenant des essais sur le terrain. Les premières prédictions générées par le modèle ont été employées afin d'évaluer l'homogénéité de l'ensemble de données et d'identifier diverses erreurs ou incohérences dans les variables, résultant de variations dans les notations ou de disparités dans les unités de mesure choisies par les différents partenaires. Des itérations successives entre l'ensemble de données et les prédictions du modèle Sirius ont permis de parvenir à un ensemble de données stables, cohérentes, et sous un format FAIR.

Statistiques

L'évolution du NDVI a été suivie en fonction des sommes de degrés.jour (*j base 0°C) depuis l'épiaison. Une courbe a été ajustée pour chaque micro-parcelle avec la fonction *smooth.spline()* du logiciel R. Cet ajustement a été utilisé pour déterminer la somme de degrés.jour après épiaison à laquelle le NDVI avait baissé de la moitié de sa valeur maximale.

Pour toutes les variables disponibles, le modèle d'analyse de variance à effets fixes suivant a été utilisé :

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + F_j + E_k + AF_{ij} + AE_{jk} + FE_{jk} + AFE_{ijk} + EB_{kl} + e_{ijkl}$$

où Y_{ijkl} représente la variable Y mesurée pour l'allèle A_i (fonctionnel ou non fonctionnel), pour le fond génétique F_j (Skerzco ou Arlequin), l'environnement E_k (de 1 à 18) et le bloc de répétition B_l (de 1 à 3 ou 1 à 4), suivi de la moyenne générale μ , des effets principaux, des effets d'interaction, de l'effet bloc hiérarchisé à l'environnement et de la résiduelle.

► 2.3 Évaluation en conditions semi-contrôlées en serre

Condition de culture

Les couples de lignées isogéniques (Arlequin et Skerzco) ont été cultivés sous serres climatisées successivement en 2019 et 2020, dans des pots remplis d'un mélange de sable et de terreau. A chaque culture, 144 plantes ont été arrosées 4 fois par jour par un système de goutte à goutte avec une solution nutritive non limitante en azote (5,0 mM KNO_3). A la floraison, une moitié des plantes est restée à 5,0 mM et l'autre est passée à une solution faible (0,5 mM KNO_3). La nutrition différentielle a été conduite jusqu'à la maturité des grains.

Marquage des plantes au ^{15}N

Une semaine avant la montaison, 60 ml d'une solution d'enrichissement de 5,0 et 0,5 mM de K^{15}NO_3 10% ont été appliqués au pied de chaque plante. A la fin de leur cycle, lorsque toutes les graines étaient mures et que les plantes étaient sèches, les plantes ont été récoltées en deux parties : premiers épis et restes. Les échantillons ont été ensuite séparés en (i) feuilles 1 à 4, (ii) tiges, (iii) rachis, et (iv) grains. Pour chaque organe, des sous-échantillons de 1 000-2 000 μg ont été soigneusement pesés dans des capsules d'étain afin de déterminer les pourcentages totaux de C et de N (N% et C% en mg (100 mg DW) $^{-1}$) et l'abondance de ^{15}N à l'aide d'un analyseur élémentaire organique FLASH 2000 (Thermo Fisher Scientific) couplé à un spectromètre de masse à rapport isotopique DELTA V Advantage (Thermo Fisher Scientific).

Le flux d'azote remobilisé correspond à l'azote recyclé des vieux organes, tels que les feuilles sénescentes, transporté vers les graines. L'indice ^{15}NHI mesure la remobilisation de l'azote et correspond à la proportion de l'azote remobilisé alloué aux graines (Marmagne *et al.* 2020). Le rapport entre ^{15}NHI et HI définit l'efficacité de la remobilisation de l'azote (NRE). La NRE compare la proportion de la remobilisation de l'azote qui va aux graines à la proportion de biomasse produite par les graines par rapport à l'ensemble de la plante.

Phénotypage (cinétique)

La teneur en chlorophylle des 4 dernières feuilles a été suivie par une pince Dualex (Force A) trois fois par semaine à partir de la montaison. Les données journalières ont été transformées en degrés jours à partir de la date de floraison.

A partir de la floraison, trois plantes par condition et génotype ont été prélevées toutes les semaines pour constituer une cinétique de prélèvement, couvrant les différents stades de développement (T1 à T6).

Analyses protéomiques

Les données protéomiques ont été acquises par spectrométrie de masse de type label-free à partir des protéines solubles extraites des feuilles et des grains prélevés aux 6 stades de développement de la variété Skerzco cultivée en conditions contrôlées. L'identification des peptides et l'inférence des protéines ont été réalisées avec X!TandemPipeline (Langella *et al.*, 2017) et la quantification des protéines avec MassChroQ (Valot *et al.*, 2011). Les identifications ont été faites sur la base *uniprot taxonomie* « 4564 » triticum (423 604 entrées).

Sur chaque jeu de données, de manière indépendante, les abondances des protéines ont été centrées et réduites par échantillon. Elles ont ensuite été analysées sous R avec un modèle d'analyse de variance comprenant les facteurs allèle, temps (date de prélèvement), nutrition, et toutes les interactions d'ordre 2 et d'ordre 3. Enfin, les abondances centrées réduites ont été divisées par la valeur maximale observée pour chaque protéine. A partir de cette normalisation, les protéines présentant des profils d'expression similaires au cours du temps ont été regroupées en clusters à l'aide d'un partitionnement hiérarchique (méthode ward D2), réalisé avec la fonction *pHeatmap* de R. Pour chaque cluster, une analyse d'enrichissement des annotations GO a été réalisée à l'aide *ShyngiGO* (Ge *et al.*, 2020).

Méta-Analyse

Les gènes codant pour les protéines dont l'abondance est impactée significativement par le génotype ont été identifiés et localisés sur la séquence de référence du blé (refseq CS v2.1) par *tblastn*. Ce travail a permis de récupérer les numéros d'accèsion et les coordonnées de ces gènes à partir desquelles, les polymorphismes de séquence présents dans un intervalle de 1500 nucléotides en amont et en aval de chacun d'entre eux ont été listés. Les données de génotypage pour ces marqueurs ont été extraites d'une matrice de 261 000 marqueurs publics obtenue avec la puce BreedWheat Axiom TaBW410k (Rimbert *et al.*, 2018) pour les 196 lignées d'une collection phénotypée pour la concentration en protéine (GPC) et le GPD dans un réseau d'essai (3 lieux, 2 années de culture, 2 modalités de culture (faibles ou forts intrants) décrit dans Bordes *et al.* (2013). La matrice de génotypage des marqueurs moléculaires présents dans les gènes codant les protéines différentiellement abondante (DAP) et la matrice de phénotypage ont été utilisées pour une approche de génétique d'association réalisée avec la fonction GWAS du package *rrBLUP* version 4.6.2 (Endelman, 2011). Les matrices d'appariement ont été calculées à partir des 261 000 marqueurs par la méthode *Leave One Chromosome Out* (Rincet *et al.*, 2014). Un test du FDR (False Discovery rate) a été réalisé. Le seuil de 10% a été retenu pour déclarer un marqueur significativement associé à un des caractères étudiés.

3 Résultats

► 3.1 Quels sont les effets du locus *NAM-B1* sur le rendement et la teneur en protéines des grains dans les lignées de blé d'hiver ?

Les résultats de l'analyse de variance montrent un effet significatif de l'allèle sur la concentration en protéines du grain, sans effet sur le rendement (Tableau 1).

En moyenne, l'allèle fonctionnel augmente la concentration en protéines du grain de 0,5 point. L'interaction avec l'environnement (année x site x traitement) n'est pas significative malgré la diversité de scénarios hydriques et azotés. Les différents traitements générés, principalement des niveaux et stades d'application de l'azote, n'ont donc pas fortement modifié l'impact de l'allèle fonctionnel. L'effet de l'allèle ne dépend pas non plus du fond génétique, le résultat étant semblable pour Arlequin et Skerzco (Figure 1) malgré des teneurs

Variable	Effet Allèle	Effet Allèle x Environnement	Moyenne allèle fonctionnel	Moyenne allèle non fonctionnel
Date épiaison (j)	ns	<0,001	130,1	130,1
Rendement (q/ha à 0% humidité)	ns	ns	65,0	65,3
Concentration protéines (%)	<0,001	ns	12,8	12,3
Rendement en protéines (q/ha)	<0,001	ns	8,2	7,9
Indice de récolte	ns	ns	0,462	0,463
Indice de récolte de l'azote	<0,001	ns	0,781	0,758
Hauteur (cm)	ns	ns	85	85
PMG (g à 0% humidité)	<0,001	ns	34,2	35,1
Nombre d'épis / m ²	<0,001	ns	504	469
Nombre de grains (/m ²)	<0,001	ns	19008	18100
N floraison (kg N /ha)	ns	0,015	136,5	138,4
N post-floraison (kg N /ha)	ns	ns	46,2	51,6
Efficacité de remobilisation (%)	<0,001	ns	68	63
50% NDVImax (°j depuis épiaison)	<0,001	0,036	662	699

Tableau 1 : Résultats de l'analyse de variance globale sur les 18 environnements et moyenne des deux allèles de *NAM-B1*.

en protéines moyennes assez différentes (11,9 vs 13,3%) en lien en partie avec le potentiel de rendement de ces deux variétés (66,1 vs 64,2 q/ha à 0% humidité) et le fait que Skerzso soit classée comme variété GPD+. L'effet de l'allèle sur la concentration en protéines sans impact sur le rendement se traduit par une augmentation de 0,3 q/ha du rendement en protéines (Tableau 1). De même l'indice de récolte de l'azote est légèrement plus fort.

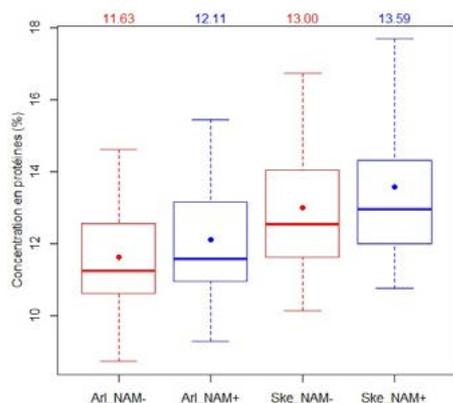


Figure 1 : Concentration en protéines (%) mesurées sur les 18 environnements pour les deux fonds génétiques (Arl, Arlequin ; Ske, Skerzso) et les deux allèles de *NAM-B1* (*NAM-*, allèle non fonctionnel ; *NAM+*, allèle fonctionnel). Les points représentent les moyennes, reportées au-dessus de chaque boxplot.

La date d'épiaison et la hauteur des plantes ne sont en moyenne pas influencées par l'allèle. Par contre, le nombre d'épis / m² et le nombre de grains / m² sont plus élevés et le PMG légèrement plus faible pour les lignées possédant l'allèle fonctionnel (34,2 vs 35,1 g).

► 3.2 Quel est l'impact du locus *NAM-B1* sur l'initiation de la sénescence et la remobilisation de l'azote des feuilles vers le grain ?

NAM-B1 active la sénescence des feuilles

Dans des conditions de culture contrôlées, la concentration en chlorophylle des feuilles décroît en fonction de leur position sur la plante et de leur âge (Figure 2). Les feuilles portant l'allèle fonctionnel présentent une diminution plus prononcée de la teneur en chlorophylle (Figure 2), et une augmentation en parallèle des anthocyanes et des flavonoïdes (données

non présentées), marquant un processus de vieillissement foliaire accéléré d'environ 10-11 jours par rapport aux feuilles des plantes portant l'allèle non fonctionnel. Ces observations confirment l'impact de *NAM-B1* sur le vieillissement des feuilles chez les variétés de blé européennes étudiées. La différence de concentration en chlorophylle entre les deux lignées est notable sur la feuille étandard (feuille 1) à partir de la floraison, mais elle se manifeste également avant la période de floraison sur les premières feuilles formées (feuilles 2 à 4), ce qui suggère que l'effet de *NAM-B1* influence à la fois le processus de sénescence séquentiel et monocarpique. En outre, les variations dans la composition en N des solutions nutritives appliquées après la floraison n'altèrent pas les tendances observées, ce qui suggère que les différences de nutrition n'ont pas d'incidence sur l'impact du locus *NAM-B1* sur la sénescence.

L'activité de *NAM-B1* sur la sénescence est confirmée en plein champ. En effet, l'allèle fonctionnel de *NAM-B1* a un effet significatif sur la sénescence du couvert et sur la remobilisation de l'azote vers le grain (Tableau 1). La date

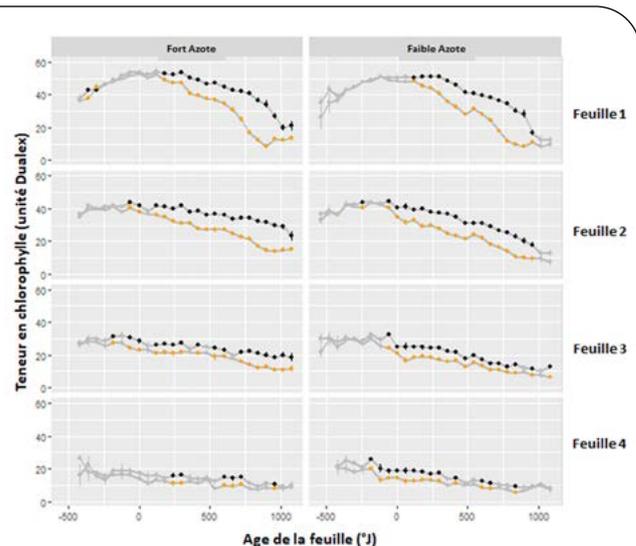


Figure 2 : Évolution de la teneur en chlorophylle des 4 premières feuilles à partir de l'épis chez le couple Skerzso cultivé à fort ou faible niveau d'azote. Les points oranges et noirs indiquent une différence significative de teneur ($P < 0,001$), respectivement entre l'allèle fonctionnel et l'allèle non fonctionnel, alors que les points gris marquent des différences non significatives entre les allèles.

de sénescence après épiaison, estimée par la somme de degrés.jour à laquelle le NDVI est divisé par deux par rapport à sa valeur maximale, est accélérée d'environ 44 °j, soit 2-3 jours en fonction des températures moyennes observées à la fin du remplissage du grain. Les différences d'effet observées entre les conditions de champ et en condition contrôlée peuvent s'expliquer par des différences de mesures (NDVI versus Dualex).

NAM-B1 favorise la remobilisation de l'azote des feuilles vers les grains

En condition contrôlée, les plantes portant l'allèle fonctionnel sont un peu plus petites que les plantes portant l'allèle non fonctionnel, en particulier pour les épis secondaires. Toutefois, l'allèle fonctionnel favorise l'allocation de l'azote dans les grains dans les premiers épis, sans pour autant modifier le rendement. En marquant l'azote stocké au stade végétatif avec un isotope lourd (¹⁵N), nous avons montré que l'allèle fonctionnel favorise la remobilisation de l'azote des feuilles vers les grains. La part de l'azote remobilisé des feuilles qui va dans le grain augmente de 10% sous une faible disponibilité en azote et de 11% sous une forte disponibilité post-floraison.

Au champ, l'efficacité de la remobilisation vers le grain de l'azote absorbée avant la floraison est améliorée par l'allèle fonctionnel de 5 points (Tableau 1). Cela se traduit par un surplus d'environ 7 kg N/ha remobilisés, qui expliquent le rendement en protéines supérieur. En

effet, ni la quantité d'azote absorbée à la floraison, ni la quantité d'azote absorbée en post-floraison ne sont significativement différentes entre les deux allèles.

► 3.3 Peut-on identifier des marqueurs moléculaires associés à la sénescence et à la remobilisation de l'azote pour une sélection plus efficace des variétés de blé ?

NAM-B1 modifie les profils d'accumulation de protéines dans les feuilles et les grains

Pendant le processus de remplissage des grains, une étude de protéomique a été menée pour analyser la cinétique des prélèvements de feuilles et de grains. Cette analyse a permis de quantifier 2084 protéines dans les extraits protéiques des feuilles et 2052 dans ceux des grains, avec un chevauchement de 654 protéines communes. À partir de ces données, deux approches ont été développées pour identifier les protéines modulées en présence de NAM-B1 : une analyse par clustering hiérarchique des profils cinétiques des protéines, une ANOVA portant sur les quantités de protéines à différents moments.

La clusterisation des données d'abondance normalisées révèle l'existence de 9 profils d'accumulation à la fois pour les feuilles et les grains (Figures 3 et 4). Les plus gros clusters des protéines foliaires montrent une cinétique décroissante de la photosynthèse et de la traduction (clusters 2 et 3) et une cinétique croissante des protéines impliquées dans la respiration anaérobie (cluster 4),

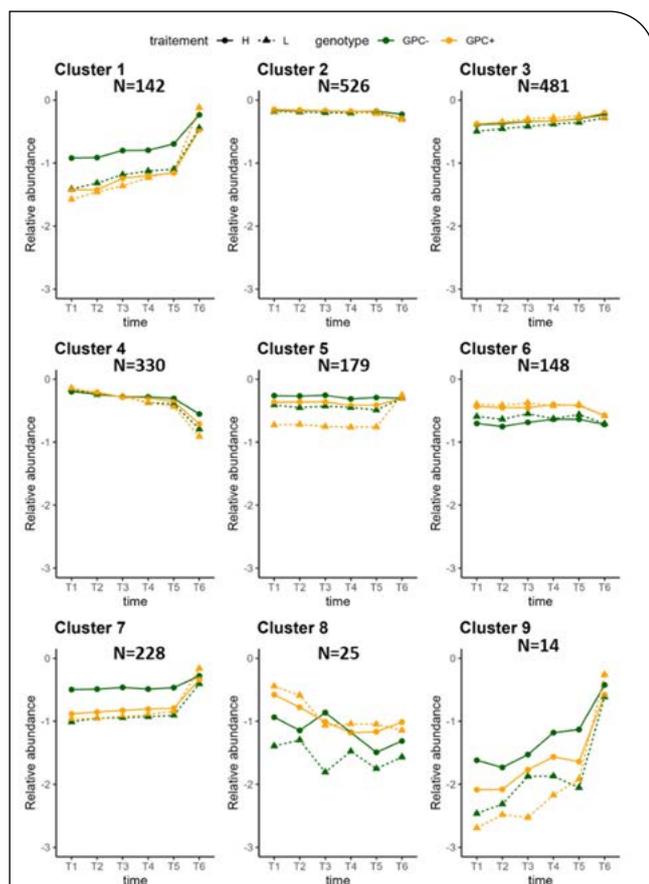


Figure 3 : Profils d'expression obtenus au cours du temps pour les protéines foliaires en fonction de l'allèle au locus NAM-B1 (orange pour l'allèle fonctionnel, GPC+, et vert pour l'allèle non fonctionnel, GPC-), et de la nutrition azotée (trait plein pour la nutrition azotée forte (H), pointillés pour la nutrition azotée faible (L)). Les effectifs (N) de chaque cluster sont indiqués.

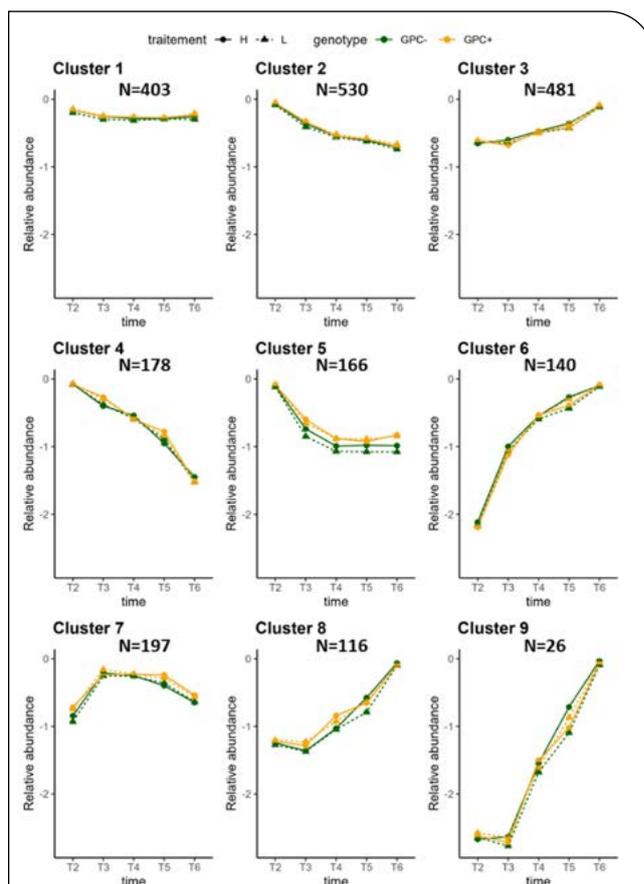


Figure 4 : Profils d'expression obtenus au cours du temps pour les protéines des grains en fonction de l'allèle au locus NAM-B1 (orange pour l'allèle fonctionnel, GPC+, et vert pour l'allèle non fonctionnel, GPC-) et de la nutrition azotée (trait plein pour la nutrition azotée forte (H), pointillés pour la nutrition azotée faible (L)). Les effectifs (N) de chaque cluster sont indiqués.

en cohérence avec la sénescence croissante observée avec l'âge des feuilles (Figure 2). Les autres clusters des protéines foliaires montrent principalement des différences entre les allèles (Figure 3). Ainsi, les 148 protéines du cluster 6, dont les fonctions sont liées aux enzymes du métabolisme des acides aminés, avec par exemple une glutamine synthétase cytosolique (Q6RUJ1), présentent des quantités plus importantes lorsque l'allèle *NAM-B1* est fonctionnel. Le clustering des profils des protéines des grains montrent des protéines qui s'accumulent (clusters 3, 6, 8, 9), qui décroissent (clusters 1, 2, 5), ou s'accumulent transitoirement (cluster 7) (Figure 4). Seuls les clusters 1, 5, 7 et 8 mettent en évidence des variations entre les profils liés aux allèles ou à la nutrition.

L'ANOVA met en évidence un fort effet significatif ($p < 0.01$) de l'âge des organes pour 1947 protéines des grains et 1253 des feuilles (Tableau 2). Un effet allèle significatif est observé pour 288 protéines foliaires et 562 protéines du grain, tandis qu'un effet de la nutrition est significatif pour 54 protéines foliaires et pour 158 protéines du grain. Des interactions entre facteurs sont également notées en particulier pour les protéines du grain (Tableau 2).

Facteur(s)	DAP Feuilles	DAP Grains
Âge de l'organe	1253	1947
Nutrition	54	158
Allèle	288	562
Âge de l'organe x nutrition	159	0
Âge de l'organe x Allèle	4	61
Nutrition x Allèle	0	74
Âge de l'organe x nutrition x Allèle	4	0

Tableau 2 : Résultats de l'ANOVA réalisée sur les données quantitatives ; DAP : protéine dont l'abondance varie. Leur nombre est indiqué par facteur considéré (âge de l'organe, nutrition, génotype) et de leur interaction.

Plusieurs protéines ayant des fonctions similaires présentent un effet significatif de l'allèle dans les feuilles et les grains. Ainsi, plusieurs protéines contenant un domaine phycocyanine. Ces protéines appartiennent aux clusters 1 (5 protéines) et 7 (2 protéines) du clustering des protéines foliaires. Dans ces clusters, leur abondance est la plus élevée dans les plantes sans l'allèle fonctionnel (GPC-) et sous un fort impact de la nutrition (Figure 3). De même, des protéines homologues à la *Nitrogen regulatory protein P-II* sont présentes dans le cluster 3 (*AOA3B5ZPI1*) des extraits foliaires (Figure 3) et le cluster 1 (*AOA3B5XWE4*) des extraits grains (Figure 4). Leurs profils d'abondance (Figure 5) montrent un effet allèle marqué en nutrition faible azote chez les feuilles et en nutrition fort azote chez les grains.

Parmi les protéines dont l'abondance varie significativement uniquement dans les extraits foliaires et en relation avec la présence de l'allèle *NAM-B1*, on trouve celles dont les fonctions sont associées aux activités enzymatiques liées à la photosynthèse et à des activités de type protéases.

Les protéines spécifiques des grains différenciellement abondantes en fonction des allèles présentent des fonctions de type chaperonne/repliement (*folding*, *heat shock proteins*, *protein disulfide isomerase*,

peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, *prefolding*), protéolytique (*aminopeptidases*) ou relevant du métabolisme des carbohydrates, du métabolisme du glutathion (*glutathione transferase*), et de la réponse au stress oxydatif (*peroxiredoxin*, *thioredoxin*).

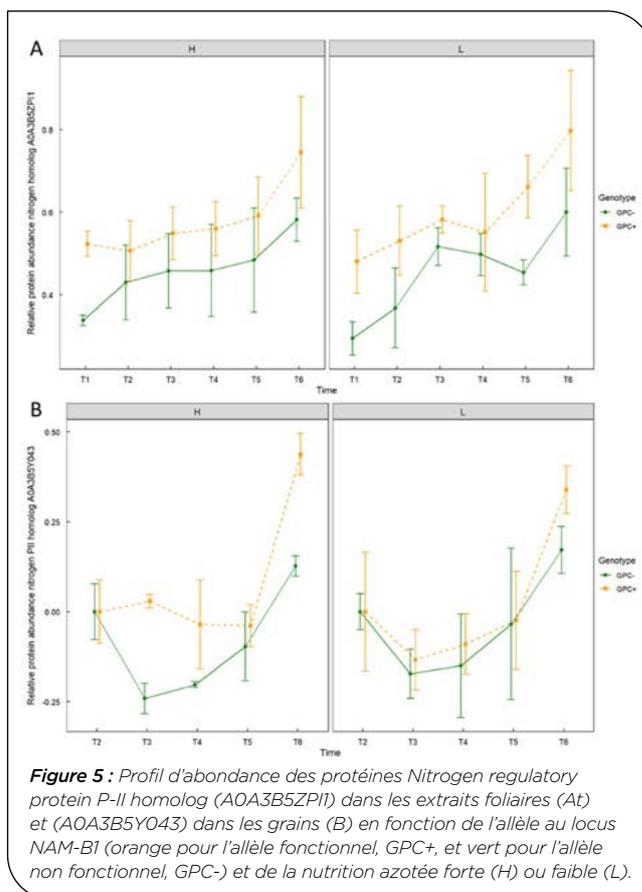


Figure 5 : Profil d'abondance des protéines *Nitrogen regulatory protein P-II* homolog (*AOA3B5ZPI1*) dans les extraits foliaires (A) et (*AOA3B5Y043*) dans les grains (B) en fonction de l'allèle au locus *NAM-B1* (orange pour l'allèle fonctionnel, GPC+, et vert pour l'allèle non fonctionnel, GPC-) et de la nutrition azotée forte (H) ou faible (L).

Les protéines dont les profils d'accumulation dans les feuilles et les grains sont modifiés par *NAM-B1* constituent de nouveaux marqueurs de la remobilisation.

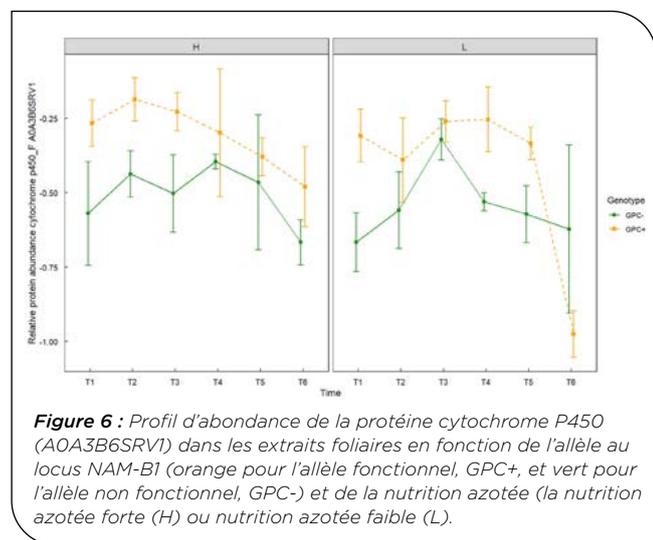
Les protéines dont l'accumulation varie en fonction de *NAM-B1* peuvent participer à la sénescence et à la remobilisation. Les polymorphismes de séquences localisés dans ou à proximité des gènes codant ces protéines ont été recherchés puis utilisés en génétique d'association avec le GPC moyen ou le GPD moyen, mesurés dans une collection de blé cultivée à faible ou fort intrant (6 environnements par condition), notés respectivement GPC_LN (GPD_LN) et GPC_HN (GPD_HN). Bien que les résultats soient encore en cours d'analyse, nous avons déjà identifié des associations significatives.

Le gène *Traes7B02G349100* du chromosome 7B présente plusieurs marqueurs en déséquilibre de liaison avec les deux caractères étudiés, quelle que soit la nutrition azotée. Ce gène code pour un cytochrome P450 (*AOA3B6RV1*) présent dans le cluster 2 des extraits foliaires (Figure 3). Le profil d'abondance de cette protéine montre un fort effet allèle pour les premiers stades de développement en particulier pour la nutrition fort azote (Figure 6).

Le gène *TraesCS4A02G099800* du chromosome 4A ressort également avec plusieurs marqueurs associés

significativement aux GPC_LN et GPC_HN. Il code pour une ATP synthase de la sous-unité b', chloroplastique (AOA3B6HQK1) présente dans le cluster 4 des protéines des extraits foliaires (Figure 3).

Les résultats de l'analyse d'association révèlent des gènes étroitement liés au GPD et au GPC, dans un contexte où aucune des lignées étudiées ne porte l'allèle fonctionnel de *NAM-B1*. Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle ces gènes interviendraient dans le processus de remobilisation, avec une ampleur qui serait modulée par les différents allèles de *NAM-B1*.



la remobilisation de l'azote (Uauy *et al.* 2006; Waters *et al.* 2009). Nous avons pu quantifier au champ dans deux fonds génétiques de type hiver l'impact de l'allèle fonctionnel sur la sénescence (accélération de 2-3 jours) en accord les observations déjà publiées dans des fonds génétiques de type printemps (Tabbita *et al.*, 2017). Nous avons aussi quantifié au champ, à notre connaissance pour la première fois, l'augmentation de l'efficacité de remobilisation de l'azote (+8%).

Les protéines identifiées dont l'abondance varie en fonction de l'allèle de *NAM-B1* conjointement avec la sénescence, la remobilisation et/ou le remplissage, peuvent être considérées comme des marqueurs moléculaires de ces processus. Certaines d'entre elles (aminotransférase, glutamine synthétase, thiorédoxine, glycosyltransférase, cytochrome P450, phytocyanine) ont déjà été associées à ces processus dans des méta-analyses publiées (Saini *et al.*, 2022, Gudi *et al.* 2022), tandis que d'autres sont potentiellement de nouvelles candidates nécessitant une validation et une caractérisation ultérieures, notamment une protéine homologue à la Nitrogen regulatory PII. Cette protéine pourrait être un acteur central de la détection et de la régulation du statut azoté et de l'équilibre C/N, ce qui a été confirmé par la découverte d'une liaison directe de la glutamine à ces protéines (Chellamuthu *et al.* 2014). Les PII seraient des senseurs de la glutamine et à ce titre un acteur important dans l'assimilation de l'azote.

Après la phase d'analyse génétique effectuée dans une collection où tous les génotypes portent l'allèle non fonctionnel de *NAM-B1* (Hagenblad *et al.*, 2012), certaines protéines se distinguent, notamment les protéines cytochrome P450. Ces associations suggèrent que ces protéines, liées à la sénescence et la remobilisation de l'azote, peuvent exercer leur fonction de manière indépendante vis-à-vis de ce facteur de transcription. Au niveau transcriptionnel, des facteurs de transcription ont été identifiés comme des régulateurs clés de la sénescence des feuilles chez les plantes (Kim *et al.*, 2016), en particulier chez le blé (Zhao *et al.*, 2020 ; Andleeb *et al.*, 2020). Ces facteurs agissent à travers des réseaux de régulation complexes intégrant de multiples voies de signalisation. Parmi eux, les gènes des familles NAC et WRKY ont été largement étudiés et il a été démontré qu'ils jouent un rôle essentiel dans la régulation de la sénescence des feuilles (Zhang *et al.*, 2020). L'analyse protéomique réalisée ici ne permet pas de quantifier des facteurs de transcription faiblement représentés dans les extraits protéiques. Toutefois les plusieurs protéines différenciellement accumulées selon la présence de l'allèle fonctionnel ou non du gène *NAM-B1* semblent être régulés par des facteurs de la famille WRKY impliqués dans les processus de sénescence chez *Arabidopsis* ou de contenu du grain chez le riz.

L'ensemble des résultats obtenus dans le projet Remoblé ouvrent de nouvelles perspectives en matière de développement de marqueurs pour la sélection de variétés à haute teneur en protéines dans les programmes d'amélioration génétique.

4 Discussion

NAM-B1 a été identifié comme un locus favorisant l'augmentation de la teneur en protéines du grain (GPC) chez le blé tétraploïde et hexaploïde (Brevis et Dubcovsky, 2010). Nos résultats ont révélé qu'après l'introduction du gène *NAM-B1* dans un fond génétique européen, le GPC a été significativement augmenté dans trois sites d'essais avec des traitements différents, sans affecter le rendement. Cette augmentation de la teneur en protéines variait de 11,9% à 13,3%. Ces observations sont en accord avec les résultats précédemment rapportés dans la littérature scientifique (Chee *et al.*, 2001 ; Blanco *et al.*, 2002 ; Kumar *et al.*, 2013 ; Tabbita *et al.*, 2017).

Nous avons observé dans les deux fonds génétiques européens que l'introgression de l'allèle fonctionnel du gène *NAM-B1* induit une accélération de la sénescence des feuilles, aussi bien en conditions de culture contrôlée qu'en plein champ. Cette accélération est associée à une amélioration de l'efficacité de remobilisation des feuilles vers les grains, principalement sur les épis principaux en conditions contrôlées. Cela confirme des résultats précédents ou l'introduction dans des fonds génétiques américains, indiens et australiens a montré une accélération de la sénescence et de la maturation du grain (Chee *et al.*, 2001 ; Blanco *et al.*, 2002 ; Kumar *et al.*, 2013), en cohérence avec les effets phénotypiques rapportés des gènes *NAM* sur

Références bibliographiques

- Andleeb T., Knight E., Borrill P.** (2023) Wheat NAM genes regulate the majority of early monocarpic senescence transcriptional changes including nitrogen remobilization genes. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, Volume 13, Issue 2, <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkac275>
- Bordes J., Ravel C., Jaubertie J.P., et al.** (2013) Genomic regions associated with the nitrogen limitation response revealed in a global wheat core collection. *Theor Appl Genet.* 126(3):805-22. doi: 10.1007/s00122-012-2019-z.
- Brevis, J.C. and Dubcovsky, J.** (2010) Effects of the Chromosome Region Including the Gpc-B1 Locus on Wheat Grain and Protein Yield. *Crop Sci.*, 50: 93-104. <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.02.0057>
- Cantu D., Pearce, S.P., Distelfeld A. et al.** (2011) Effect of the down-regulation of the high Grain Protein Content (GPC) genes on the wheat transcriptome during monocarpic senescence. *BMC Genomics* 12, 492. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-492>
- Chen, Xu et al.** (2014) The NAC family transcription factor OsNAP confers abiotic stress response through the ABA pathway." *Plant & cell physiology* vol. 55,3: 604-19. doi:10.1093/pcp/pct204
- Chellamuthu V-R, Ermilova E, Lapina T, et al.** (2014) A Widespread Glutamine-Sensing Mechanism in the Plant Kingdom. *Cell.* 159(5):1188-1199. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.015>
- Cormier, F. ; Throude, M. ; Ravel, C. ; Gouis, J.L. ; Leveugle, M. ; Lafarge, S. ; Exbrayat, F. ; Duranton, N. ; Praud, S.** (2015) Detection of NAM-A1 Natural Variants in Bread Wheat Reveals Differences in Haplotype Distribution between a Worldwide Core Collection and European Elite Germplasm. *Agronomy*, 5, 143-151. <https://doi.org/10.3390/agronomy5020143>
- DePauw, R. M., Knox, R. E., Clarke, F. R., Wang, H., Fernandez, M. R., Clarke, J. M., et al.** (2007). Shifting undesirable correlations. *Euphytica* 157, 409-415. doi: 10.1007/s10681-007-9379-5
- Distelfeld, A., Uauy, C., Fahima, T. and Dubcovsky, J.** (2006) Physical map of the wheat high-grain protein content gene Gpc-B1 and development of a high-throughput molecular marker. *New Phytologist*, 169: 753-763. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01627.x>
- Eagles H. A., McLean Robyn, Eastwood R. F., Appelbee M.-J., Cane Karen, Martin P. J., Wallwork H.** (2014) High-yielding lines of wheat carrying Gpc-B1 adapted to Mediterranean-type environments of the south and west of Australia. *Crop and Pasture Science* 65, 854-861. <https://doi.org/10.1071/CP14106>
- Endelman, J.B.** (2011). Ridge Regression and Other Kernels for Genomic Selection with R Package rrBLUP. *The Plant Genome* 4, 250-255. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2011.08.0024>.
- Ge, S. X., Jung D., Yao, R.** (2020) ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants, *Bioinformatics*, Volume 36, Issue 8, April 2020, Pages 2628-2629, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz931>
- Gudi, S., Saini, D.K., Singh, G. et al.** (2022) Unravelling consensus genomic regions associated with quality traits in wheat using meta-analysis of quantitative trait loci. *Planta* 255, 115. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03904-4>
- Guo, Y. and Gan, S.** (2006) AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal*, 46: 601-612. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2006.02723.x>
- Hagenblad J., Asplund L., Balfourier F., et al.** (2012) Strong presence of the high grain protein content allele of NAM-B1 in Fennoscandian wheat. *Theor Appl Genet.*125):1677-86. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1943-2>.
- Kim HJ, Nam HG, Lim PO.** (2016) Regulatory network of NAC transcription factors in leaf senescence. *Curr Opin Plant Biol.* 2016;33:48-56. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.002>
- Kumar J, V Jaiswal, A Kumar, N Kumar, RR Mir, S Kumar, R Dhariwal, S Tyagi, M Khandelwal, K V Prabhu, R Prasad, HS Balyan, PK Gupta.** (2011) Introgression of a major gene for high grain protein content in some Indian bread wheat cultivars. *F Crop Res.* 2011;123(3):226-233. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.05.013>
- Langella O, B Valot, T Balliau, M Blein-Nicolas, L Bonhomme, M Zivy.** (2017) X!TandemPipeline: A Tool to Manage Sequence Redundancy for Protein Inference and Phosphosite Identification. *J Proteome Res.* 2017;16(2):494-503. doi:10.1021/acs.jproteome.6b00632
- Liang, Chengzhen et al.** (2014) OsNAP connects abscisic acid and leaf senescence by fine-tuning abscisic acid biosynthesis and directly targeting senescence-associated genes in rice. *PNAS* vol. 111,27: 10013-8. doi:10.1073/pnas.1321568111
- Marmagne A, C Masclaux-Daubresse, F Chardon.** (2022) Modulation of plant nitrogen remobilization and postflowering nitrogen uptake under environmental stresses. *J Plant Physiol.* 153781. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153781>
- Monaghan, J.M., Snape, J.W., Chojecki, A.J.S. et al.** (2001) The use of grain protein deviation for identifying wheat cultivars with high grain protein concentration and yield. *Euphytica* 122, 309-317 (2001). <https://doi.org/10.1023/A:1012961703208>
- Oury, FX., Godin, C.** (2007) Yield and grain protein concentration in bread wheat: how to use the negative relationship between the two characters to identify favourable genotypes? *Euphytica* 157, 45-57. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9395-5>
- Plessis A., Ravel C., Duchateau N., et al.** (2013) Genetic Mapping of Wheat Grain Protein Composition Reveals that Gliadin and Glutenin Composition are Trans-Regulated by Different Chromosomal Regions. *Journal of Experimental Botany* 64 : 3627-3644. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert188>.
- Rimbert H., Darrier B., Navarro J., et al.** (2018) High throughput SNP discovery and genotyping in hexaploid wheat. *PLOS ONE* 13:e0186329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186329>.
- Rincent R., Moreau L., Monod H. et al.** (2014). Recovering Power in Association Mapping Panels with Variable Levels of Linkage Disequilibrium. *Genetics* 197, 375-387. doi:10.1534/genetics.113.159731.
- Saini P, I Sheikh, DK Saini, RR Mir, HS Dhaliwal, V Tyagi.** (2022) Consensus genomic regions associated with grain protein content in hexaploid and tetraploid wheat. *Front Genet.*;13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1021180>.

Tabbita, F., Lewis, S., Vouilloz, J.P., Ortega, M.A., Kade, M., Abbate, P.E. and Barneix, A.J. (2013), Effects of the Gpc-B1 locus on high grain protein content introgressed into Argentinean wheat germplasm. *Plant Breed*, 132: 48-52. <https://doi.org/10.1111/pbr.12011>

Tabbita F, Pearce S, Barneix AJ (2017) Breeding for increased grain protein and micronutrient content in wheat: Ten years of the GPC-B1 gene. *J Cer Sci* 73:183-191 [10.1016/j.jcs.2017.01.003](https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.01.003)

Uauy, Cristobal et al. (2006a) A NAC Gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science (New York, N.Y.)* vol. 314,5803: 1298-301. [doi:10.1126/science.1133649](https://doi.org/10.1126/science.1133649)

Uauy, C., Brevis, J.C., Dubcovsky, J. (2006b) The high grain protein content gene Gpc-B1 accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat, *Journal of Experimental Botany*, <https://doi.org/10.1093/jxb/erl047>

Valot, B., Langella, O., Nano, E. and Zivy, M. (2011), MassChroQ: A versatile tool for mass spectrometry quantification. *Proteomics*, 11: 3572-3577. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100120>

Waters, BM, Uauy,C., Dubcovsky,J. Grusak, M. A. (2009) Wheat (*Triticum aestivum*) NAM proteins regulate the translocation of iron, zinc, and nitrogen compounds from vegetative tissues to grain, *Journal of Experimental Botany*, Volume 60, Issue 15, Pages 4263-4274, <https://doi.org/10.1093/jxb/erp257>

Zhao, L., Zhang, W., Song, Q., Xuan, Y., Li, K., Cheng, L., Qiao, H., Wang, G. and Zhou, C. (2020), A WRKY transcription factor, TaWRKY40-D, promotes leaf senescence associated with jasmonic acid and abscisic acid pathways in wheat. *Plant Biol J*, 22: 1072-1085. <https://doi.org/10.1111/plb.13155>

RémoBlé : améliorer la remobilisation de l'azote pour augmenter la concentration en protéines du blé

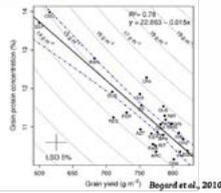
Fabien CHARDON¹, Emmanuelle BANCEL², Catherine RAVEL², Anne MARMAGNE¹, Manon LARDOS¹, Céline MASCLAUX-DAUBRESSE¹, Séverine ROUGEOL², Amélie BRESSON², Esther RODRIGUEZ DE HARO², Lilian FAURIE², David ALVAREZ², Sibille PERROCHON², Katia BEAUCHENE⁴, Aida ROUAHI⁵, Valérie HERTEMAN⁶, Pierre MARTRE⁵, Pierrick VARENNE⁶, Jean-Charles DESWARTE³, Jacques LE GOUIS²

1 - Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), Versailles
 2 - GDEC, INRAE, Université Clermont-Auvergne, Clermont-Ferrand
 3 - ARVALIS, ZA des gravières, Route de Chateaufort, Villiers-le-Bâcle

4 - ARVALIS, Beauce-la-Romaine
 5 - LEPSE, Université Montpellier, INRAE, Institut Agro Montpellier, Montpellier
 6 - LIMAGRAIN EUROPE, Saint-Beauzire

CONTEXTE

- ✓ Teneur en protéines corrélée négativement avec le rendement
- ✓ Problématiques environnementales et économiques: **réduction des intrants azotés**



- ✓ **NAM-B1**, un facteur de transcription de la famille des NAC impliqué dans l'amélioration de l'efficacité de l'utilisation de l'azote et de la teneur en protéines du grain codé par un gène sur le chromosome 6B

LE PROJET FSOV REMOBLÉ



OBJECTIF

Comprendre le fonctionnement du gène **NAM-B1** pour augmenter la concentration en protéines du grain de blé tendre

RESULTATS

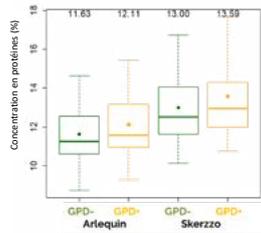
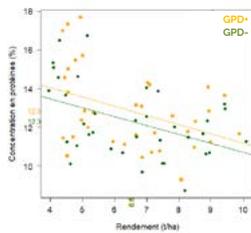
Utilisation de **lignées quasi-isogéniques** dans deux fonds génétiques contrastés, **Skerzoo** et **Arlequin**.

Expérimentations aux champs



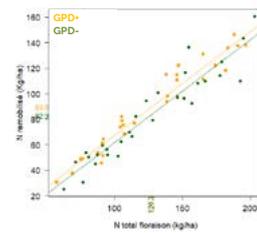
Les lignées quasi-isogéniques de Skerzoo et Arlequin sont cultivées pendant deux ans dans un **réseau d'essais** combinant différents niveaux de **fertilisation azotée** et **disponibilité en eau**

En moyenne, dans les deux fonds, l'allèle fonctionnel de **NAM-B1** **augmente la concentration en protéines du grain de +0.53 point**



Cette augmentation est **indépendante du rendement** en grains qui est très proche en moyenne entre les deux allèles

L'allèle fonctionnel de **NAM-B1** entraîne une **meilleure efficacité de remobilisation de l'azote** (66% vs 60%) quelle que soit la quantité d'azote absorbée à la floraison

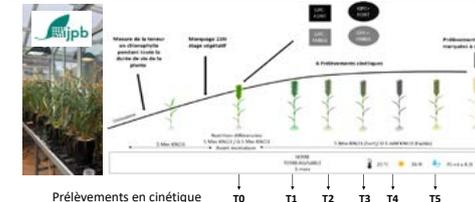


Variable	Effet Allèle	Effet Allèle x Environnement	Moyenne allèle fonctionnel	Moyenne allèle non fonctionnel
SD% ND/Max (°C depuis épiation)	<0,001	0,036	662	699

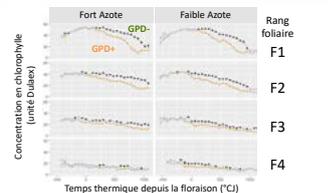
L'allèle fonctionnel de **NAM-B1** **accélère significativement** (d'environ 44 °C), soit 2-3 jours **la sénescence du couvert**.

GPD- = lignées avec l'allèle non fonctionnel de **NAM-B1** (formes parentales)
GPD+ = lignées avec l'allèle fonctionnel de **NAM-B1** (formes introgressées)

Expérimentations en conditions contrôlées



En serre, les lignées quasi-isogéniques, Skerzoo et Arlequin NAM-B1 sont cultivées avec une **forte** (5 mM KNO₃) ou **faible** (0,5 mM KNO₃) **disponibilité en azote** du sol après la montaison

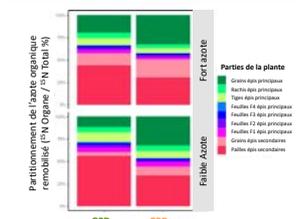


La **sénescence précoce** s'accompagne d'une meilleure remobilisation de l'azote des feuilles vers les grains

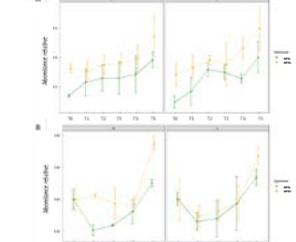
Facteur(s)	DAP Feuilles	DAP Grains
Âge de l'organe	1253	1947
Nutrition	54	158
Allèle	288	562
Âge de l'organe x nutrition	159	0
Âge de l'organe x Allèle	4	61
Nutrition x Allèle	0	74
Âge de l'organe x nutrition x Allèle	4	0

Les protéines dont les profils d'accumulation (DAP : protéines différenciellement accumulées) dans les feuilles et les grains sont modifiés par **NAM-B1** constituent de **nouveaux marqueurs potentiels de la remobilisation**.

NAM-B1 est responsable d'une **sénescence précoce des feuilles proches de l'épi**



NAM-B1 modifie les **profils d'accumulation de protéines** dans les feuilles et les grains



Profil d'abondance au cours du temps des protéines Nitrogen regulatory protein P-II homolog (A) dans les extraits foliaires (A043852P2) et (B) dans les grains (A04385Y043) en fonction de l'allèle au locus **NAM-B1** (GPD+ orange ; GPD- vert) pour des plantes cultivées avec une forte (H) et faible (L) disponibilité en azote après la montaison.

CONCLUSIONS

1. L'allèle fonctionnel de **NAM-B1** **augmente la concentration en protéines des grains** indépendamment du fond génétique et du rendement au champ.
2. Il provoque une **sénescence foliaire précoce** et une **meilleure remobilisation de l'azote des feuilles vers le grain** au champ et en conditions contrôlées.
3. L'allèle fonctionnel de **NAM-B1** modifie la cinétique d'abondance de plusieurs protéines dans les feuilles et les grains. Les gènes codant ces protéines peuvent servir de **marqueurs moléculaires pour suivre la sénescence et la remobilisation de l'azote** chez le blé tendre.

Références

Bogard M et al. (2010) Deviation from the grain protein concentration-grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat. Journal of experimental botany 61 : 4303-4312
 Olmos S, Distelfeld A, Chicaiza O, Schlatter AR, Fahima T, Echenique V, Dubcovsky J (2003) Precise mapping of a locus affecting grain protein content in durum wheat. Theoretical and Applied Genetics 107:1243-1251

Remerciements: Plateforme Pappso, Marlène Davanture et Mélisande Blein-Nicolas.



Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), Versailles
 78 026 Versailles Cedex
 Tél. : + 33 (0)1 30 83 30 76

Contact : fabien.chardon@inrae.fr



PROSIT : Qualification des protéines d'intérêt pour la qualité brassicole des orges

Julien BILLARD¹, Sophie SCHWEBEL¹, Marc SCHMITT¹, Séverine MAUDEMMAIN², Isabelle CHAILLET², Louis-Marin BOSSUET³, Amélie GENTY⁴, Jean-François HERBOMMEZ⁴, Jean-Philippe JELU⁵

1 - IFBM - Institut Français des Boissons de la Brasserie Malterie -
7 rue du Bois de la Champelle - 54500 Vandoeuvre-les-Nancy

2 - ARVALIS - Institut du Végétal - 3 rue Joseph et Marie Hackin - 75116 Paris

3 - GEVES - 25 rue Georges Morel, CS 90024 - 49071 Beaucouze Cedex

4 - UFS - Union Française des Semenciers - 17 rue du Louvre - 75001 Paris

5 - Malteurs de France - 66 rue de la Boétie - 75008 Paris

1 Introduction

► Contexte

La France est le premier exportateur mondial de malt (80% de la production nationale est exportée) et le second exportateur d'orges brassicoles. Cette position de leader international s'appuie en particulier sur la qualité et la régularité de la production agricole française. Cependant, dans un contexte général de réduction des intrants (dont la fertilisation azotée) et d'aléas climatiques, il est important de savoir comment la filière va pouvoir agir vis-à-vis des contraintes réglementaires et climatiques. Au-delà de la teneur quantitative en protéines des orges de brasserie, se pose la question de leur nature (ou « qualité ») et de leur impact sur le processus de maltage.

Les **attentes qualitatives** de la malterie et de la brasserie pour les orges brassicoles sont nombreuses (Schmitt, 2013'). L'orge de brasserie doit répondre à un certain nombre de critères : elle doit être riche en amidon, avoir une bonne énergie germinative (le malt est obtenu par germination en conditions maîtrisées et contrôlées de l'orge), un bon calibrage, et une teneur en protéines totales comprise entre 9,5 et 11,5% du poids sec. Cette situation s'explique schématiquement par un besoin en protéines pour avoir une bonne tenue de mousse et assurer la nutrition azotée de la levure au cours de la fermentation. A l'opposé, un excès de protéines rend le maltage plus difficile et risque de donner du trouble à la bière. Les cahiers des charges des brasseurs sont donc relativement stricts sur ce paramètre.

A ce jour, il y a peu de bibliographie sur la relation entre les classes de protéines et la qualité du malt obtenue contrairement au blé qui a été bien référencé. Dans la filière malterie brasserie, les protéines dans l'orge

sont caractérisées en routine uniquement par leur teneur totale dans le grain. Mais cette donnée ne nous permet pas de différencier les différentes classes de protéines qui la constituent et n'explique pas toujours les différences de qualité de la matière première. L'exemple, présenté en Figure 1, met en lumière la variabilité des paramètres du malt pour une teneur en protéines totales de 10% (en rouge sur le graphique).

L'objectif du projet est d'identifier les fractions protéiques de l'orge qui sont en relation avec sa qualité brassicole, de voir quel est le poids de la variété dans la construction du réseau protéique et également de savoir s'il est possible de les piloter au travers de la fertilisation azotée ou de l'itinéraire de culture.

Ce projet d'intérêt pour la filière réunit tous les acteurs, de la sélection à la transformation (primaire et secondaire) en passant par l'agronomie.

► Structure du projet

Tâche 1 : Mise au point de l'analyse qualitative des protéines d'intérêt brassicole

Cette première tâche est consacrée au développement et à la mise au point de la méthode d'analyse des protéines dans l'orge. La méthode sera « fixée » lorsqu'elle permettra de lier un ou plusieurs paramètres d'analyse « orge » avec la qualité brassicole (paramètres malt). Elle pourra être éventuellement simplifiée selon les résultats obtenus en Tâche 2.

Tâche 2 : Recherche des fractions protéiques d'intérêt

Un premier échantillonnage, produits hors du cadre de PROSIT, présentant une grande variabilité (récolte, itinéraire de culture, qualité brassicole...) a permis de développer la méthode d'extraction et d'analyse des protéines de l'orge pour constituer le début de notre base de données (BDD). Il a ensuite servi à éprouver les modèles de prédiction de la qualité des malts issus des échantillons de la tâche 3.

Tâche 3 : Étude des paramètres agronomiques qui impactent la nature et la qualité des protéines de l'orge

Dans ces « essais champ », plusieurs partenaires ont semés des orges de printemps et orges d'hiver sur 2 années en faisant varier l'itinéraire de culture (e.g. fertilisation azotée, apport en soufre...). Une partie de ces échantillons a été sélectionnée par le COPIL pour transformation en micro-malterie pour enrichir la BDD et établir des pistes de liens entre itinéraire agronomique et profil qualitatif des protéines de l'orge.

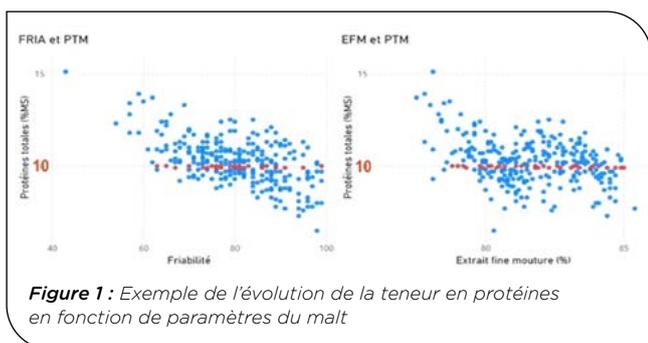


Figure 1 : Exemple de l'évolution de la teneur en protéines en fonction de paramètres du malt

Tâche 4 : Validation des hypothèses précédentes en brasserie

La dernière étape du projet aurait permis de valider, pour l'ensemble du procédé malterie-brasserie, la nature des protéines de l'orge identifiées comme étant d'intérêt dans les tâches précédentes. Cependant, cela n'a pas pu être fait dans le cadre du projet.

2 Matériel et méthode

► Production des orges (tâche 2 et 3)

Pour la tâche 2, un appel à échantillons a été lancé pour récupérer des échantillons d'orges de différentes provenances (types d'essai, lieu de culture, variété). Nous avons récupéré les données de 22 essais agronomiques (essais variétaux et essais de fertilisation azotée). Notre choix s'est porté sur 3 essais de fertilisation azotés pour un total de 3 variétés d'orge : KWS IRINA (n=15) et RGT PLANET (n=17) (orges de printemps.), ISOCEL (n=13) (orge d'hiver), soit 45 échantillons d'orge. Un ensemble supplémentaire de 56 orges issus du CTPS ont été utilisés au début du projet pour le développement de la méthode d'extraction et d'analyse des protéines de l'orge (résultats non présentés dans cet article).

Dans le cadre de la tâche 3 ; les 9 sélectionneurs et partenaires du projet ont participé aux essais champ (SYNGENTA, SECOBRA, KWS MOMONT, RAGT 2n, LIMAGRAIN, UNISIGMA, FLORIMOND-DESPREZ, ARVALIS et le GEVES).

Dans ces « essais champs » (Figure 2), des orges de printemps (OP) et des orges d'hiver (OH) ont été semées sur 2 années (année 2019 & 2020 ou 2020 & 2021) en faisant varier l'itinéraire de culture. Pour ces essais, il a été décidé de travailler sur la date d'apport plutôt que sur des doses extrêmes d'azote (carences ou surdose). Cependant, des modalités avec plus et moins d'azote (T4 : X+30 et T5 : X-30%) ont quand même été étudiés.

MODALITÉS		T1	T2	T3	T4	T5
ORGE D'HIVER	Dose d'azote (kg N/ha)	X	X	X	X + 30 %	X - 30 %
	Tallage (Z21)	1/3	2/3	0	1/3	1/3
	Epi 1 cm (Z30)	2/3	1/3	2/3	1/3	2/3
	Dernière feuille			1/3	1/3	
MODALITÉS		T1	T2	T3	T4	T5
ORGE DE PRINTEMPS	Dose d'azote (kg N/ha)	X	X	X	X + 30	X - 30
	Au semis	X		X/2	X/2	(X-30) / 2
	Début du tallage		X	X/2	X/2	(X-30) / 2
	Epi 1 cm				+ 30 U N	

Figure 2 : Itinéraire de culture pour les orges d'hiver et les orges de printemps

Sur les 10 variétés (5 OH et 5 OP) semées sur 10 lieux par an, nous avons sélectionné 4 variétés, sur 3 lieux par année et 2 années de récolte (2019 et 2020 pour les OH et 2020 et 2021 pour les OP). Cette sélection s'est faite lors du comité de pilotage annuel du projet. Seuls les lieux les plus répétables avec un rendement satisfaisant, une bonne teneur en protéines et sans souci technique ou sanitaire, ont été envoyés et transformés à l'IFBM.

► Extraction des protéines

La méthodologie choisie pour l'extraction des protéines est celle de *Schalk et al. 2017*² qui se base sur les travaux d'isolement des protéines selon *Osborne*³. Elle consiste à extraire de façon séquentielle les différentes protéines en fonction de leur affinité avec le tampon d'extraction.

La mouture d'orge (<0,2mm) est d'abord extraite avec le premier tampon sous agitation pendant 30 min à température ambiante. Le premier tampon constitué d'eau distillée permet d'extraire les protéines hydrosolubles comme les **albumines**. Une étape de centrifugation permet ensuite de sédimenter les protéines insolubles qui forment un culot. La fraction liquide (contenant les protéines solubles, majoritairement des **albumines**) est récupérée et le deuxième tampon d'extraction, salin (NaCl + KH₂PO₄ + Na₂HPO₄), est ajouté suivi par une étape d'extraction et de centrifugation pour isoler les **globulines**. Les étapes sont ensuite répétées avec le tampon alcoolique pour les **hordéines** (Propanol + eau) et enfin le tampon dénaturant pour les **glutélines** (borate + DTT). Chaque fraction ainsi isolée peut être ensuite analysés.

► Analyse des protéines

Après un état des lieux, nous avons identifié un certain nombre de technique utilisés pour la séparation et la quantification des protéines. On peut noter les quantifications par KJELDAHL et DUMAS (*Linko et al. 1989*⁴) pour nous renseigner sur la concentration de chaque fraction protéique après extraction. Des méthodes par chromatographies liquide (ou par électrophorèses SDS-PAGE sur gels (*Molina et al. 2001*⁵, *Marchylo et al. 1986*⁶) permettent de séparer les protéines dans chaque fraction pour quantifier les protéines isolées. Ces techniques ont été mise en œuvre la première année du projet mais n'ont pas été retenues (problème de compatibilité de solvant, temps d'analyse trop long, pas assez discriminant entre les échantillons, etc...)

Le choix de la méthode analytique s'est finalement porté sur l'électrophorèse capillaire, méthode permettant d'analyser un grand nombre d'échantillons, avec un investissement matériel accessible. Cette technique permet d'analyser spécifiquement les protéines en les séparant par leur taille ou masse moléculaire (en kDa) et de les quantifier (*Balazs et al. 2012*⁷).

Les premiers essais réalisés avec le constructeur Perkin Elmer (et les échantillons issus de la tâche 2) ont montré l'intérêt de l'équipement : temps d'analyse très réduit, les 4 fractions protéiques analysables directement, différences observées entre les fractions. Cela a motivé l'intérêt d'analyser la suite des échantillons du projet. De plus cette technique permet de disposer d'informations à de nombreuses échelles : de la quantification globale de chaque fraction jusqu'à une analyse pic par pic.

► Maltage des orges

Après récolte, les orges ont été réceptionnées par l'IFBM. Les maltages ont été réalisés dans le service micro-malterie d'IFBM selon le diagramme de maltage de l'année en cours défini dans le cadre du CTPS (Comité Technique Permanent de la Sélection).

Les paramètres technologiques des malts obtenus ont ensuite été caractérisés par IFBM.

► Analyse technologique des malts

Les paramètres technologiques étudiés dans le cadre du projet permettent d'évaluer la qualité malticole et brassicole des échantillons. La liste des analyses est la suivante :

(1) Les paramètres de qualité (IQ pour indice qualité), regroupant :

- l'humidité (HUM) : une humidité entre 4 et 5% est importante pour assurer la conservation du grain
- l'extrait fine mouture (EFM) : il définit le potentiel du malt à produire des substances solubles dans le moût (sucres, protéines solubles...)
- le pouvoir diastasique (PD) : c'est un indicateur du potentiel enzymatique du malt nécessaire à la production des sucres fermentescibles lors du brassage.
- la teneur en protéines totales du malt (PT), les protéines solubles du malt (PS), l'indice Kolbach (IK) : Les protéines sont des molécules clés dans le processus de brassage et participent à de nombreux phénomènes : nutrition azotée de la levure lors de la fermentation, activités enzymatiques, trouble, tenue de mousse, couleur...
- la viscosité (VIS), la friabilité (FRIA) et les bêta-glucanes solubles (BGL) : ces trois paramètres sont liés à la dégradation du grain lors du maltage. Une viscosité faible, une friabilité élevée et des bêta-glucanes solubles faibles limiteront les problèmes de filtration au brassage.

Ces paramètres sont utilisés pour l'indice qualité (IQ) dans le cadre du processus d'inscription des variétés par le CTPS.

(2) Les activités enzymatiques : alpha-amylase (AAM), beta-amylase (BAM). Elles sont les composantes du pouvoir diastasique mesuré précédemment et assurent l'hydrolyse de l'amidon en glucides assimilables par la levure lors de la fermentation. Les activités enzymatiques sont d'intérêt pour le procédé de brassage.

(3) Les données récupérées au cours du procédé de maltage : humidité fin de trempe (HFT), humidité fin de germination (HFG) pour les échantillons transformés en malt. Ces données d'humidité en cours de procédé sont un bon indicateur de la prise d'eau du grain, signe de bonne hydratation et transformation de l'orge.

► Mise en forme de la base de données

La base de données (BDD) constituée regroupe les informations obtenues dans le cadre du projet pour 220 échantillons d'orge sur 3 années de récoltes (de 2019 à 2021). Les orges sont séparées en 2 espèces (100 orges de printemps et 120 orges d'hiver). Les essais de fertilisation ont été réalisés sur 8 lieux d'essais, 2 espèces d'orge et 8 variétés avec 5 modalités de fertilisation. En plus des informations agronomiques, les 12 paramètres technologiques du malt analysés ont été intégrés. Concernant les fractions protéiques, un ensemble de 53 pics par échantillons d'orge a été intégré après "nettoyage" des spectres obtenus : 18 pour les albumines, 10 pour les globulines, 15 pour les hordéines et 10 pour les glutélines.

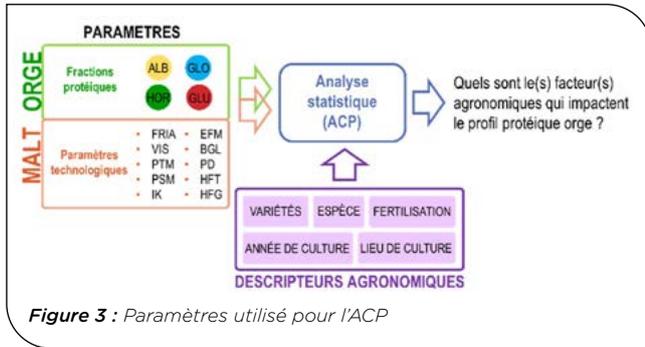
► Analyses qualitative et quantitative par chimio-métrie

Le traitement statistique de la base de données a été réalisé par Arvalis. Le nombre de données ne cesse de croître pour le contrôle de procédé. En effet, le nombre de variables est de plus en plus important. Les informations utiles sont bien souvent difficiles à extraire. Les échantillons tendent aussi à être chimiquement très complexes. Ainsi, il est souvent nécessaire d'utiliser des approches de modélisation multivariée. La chimio-métrie est une solution parfaite pour de nombreux problèmes physico-chimiques. Massart définit la chimio-métrie comme une discipline de la chimie qui utilise les mathématiques et les statistiques pour sélectionner les procédures expérimentales optimales et extraire des informations pertinentes (Massart et al. 1988[®]). Elle permet notamment d'améliorer la spécificité et la sensibilité de la méthode analytique. Dans le cadre du projet PROSIT, deux méthodes chimio-métriques ont été employées. L'Analyse en Composantes Principales (ACP) a permis de visualiser les lots de données dans une base vectorielle avec une dimension inférieure à la base des pics du Labchip, de détecter les variables et/ou les échantillons aberrants et d'identifier les facteurs introduisant la variabilité. Après cette phase exploratoire, la régression par la méthode des moindres carrés partiels (PLS) était la méthode de régression linéaire la plus simple et la plus adaptée à la problématique. Celle-ci consiste à construire une équation d'étalonnage à partir des données et des mesures de référence d'une propriété d'intérêt.

Analyse en composante principale (ACP)

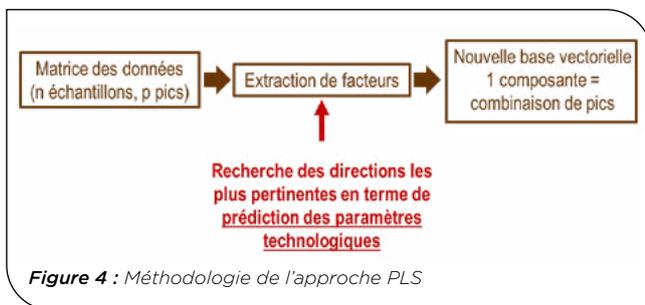
La visualisation des données du LabChip, c'est-à-dire les pics aux différents poids moléculaires, devient difficile lorsque le nombre de variables (les pics) est important. Il est donc nécessaire de réduire le nombre de données en quelques composantes pertinentes. L'ACP est une méthode de condensation des données : elle consiste en une projection dans un espace de représentation de faibles dimensions. En fait, l'ACP sélectionne les projections maximisant la variance entre les points projetés. Chaque axe de projection est appelé « composante principale ». Celle-ci est une combinaison linéaire des pics initiaux et contient ainsi toute l'information utile des données. Le premier axe est choisi dans la direction de la variance maximale de la matrice variance-covariance. De cette façon, la quantité d'information dans la première nouvelle variable est le plus grand possible. Le second axe est choisi orthogonal au premier pour que la seconde composante ne soit pas corrélée à la première.

A partir de là, la réduction du nombre de variables est expliquée par le fait que la variabilité des données du LabChip est causée par les facteurs variant au sein de l'échantillon. Il est à noter que l'information d'un constituant particulier de l'échantillon n'est pas nécessairement contenue dans une seule composante, et l'information utile n'est pas confinée dans la première ou les deux premières composantes même si celles-ci représentent presque toute la variabilité. L'objectif de cette analyse est de voir si les descripteurs agronomiques (Figure 3) peuvent expliquer la représentation des données et s'ils ont un effet sur la qualité des protéines de nos échantillons.

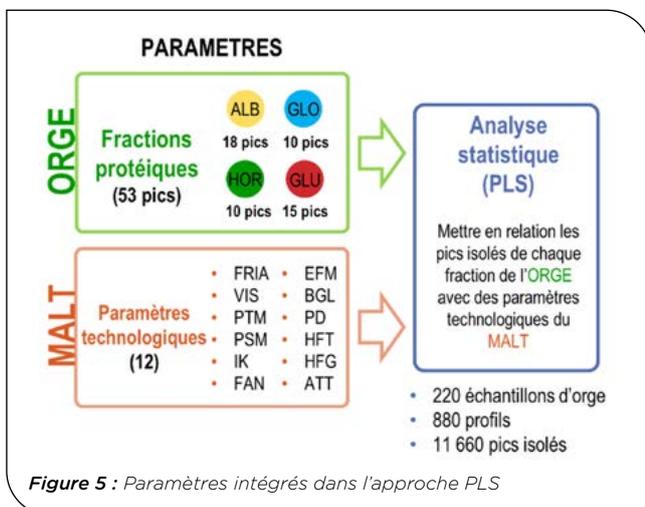


Régression par la méthode des moindres carrés partiels (PLS)

Comme pour l'ACP, la PLS est basée sur la construction de facteurs à partir des données LabChip initiales. Le but de cette méthode est de réduire la quantité de données et d'éviter ainsi les problèmes de surentraînement sans éliminer les informations utiles. Les composantes ou variables de la nouvelle base vectorielle sont des combinaisons linéaires des variables dans l'ancienne base (Figure 4).



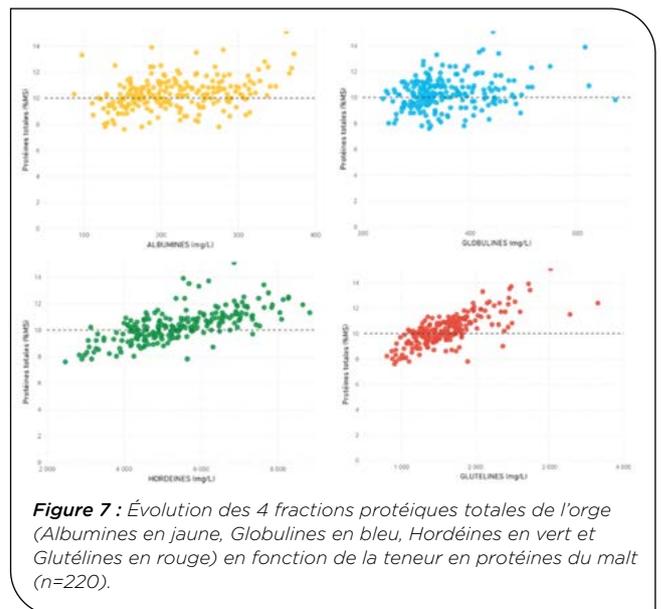
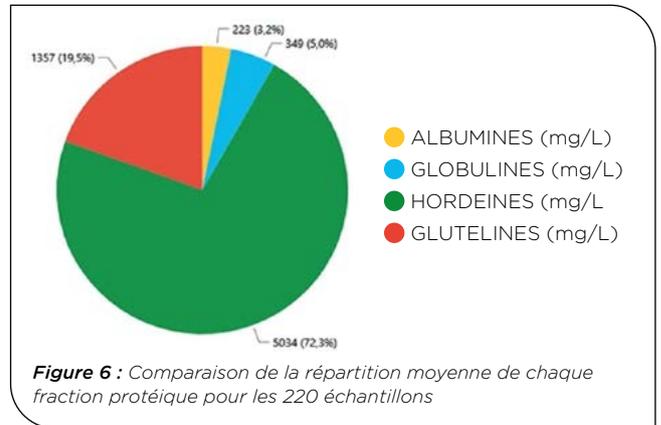
Mais la différence avec l'ACP est que la PLS construit ses facteurs en tenant compte de la corrélation entre les pics aux différents poids moléculaires et les concentrations. La condensation des données se fait donc suivant les directions les plus pertinentes en termes de prédiction des concentrations. La régression sur la matrice des vecteurs propres est utilisée pour construire l'équation de prédiction. La PLS est un processus itératif avec lequel les facteurs sont construits et ajoutés à la régression un à la fois jusqu'à ce que la procédure soit stoppée. Elle permet aussi d'identifier les pics protéiques les plus contributeurs aux modèles de prédiction à partir des paramètres orge et malt intégrés (Figure 5).



3 Résultats

► Analyse globale des fractions protéiques

La répartition moyenne des 4 fractions protéiques pour les échantillons de la base de données est présentée Figure 6. Les hordéines représentent la grande majorité des protéines extraites du grain d'orge (72%) suivies par les glutélines (21%) et enfin les globulines et albumines avec respectivement 5 et 3% en moyenne (Figure 5).



La Figure 7 montre l'évolution de la quantification de chaque fraction protéique en fonction de la teneur en protéines totales de l'orge. Nous observons que pour une même teneur en protéines (ligne grise pointillés), les concentrations des fractions protéiques évoluent jusqu'à un facteur 4 (entre la plus petite et la plus grande valeur d'une fraction) pour des qualités de malts très différentes. Les fractions protéiques isolées semblent évoluer différemment avec l'augmentation de la teneur en protéines totales. Les hordéines (HOR) et les glutélines (GLU) présentent une relation proportionnelle contrairement aux albumines (ALB) et aux globulines (GLO).

Ces observations justifient la mise en place du projet qui suppose que la teneur en protéines totales de l'orge ne permet pas de définir, à elle seule, sa qualité brassicole, car la « qualité » des protéines présentes compte aussi.

Après cette visualisation générale, une analyse plus poussée en composantes principales a été réalisée par Arvalis pour étudier quel facteur est le plus impactant dans la répartition de ces échantillons.

► Impact des facteurs agronomique sur la qualité des protéines de l'orge

Pour rappel, un dispositif agronomique sur 3 ans a été mis en place pour essayer d'identifier des leviers permettant de faire varier la qualité des protéines de l'orge (facteur expliquant la diversité de qualité protéique). Une analyse par ACP de l'effet des différents facteurs (effet de l'année et du lieu de culture, de l'espèce, de la variété et des modalités de culture) sur la qualité des protéines a été réalisée.

Analyse en composante principale

L'analyse en composante principale (ACP) a permis dans un premier temps de visualiser la position des échantillons (la différence entre deux échantillons est définie par la distance qui les sépare) et de les regrouper. On visualise 3 groupes (ou clusters) distincts (Figure 6), avec une représentation de plus de 92% de la variabilité existante avec deux dimensions et plus de 98% si on ajoute la composante principale 3 (PC3). Cela veut dire que l'on a au moins 92% de l'information qui est contenue dans 2 dimensions (voir 98 si on intègre PC3) ce qui est robuste.

A présent, l'objectif est de comprendre les causes de ces regroupements et le lien entre fractions protéiques de l'orge et facteurs agronomiques.

Effet de l'année de culture

Pour confirmer cela, le facteur « **année de culture** » (2019-2020-2021) a été représenté sur l'ACP en Figure 9.

Les échantillons d'une même année se retrouvent indépendamment dans l'un ou l'autre groupe. Cela veut dire que l'année de culture n'explique pas le regroupement des données.

Effet du lieu de culture

De la même manière que l'année de récolte, l'ACP (Figure 10) montre que ce n'est pas le lieu de culture qui permet de définir les clusters.

Nous allons à présent nous intéresser au paramètre « **espèce** » dans la suite de l'analyse et voir son impact sur la définition des clusters.

Effet de l'espèce

Dans le cadre de cette étude, il est important prendre en compte l'impact de l'espèce. En effet, les orges d'hiver (OH) et les orges de printemps (OP) ont une physiologie différente. Le cycle de culture est adapté et les qualités finales sont aussi différentes avec une activité enzymatique plus importante pour les orges d'hiver par exemple.

Pour confirmer cette hypothèse le facteur « **espèce** » a été mis en lumière sur l'ACP en Figure 10.

De manière surprenante, les 2 espèces d'orge sont mélangées sauf pour le groupe d'échantillons en haut à droite. Ces résultats expliquent la répartition des échantillons sur les Figure 9 et Figure 10, avec un cluster qui ne regroupe que des OP (et donc que les

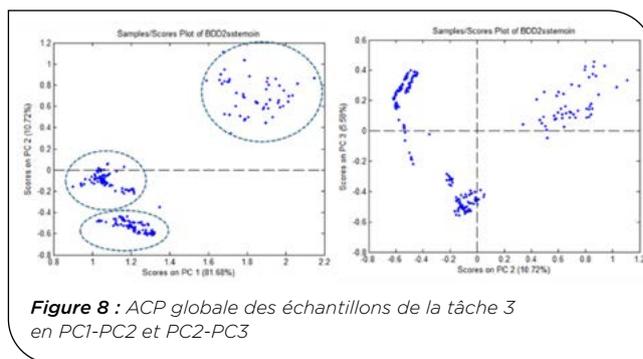


Figure 8 : ACP globale des échantillons de la tâche 3 en PC1-PC2 et PC2-PC3

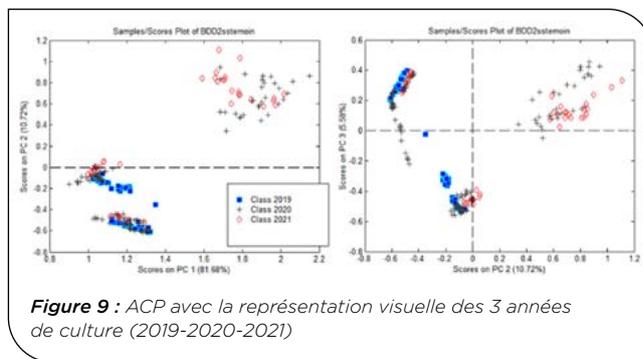


Figure 9 : ACP avec la représentation visuelle des 3 années de culture (2019-2020-2021)

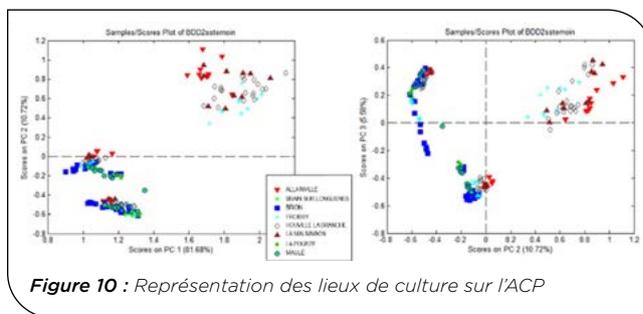


Figure 10 : Représentation des lieux de culture sur l'ACP

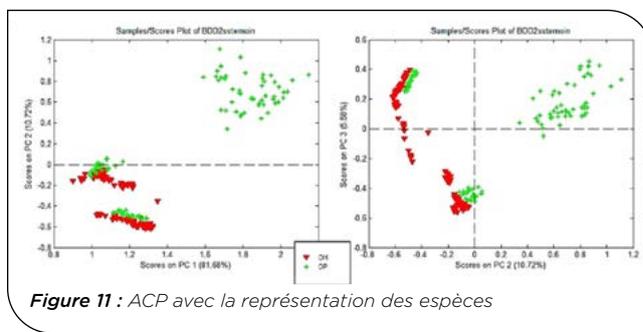


Figure 11 : ACP avec la représentation des espèces

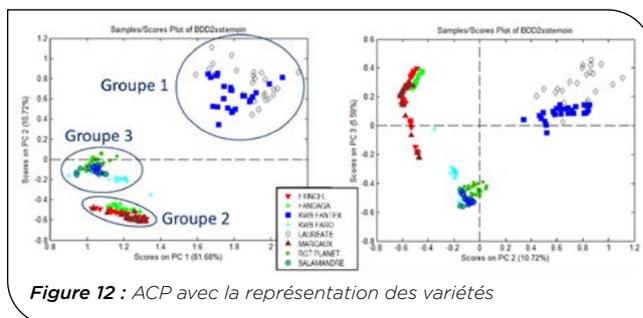


Figure 12 : ACP avec la représentation des variétés

modalités de lieu et d'année de culture correspondant aux OP). Malgré les différences de ratio moyens entre les pics observés (non présenté dans cet article) le facteur « **espèce** » ne semble pas être le facteur le plus explicatif des différences entre échantillons.

Effet de la variété

L'analyse par ACP (Figure 12) confirme l'effet variétal observé précédemment et il est significatif car tous les échantillons d'une même variété se retrouvent dans un même cluster :

- **Groupe 1 :** KWS FANTEX et LAUREATE
- **Groupe 2 :** FANDAGA, ETINCEL, MARGAUX
- **Groupe 3 :** RGT PLANET, SALAMANDRE, KWS FARO

Pour entrer un peu plus dans les détails, la Figure 13 montre les pics significatifs dans le regroupement des échantillons. Au vu de ces résultats, on confirme que les hordéines mais aussi quelques glutélines sont de forts contributeurs (hauteurs les plus élevées sur la partie droite de la Figure 5). Certains pics d'hordéines sont même présents dans un groupe et absents dans un autre (exemple : HOR 105.8). Les autres paramètres (albumine, globuline, paramètres du malt) ont un impact moindre sur le profil de clustering.

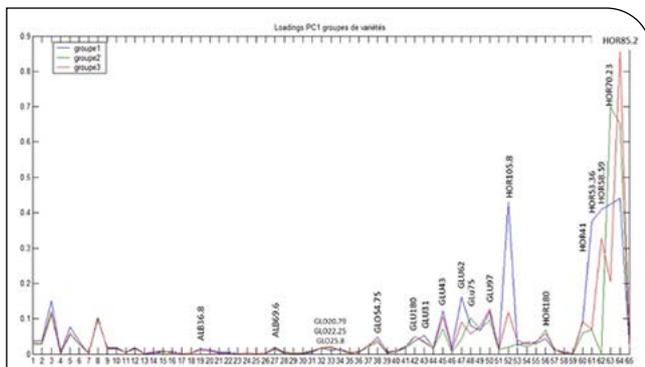


Figure 13 : Représentation de la contribution des paramètres étudiés en abscisse (paramètres malt 1-13 et pics de protéines 14-65) à la formation des clusters de variétés. Chaque courbe représente un groupe de cluster identifié grâce à l'ACP (**cluster 1, cluster 2, cluster 3**)

L'analyse précédente s'est focalisée sur l'impact de l'espèce sur la composition protéique de l'orge. Mais il paraît pertinent de descendre à l'échelle de la variété. Les 4 parties suivantes vont s'intéresser à la population de pics entre les variétés des espèces OH et OP (les couleurs peuvent être communes entre les fractions protéiques ALB, GLO, HOR ou GLU mais ils ne s'agit pas des mêmes pics).

Diversité des albumines

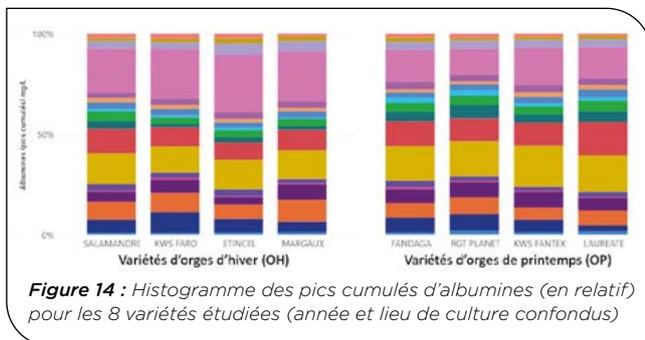


Figure 14 : Histogramme des pics cumulés d'albumines (en relatif) pour les 8 variétés étudiées (année et lieu de culture confondus)

En comparant la répartition des pics entre les espèces OH et les espèces OP (Figure 14), les pics **rose** sont plus importants sur les espèces OH là où les pics **vert foncé, jaune** et **rouge** sont plus importants chez les espèces OP. **Cette classe de protéines semble donc spécifique de l'espèce (OP ou OH) plutôt que de la variété.**

Diversité des globulines

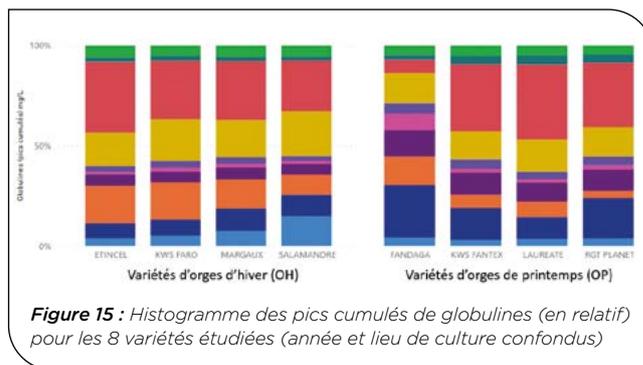


Figure 15 : Histogramme des pics cumulés de globulines (en relatif) pour les 8 variétés étudiées (année et lieu de culture confondus)

Il y a des différences de profil visibles entre les espèces OH et les espèces OP sur l'ensemble des pics, notamment sur quatre pics (**bleu foncé, bleu clair, orange** et **violet**) (Figure 15). En regardant les variétés en détail, on se rend compte que FANDAGA (variété OP) présente un profil atypique avec les pics **bleu foncé** et **rose** qui portent une forte contribution protéique. Cette variété est connue pour être plus protéolytique que les autres et ce caractère pourrait être expliqué car la majorité des enzymes sont des globulines.

A l'exception de la variété FANDAGA, il semble donc qu'il existe un profil « globuline » par espèce d'orge, mais qui varie peu entre les variétés d'une même espèce.

Diversité des hordéines

C'est sur le profil des hordéines que la différence entre les variétés est la plus visible (Figure 16).

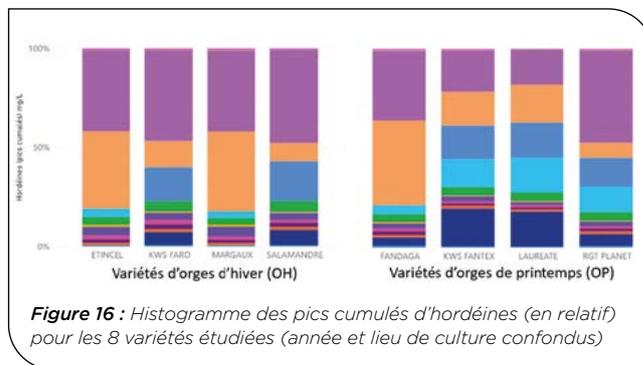


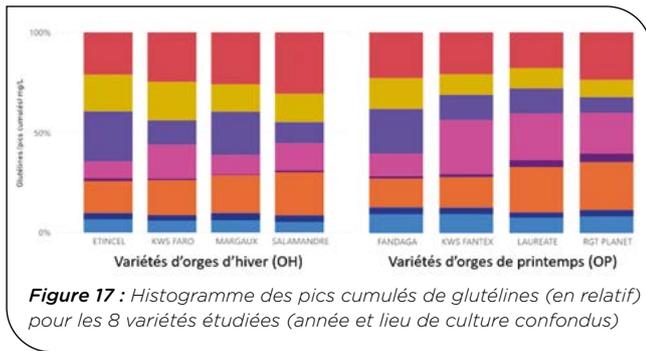
Figure 16 : Histogramme des pics cumulés d'hordéines (en relatif) pour les 8 variétés étudiées (année et lieu de culture confondus)

Entre les différentes variétés des espèces OP et OH, les pics **violet, orange, bleu, bleu clair, et bleu foncé** sont significativement différents. En comparant leur profil, les variétés peuvent être regroupés en 3 groupes :

- **Groupe 1 :** KWS FANTEX (OP) et LAUREATE (OP)
- **Groupe 2 :** FANDAGA (OP), ETINCEL (OH), MARGAUX (OH)
- **Groupe 3 :** RGT PLANET (OP), SALAMANDRE (OH), KWS FARO (OH)

On voit ici que des variétés de l'espèce OP (FANDAGA et RGT PLANET) ont des profils proches d'autres variétés de l'espèce OH. L'impact de la variété est donc plus fort que celui de l'espèce sur le profil protéique. D'ailleurs, historiquement, le profil en hordéines est utilisé pour l'identification variétale des orges brassicoles.

Diversité des glutélines



D'après les résultats en Figure 13, il semble que les glutélines pourraient définir les mêmes groupes que les hordéines avec les pics **jaune**, **rose** et **rouge** qui varient le plus entre les variétés.

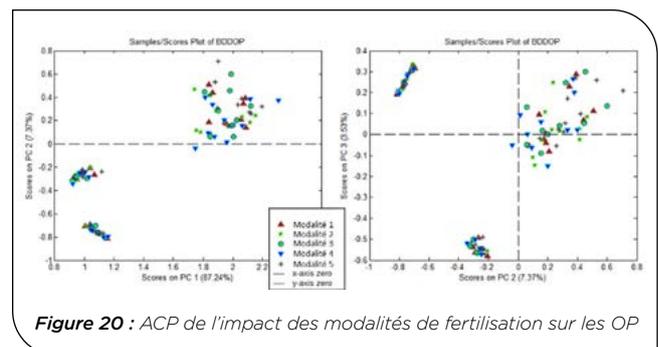
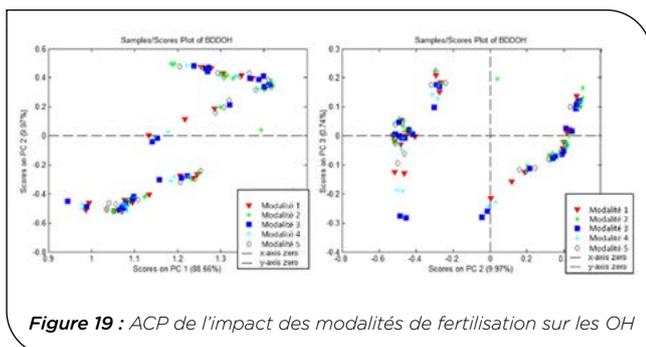
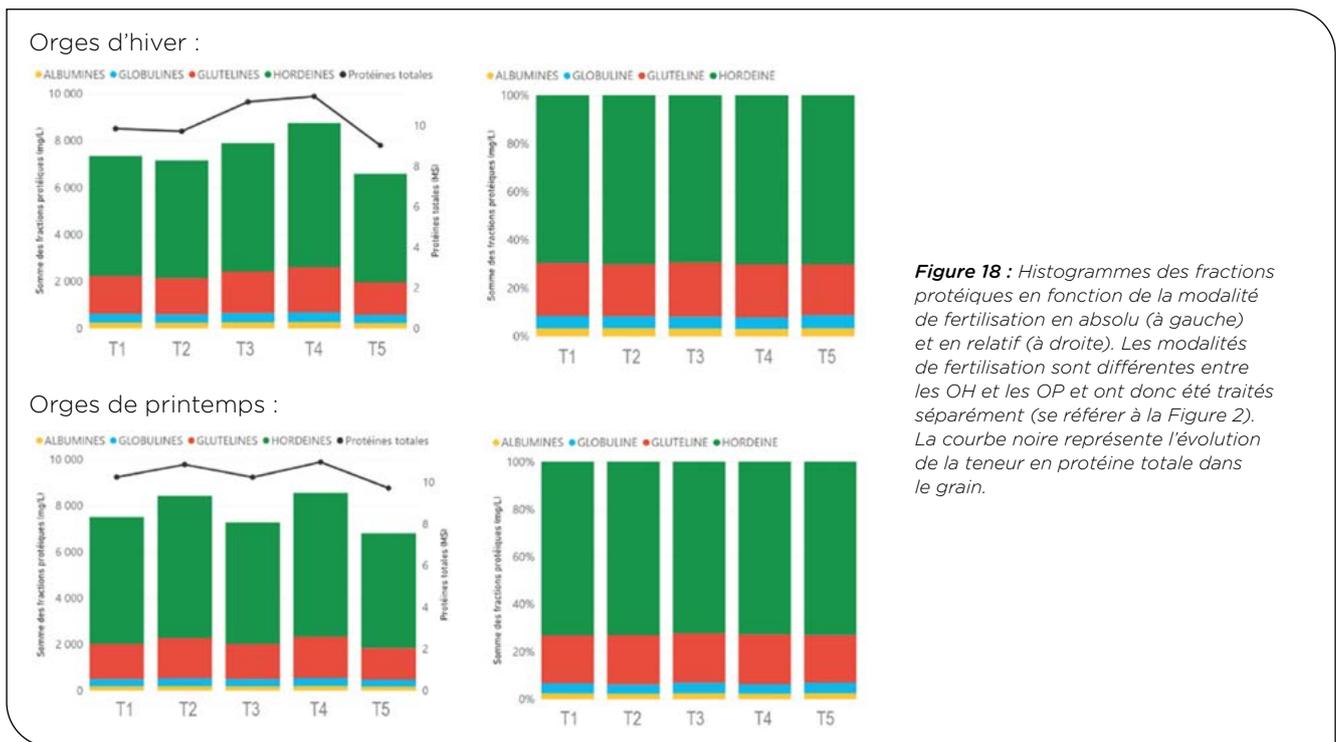
Effet de la fertilisation

L'un des objectifs dans le cadre du projet PROSIT est de savoir si la qualité des fractions protéiques de l'orge peut être pilotée via la fertilisation azotée au champ. En d'autres mots, est-ce qu'une diminution des intrants azotés au champ peut être compatible avec une

préservation de la qualité des protéines à des fins de maltage et brassage. Un itinéraire robuste a été mis en place pour déterminer l'impact de la fertilisation sur les fractions protéiques (T1 à T5, correspondent aux doses présentées dans la Figure 2).

L'effet des modalités de fertilisation est identique pour les OP et les OH avec une augmentation de la somme des fractions protéiques proportionnellement à la teneur en protéines et à la dose d'azote apportée (Figure 16.) Cependant, les différents protocoles de fractionnement de l'azote (T1 à T5) n'ont pas induit de changement dans les ratios moyens des pics.

De manière surprenante, on observe un mélange des modalités dans les différents clusters pour les OH (Figure 19) et les OP (Figure 20), confirmant les résultats précédents (Figure 18). Ainsi, la fertilisation a un impact sur la teneur en protéines totales lié à l'apport d'azote. Cependant elle ne semble pas avoir d'impact significatif sur le profil des protéines du grain. Toutefois, il est possible que les conditions de fertilisation n'aient pas été assez extrêmes pour que nous puissions identifier des différences de compositions notables entre les différentes modalités. De plus, nous n'avons pas pu vérifier la valorisation des apports azotés par des données météorologiques par exemple.



► **Prédiction des paramètres technologiques du malt**

Un des objectifs principaux de PROSIT est de relier un ou plusieurs pics protéiques de l'orge avec des paramètres technologiques du malt. En d'autres termes, est ce que certaines protéines sont à privilégier, d'autres à éviter ? Pour ce faire, des outils statistiques (e.g. corrélations simples, PLS) ont été utilisés.

L'objectif de cette analyse est d'obtenir un modèle de prédiction des paramètres technologiques du malt en identifiant les pics protéiques de l'orge les plus contributeurs.

Prédiction par la méthode des moindres carrés (PLS)

L'analyse par régression PLS a été réalisée sur les 53 pics de l'orge isolés par LabChip et sur 220 échantillons. L'ensemble des résultats est disponible sur la Figure 20 et résumé dans le Tableau 3.

Les graphiques représentent les valeurs mesurées de chaque paramètre malt (en ordonnée) en relation avec les valeurs prédites (abscisse). La droite verte est la droite de régression qui doit s'approcher de l'équation

$$y=x$$

(mesuré=prédit) avec un R^2 le plus proche de 1 (coefficient de corrélation).

La RMSEC représente l'erreur sur la population de développement du modèle. La RMSECV est l'erreur moyenne de sous-ensembles de la population de développement du modèle. C'est un critère statistique utilisé pour sélectionner le nombre de composantes (recombinaison de pics) et avoir une idée de l'erreur sur une population indépendante.

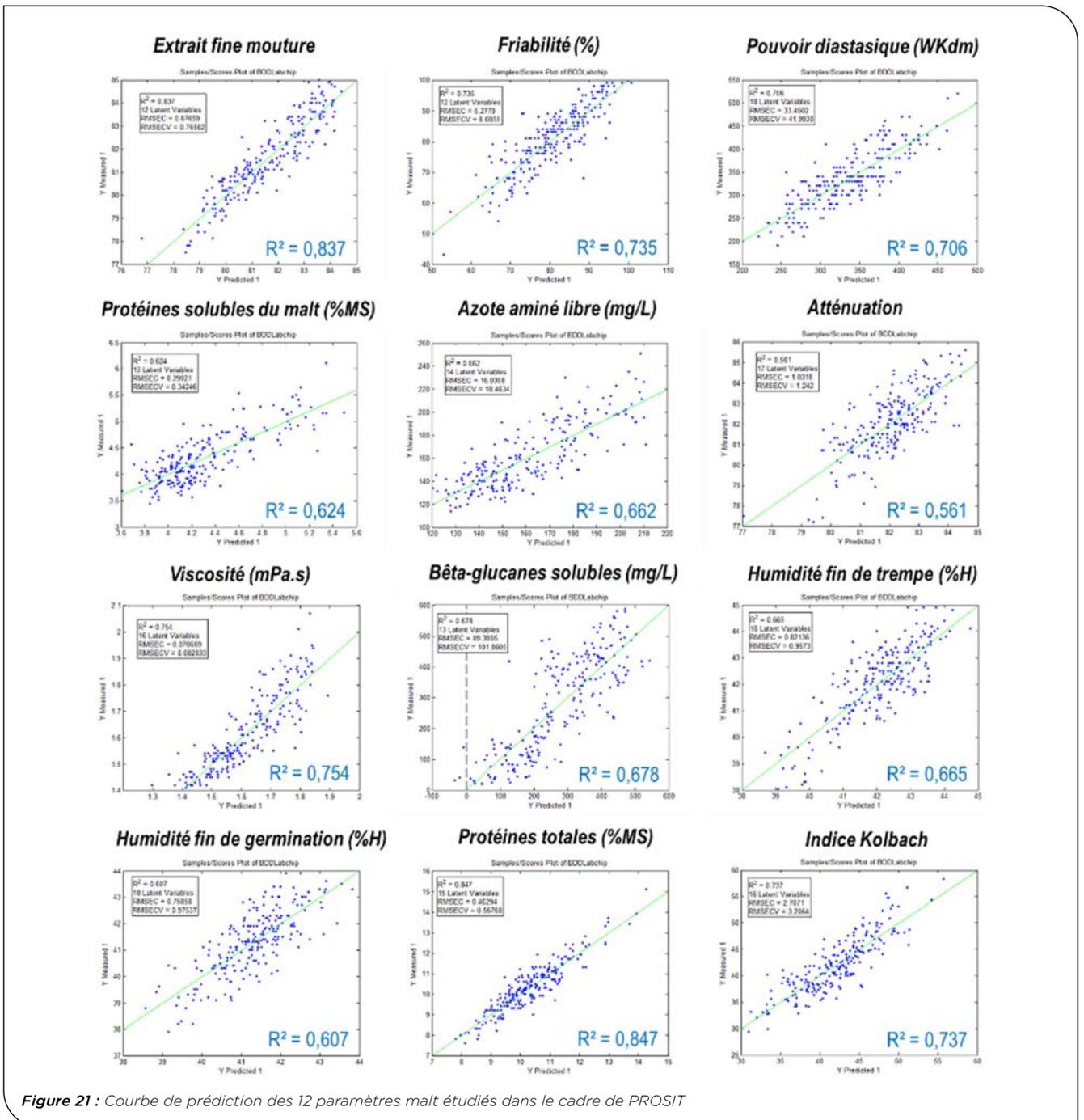


Figure 21 : Courbe de prédiction des 12 paramètres malt étudiés dans le cadre de PROSIT

Paramètres malt	R ²	Variables	RMSEC	Incertitude brute analytique
Extrait fine mouture	0,837	12	0,68	0,45
Friabilité	0,735	12	5,28	5,47
Pouvoir diastasique	0,706	18	33,45	34,94
Protéines solubles du malt	0,624	13	0,30	0,15
Azote aminé libre	0,662	14	16,03	14,56
Atténuation	0,561	17	1,03	1,43
Viscosité	0,754	16	0,07	0,03
Beta glucans soluble	0,678	13	89,40	39
Humidité fin de trempe	0,665	16	0,82	0,14
Humidité fin de germination	0,607	18	0,76	0,14
Protéines totales malt	0,847	15	0,46	0,29
Indice Kolbach	0,737	16	2,71	-

Tableau 1 : Résumé de la force de prédiction des paramètres technologiques avec les pics de protéines

Le Table 1 regroupe les données de prédiction des 12 paramètres malt. La colonne « variables » indique le nombre de pics de protéines contributeurs sélectionnés pour le modèle (entre 12 et 18 variables latentes) pour avoir une prédiction robuste. Cela nous montre que tous les pics ne sont pas pertinents pour la prédiction de chaque paramètre technologique. Les R² compris entre 0,561 et 0,847 indique des modèles plus ou moins performants selon les paramètres et perfectibles.

La précision de cette mesure est aussi mise en parallèle aux incertitudes des méthodes de référence utilisées pour mesurer chaque paramètre (RMSEC comparé à l'incertitude analytique). Bien entendu, les performances du modèle prédictif (RMSEC) sont en dessous de l'incertitude, mais reste proches dans certains cas et raisonnable en prédiction.

On peut retenir des résultats intéressants et encourageant pour les trois paramètres : extrait fine mouture (0,837), la

friabilité (0,735) ou le pouvoir diastasique (0,706) avec des erreurs de prédiction raisonnables.

Enfin, les pics les plus contributeurs aux modèles de prédictions ont été listés pour chaque paramètre technologique (Table 2).

Dans ces combinaisons de pics, 20 pics ont pu être identifiés comme fortement contributeurs dans la prédiction des paramètres malt (7 pics d'ALBUMINES, 3 pics de GLOBULINES, 6 pics d'HORDEINES et 4 pics de GLUTELINES). Le poids différent de chaque pic (positif, négatif et grandeur de la variable) en fonction des paramètres technologiques démontre ici toute la complexité de la prédiction.

Dans le cas de nos trois paramètres (EFM, FRIA, PD) dont les modèles sont les plus précis, les quatre classes de protéines sont utilisées dans la prédiction. Il n'y a pas un seul type de protéines qui semble significativement plus impliqué dans la qualité du malt qu'un autre.

Pic	ALB110.4	ALB25.8	ALB28.8	ALB36.8	ALB40	ALB69.6	ALB77.3	GLO20.79	GLO25.8	GLO54.75
EFM			-0,0035333		0,0038527	0,0062124	0,0029818	0,0063023		0,0065586
FRIA				0,055939		0,047362		0,09203		0,043588
PD		1,5869	0,89019	0,60109	2,3487	1,4352			0,73322	0,64083
PSM	0,0022646	0,0083859		0,0050576	0,0025424	0,0032811		0,0074488		0,001912
PTM		0,012648	0,0081165		0,012859		-0,0056506		0,022535	0,0076021
FAN		0,32692		0,18629	0,14559	0,13989		0,49414		
ATT	0,028555			0,044975		0,016364	0,010625	0,023746	-0,011314	
BGL		1,3832		0,82815	0,74957		0,74974	-2,2756		0,63251
HFG	0,014414		0,023805	0,031111	0,022006		0,015022		0,058102	
HFT	0,0104		0,015788	0,023434	0,018566	0,0098625				
IK	0,076525	-0,078382	0,028343	0,099954	0,037706		0,036671	0,087862	0,14248	-0,065229
VIS	-0,0013359	0,0017161	0,0025637	0,0031376	0,003295		-0,0016092		0,0030054	
Nbre apports	6	7	7	10	10	7	7	7	6	7

Pic	GLU180	GLU31	GLU35	GLU54.6	HOR12.91	HOR123	HOR23.41	HOR28.71	HOR41	HOR9.13
EFM	-0,0039866	0,0038674		0,0027147		-0,007408	-0,0029213	-0,0031726		0,0084539
FRIA	-0,054493		0,056523	-0,079708	0,067345	-0,073805	-0,094964		0,046571	0,080467
PD			-1,0434				-0,75878	1,374	0,73613	-1,2905
PSM	-0,0046763	0,0034303		-0,0063393	-0,0022737		-0,0037175	0,0021312	0,0035853	
PTM		0,0059351	-0,014169		-0,014972		0,011286	0,0080607	0,0079168	-0,013293
FAN	-0,30763	0,20798		-0,35937		-0,22332	-0,24991		0,16424	0,10693
ATT		-0,021195		-0,016907	0,018832	-0,010724	-0,032303	-0,0093452	0,012588	0,019669
BGL	0,95125	-1,1606	-0,70101	1,673	-1,1442	1,2465	1,9045		-1,2223	-0,74181
HFG		-0,014874	-0,01974	-0,018855	0,012229	-0,013801		0,029082	0,010273	
HFT		-0,018595		-0,026256	-0,010433			-0,010012	0,010846	0,021651
IK	-0,033756		0,044939	-0,033904				-0,081386		0,055585
VIS				0,0014658	-0,0015803		0,0018108		-0,0010688	-0,0018725
Nbre apports	6	8	6	10	8	6	11	7	10	10

Tableau 2 : Pics les plus contributeurs aux modèles de prédiction des paramètres malt

Validation de la prédiction

Les modèles de prédiction ont été éprouvés avec 45 échantillons de 3 variétés différentes afin de tester leur robustesse. Cette première analyse montre que les nouvelles variétés (KWS IRINA et ISOCEL) ont plus de mal à s'intégrer dans la population initiale alors que RGT Planet est plus souvent intégré. C'est dû au fait que ces 2 variétés n'ont pas été utilisées lors du développement du modèle alors que RGT Planet faisait partie de l'échantillonnage initial.

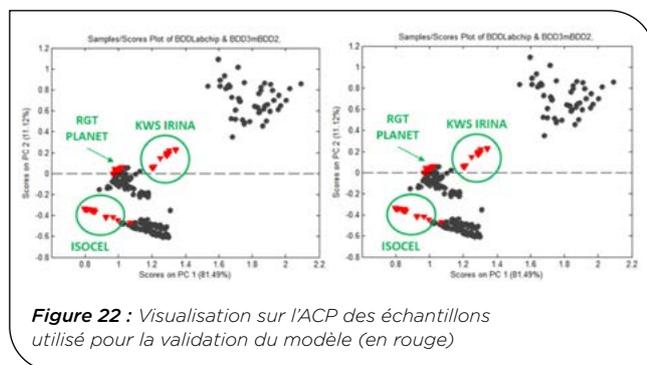


Figure 22 : Visualisation sur l'ACP des échantillons utilisés pour la validation du modèle (en rouge)

Cependant, parmi les meilleurs modèles, l'extrait fine mouture et la friabilité semblent bien prédites même pour ces nouvelles variétés. Pour le pouvoir diastasique, la prédiction ne serait valable que pour ISOCEL, et non applicable pour KWS IRINA d'après ces premiers résultats.

En plus de cette première analyse visuelle, nous pouvons comparer avec le Table 3, les deux R^2 obtenues (pour $n=220$ et $n=45$) et les erreurs relatives pour les 2 populations : RMSEC ($n=220$) et RMSEP ($n=45$).

Paramètres malt	R^2 (n=220)	R^2 (n=45)	RMSEC	RMSEP
Extrait fine mouture	0,837	0,757	0,68	1,51
Friabilité	0,735	0,684	5,28	6,84
Pouvoir diastasique	0,706	0,505	33,45	83,3
Protéines solubles du malt	0,624	0,468	0,30	0,54
Azote aminé libre	0,662	0,482	16,03	31,77
Atténuation	0,561	0,194	1,03	3,29
Viscosité	0,754	0,632	0,07	0,12
Beta glucans soluble	0,678	0,52	89,40	213,58
Humidité fin de trempage	0,665	0,334	0,82	2,97
Humidité fin de germination	0,607	0,549	0,76	1,78
Protéines totales malt	0,847	0,798	0,46	0,84
Indice Kolbach	0,737	0,643	2,71	4,49

Tableau 3 : Comparaison des performances des modèles de prédiction pour les 2 populations de développement ($n=220$) et de validation ($n=45$)

En appliquant le modèle de prédiction développé sur la première population ($n=220$) on remarque que le modèle perd en puissance. Les performances (R^2 et RMSEP) de prédiction des paramètres sont inférieures, de manière non surprenante, en comparaison à celles de la population d'entraînement.

Les erreurs liées à la prédiction restent modérées pour les paramètres extrait fine mouture et friabilité. En revanche, pour le pouvoir diastasique, la RMSEP est significativement supérieure, notamment par l'éloignement de la population KWS IRINA.

Il semble donc que ce sont les nouvelles variétés qui diminuent la précision des modèles. Cette observation va dans le même sens que l'impact variétal identifié précédemment. A ce stade de l'étude, l'intégration d'un plus grand nombre de variétés dans le modèle permettrait donc de l'améliorer et le rendre plus robuste.

Conclusion

Des modèles de prédiction des paramètres malt ont été créés à partir des 53 pics sélectionnés. Dans ces combinaisons de pics nous avons identifié 20 pics fortement contributeurs dans la prédiction des paramètres malt présent (7 pics d'ALBUMINES, 3 pics de GLOBULINES, 6 pics d'HORDEINES et 4 pics de GLUTELINES). Pour certains paramètres comme l'extrait fine mouture, la friabilité ou le pouvoir diastasique, la performance de prédiction est encourageante. La validation des modèles sur une population indépendante confirme le potentiel de prédiction de l'extrait fine mouture et la friabilité. Mais l'intégration d'un plus grand nombre de variétés au modèle permettrait d'améliorer la qualité de prédiction.

4 Discussion et conclusion

Le projet PROSIT a confirmé l'importance de s'intéresser à la composition fine des protéines des orges brassicoles et a permis de collecter une grande quantité de données et un certain nombre d'informations. Il a notamment permis **(1) la mise au point d'une méthode de quantification des fractions protéiques par électrophorèse** capillaire après un fractionnement séquentiel des types de protéines (albumines, globulines, hordéines et glutélines).

Le projet PROSIT a également confirmé l'intérêt de la démarche car il a montré une grande variabilité de composition pour une même teneur en protéines totales avec **(2) la mise en évidence d'un pool de fractions protéiques d'intérêt en lien avec des paramètres de qualité brassicole par modélisation** (méthode des moindres carrés partiels PLS). Les modèles de prédiction pour l'extrait fine mouture et friabilité sont très encourageants, car validés sur un nouveau pool d'échantillons indépendants. Mais ils restent perfectibles et mériteraient d'être renforcés avec un nombre de variétés plus importants.

(3) Le projet a mis en évidence que l'impact variétal est significatif sur la composition en protéines des orges dans le cadre des expérimentations menées. D'après nos résultats, les autres facteurs agronomiques (année de récolte, lieu, espèce d'orge, protocole de fertilisation) n'ont pas d'impact caractéristique.

Ensuite, d'après les résultats collectés sur les 220 échantillons étudiés, on peut retenir deux résultats majeurs :

Les variétés ne semblent pas être définies par leur profil en albumines et globulines. Ces deux classes

de protéines semblent plutôt différencier les espèces OP des espèces OH. On peut faire l'hypothèse que ces protéines contribuent à la différence de qualité fonctionnelle (notamment activité enzymatique) entre les OP et les OH. Cependant, la variété FANDAGA fait exception et présente un profil très singulier de globulines, mais intéressant à investiguer pour la caractérisation/prédiction future des variétés protéolytiques.

Les résultats les plus significatifs de l'effet variétal sont observés sur les hordéines (et dans une moindre mesure les glutélines) avec trois profils « type » mélangeant les deux espèces d'orges brassicoles confirmés par l'ACP. Ces observations supposent que la sélection variétale des orges brassicoles est et restera le meilleur levier pour contrôler la qualité des protéines.

5 Remerciements

Nous tenons à remercier toute l'équipe de micro-maltage de l'IFBM : Catherine Colin, Marjorie Salles et Vanessa Parent, qui ont largement été impliquées dans la transformation de tous les échantillons d'orge. Nous tenons également à remercier Séverine Maudemain (ARVALIS) qui a réalisé tout le traitement statistique des données.

Enfin, merci à tous les partenaires du projet FSOV pour leur contribution significative à ce travail : Arvalis, GEVES, UFS ainsi que tous les sélectionneurs qui ont participé aux essais agronomiques (FLORIMOND-DESPREZ, LIMAGRAIN, KWS MOMONT, RAGT 2n, SECOBRA Recherches, SYNGENTA UNISIGMA). Mais aussi Malteurs de France, ainsi que Brasseurs de France pour leur enthousiasme pour ce sujet.

Références bibliographiques

¹ **Schmitt, M.** (2013). Attentes qualitatives des Malteurs et des Brasseurs. 15ème Colloque Orge d'Arvalis, 18 avril 2013, Reims.

² **Schalk, K., Lexhaller, B., Koehler, P., & Scherf, K. A.** (2017). Isolation and characterization of gluten protein types from wheat, rye, barley and oats for use as reference materials. *PLoS ONE*, 12(2), 1-20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172819>

³ **OSBORNE, T.B.**, (1907). The proteins of the wheat kernel. Publication 84. Carnegie Institute of Washington, Washington DC

⁴ **Linko, R., Lapvetelainen, A., Laakso, P., & Kallio, H.** (1989). Protein Composition of a High-Protein Barley Flour and Barley Grain. *Cereal Chemistry*, 66(6), 478-482.

⁵ **Molina-Cano, J. L., Polo, J. P., Romera, E., Arais, J. L., Zarco, J., & Swanston, J. S.** (2001). Relationships between

barley hordeins and malting quality in a mutant of cv. Triumph I. Genotype by environment interaction of hordein content. *Journal of Cereal Science*, 34(3), 285-294.

⁶ **Marchylo, B. A., Kruger, J. E., & Hatcher, D.** (1986). High performance liquid chromatographic and electrophoretic analysis of Hordeins during malting for two barley varieties of contrasting malting quality. *Cereal Chemistry*, 63(3), 219-231.

⁷ **Balazs G., Tomoskozi S., Harasztos A., Nemeth V., Tamas A., Morgounov A., Belan I., Ma W., Bekes F.** Advantages and Limitation of Lab-on-a-Chip Technique in the Analysis of Wheat Proteins. *Cereal Research Communications*, 2012.

⁸ **D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte and L. Kaufman.** Chemometrics: a textbook., Elsevier, Data Handling in Science and Technology, Volume 2, Amsterdam 1988.

PROSIT : Qualification des protéines d'intérêt pour la qualité brassicole des orges

Julien BILLARD¹, Sophie SCHWEBEL¹, Marc SCHMITT¹, Séverine MAUDEMAIN², Isabelle CHAILLET², Louis-Marin BOSSUET³, Amélie GENTY⁴, Jean-François HERBOMMEZ⁴, Jean-Philippe JELU⁵

1 - IFBM - Institut Français des Boissons de la Brasserie Malterie

7 rue du Bois de la Champelle, 54500 Vandœuvre-les-Nancy

2 - ARVALIS - Institut du Végétal - 3 rue Joseph et Marie Hackin, 75116 Paris

3 - GEVES - 25 rue Georges Morel, CS 90024, 49071 Beaucoze Cedex

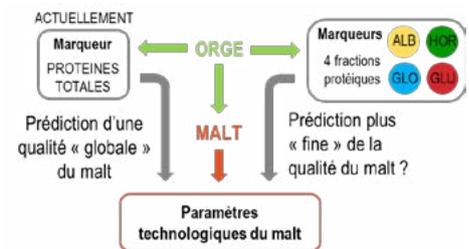
4 - UFS - Union Française des Semenciers - 17 rue du Louvre, 75001 Paris

5 - Malteurs de France - 66 rue de la Boétie, 75008 Paris

INTRODUCTION

Les protéines de la matière première (orge et malt) jouent un rôle important dans les processus de maltage et de brassage. Toutefois, les protéines de l'orge sont peu étudiées. Même si les cahiers des charges des malteurs exigent une teneur minimale et maximale en protéines totales de l'orge, la composition détaillée des protéines n'est pas connue et pourrait expliquer les différents niveaux de protéolyse du malt. Dans un contexte de changement climatique et de réduction de la fertilisation azotée, le projet collaboratif PROSIT propose de dresser le profil qualitatif des différentes fractions protéiques de l'orge et d'identifier les possibles relations avec les paramètres du malt. L'impact de la variété d'orge et des conditions de fertilisation sur le profil protéique a également été étudié de manière qualitative.

La teneur en protéines totales de l'orge est une information générale. Peut-on avoir des informations plus fines avec l'étude des classes protéiques ?



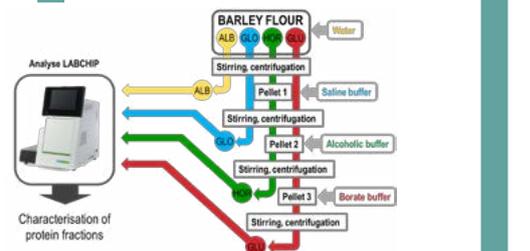
STRATEGIE DU PROJET

1. ECHANTILLONNAGE DES ORGES (n=321)

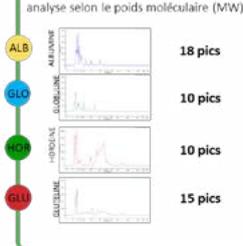
Différents lieux et années de récoltes, différentes variétés & N fertilisations

2. ANALYSE DES FRACTIONS PROTEIQUES

Isolation séquentielle des 4 fractions et analyse par électrophorèse capillaire (Labchip, Perten)



Fractions protéiques de l'ORGE : analyse selon le poids moléculaire (MW)



3. MICRO-MALTAGE ET ANALYSES DES MALTS

Qualité technologique MALT

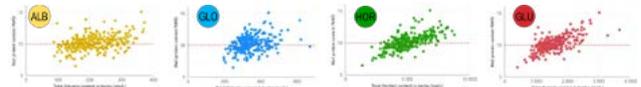
- Friabilité (FRIA)
- Viscosité (VIS)
- Protéines totales (PTM)
- Protéines solubles (PSM)
- Indice Kolbach (IK)
- Extrait fine mouture (EFM)
- Bêtaglucanes solubles (BGL)
- Pouvoir diastasique (PD)

4. TRAITEMENT STATISTIQUE

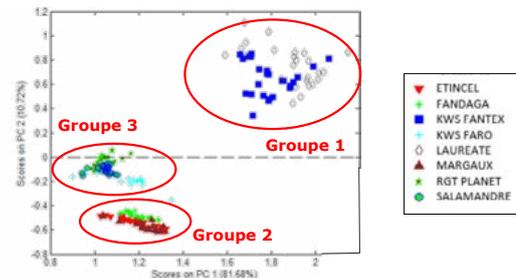
Établissement d'un lien entre les fractions protéiques de l'orge et les paramètres du malt (1284 profils > 16 158 pics sélectionnés)

RESULTATS

Variation très importante de la teneur des fractions pour une même teneur en protéines totales

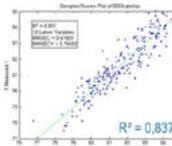


L'analyse ACP des essais de fertilisation azotée (n = 220) montre un effet variétal important sur le profil protéique, mais pas d'effet culture, ni d'effet sur les modalités d'apports.

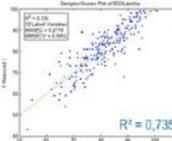


Des modèles de prédictions des paramètres du malt ont pu être mis au point à partir des pics de protéines identifiés, avec plus ou moins de performances (R² entre 0,56 et 0,85) pour les variétés d'orge étudiées.

Extrait fine mouture



Friabilité (%)



Paramètres malt	R ²	Variables	RMSEC	Incertitude brute analytique
Extrait fine mouture	0,837	12	0,68	0,45
Friabilité	0,735	12	5,28	5,47
Pouvoir diastasique	0,706	18	33,45	34,94
Protéines solubles du malt	0,624	13	0,30	0,15
Azote aminé libre	0,662	14	16,03	14,56
Atténuation	0,561	17	1,03	1,43
Viscosité	0,754	16	0,07	0,03
Bêta glucanes soluble	0,678	13	89,40	39
Humidité fin de trempage	0,665	16	0,82	0,14
Humidité fin de germination	0,607	18	0,76	0,14
Protéines totales malt	0,847	15	0,46	0,29
Indice Kolbach	0,737	16	2,71	-

CONCLUSIONS

Le projet a permis de constituer une base de données caractérisant plus de 320 échantillons dont 220 ont été utilisés pour essayer d'identifier des liens entre fractions protéiques de l'orge et qualité brassicole du malt. Les principales conclusions du projet sont :

- Il existe une très grande diversité dans la composition des protéines de l'orge pour une même teneur totale en azote ;
- Le profil protéique est fortement lié à la variété de l'orge ;
- L'année de culture, le lieu ou le calendrier de fertilisation a peu d'impact sur la composition des protéines, pour les variétés d'orges étudiées ;
- Des modèles de prédictions des paramètres techniques du malt ont été créés à partir de 20 marqueurs, pour les variétés d'orge étudiées ; la diversité génétique doit être renforcée pour rendre plus robuste les modèles.

Financements: FSOV, Fondation de la Malterie et de la Brasserie
Remerciement à l'ensemble des partenaires du projet : IFBM, ARVALIS, GEVES, UFS, Malteurs de France & Brasseurs de France



DéLiBéRé-JNO : Développement de Lignées de Blé adaptées et Résistantes à la Jaunisse Nanisante (JNO)

Edouard PENEZ^{1*}, Philippe MOMONT¹, Charles SNIJDERS¹, Anne-Charlotte LOMBART¹, Pascal GIRAUDEAU¹, Romain LAMERAND¹, Gemma MOLERO¹, Patrice SENELLART¹, Sylvie DUTRIEZ¹, Matthieu MICHEL¹, Raphael VEQUAUD¹, Paul FORGEOIS², Charlotte THIBAUT², Torsten WILL³, Pierre SOURDILLE⁴

1 - CETAC - 7, rue du Coq Heron, 75030 Paris

2 - INSTITUT DE GENECH - rue de la libération, 59242 Genech

3 - JULIUS-KÜHN-INSTITUT - Erwin Baur Strasse 27, 06484 Quedlinburg, ALLEMAGNE

4 - INRAE - UMR 1095 Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales -

5, Chemin de Beaulieu, 63000 Clermont-ferrand

*Coordinateur : Edouard PENEZ, edouard.penez@asur-plantbreeding.com

1 Introduction

L'amélioration génétique du blé tendre (*Triticum aestivum* L.) est devenue une préoccupation majeure afin de pourvoir à la consommation mondiale qui ne cesse d'augmenter (environ 2% par an) du fait d'une hausse de la population (estimée à 9 milliards d'habitants en 2050) et la multiplication des usages alimentaires mais aussi non-alimentaires (biocarburant, biogaz, bioplastic). Cependant, si les rendements ont régulièrement progressé entre 1950 et 2000, ils commencent à stagner depuis une vingtaine d'années (Figure 1) ce qui laisse craindre des pénuries dans les années à venir.



Figure 1 : Évolution de la production (en vert), consommation (en rouge) et stocks (histogramme) de blé dans le monde sur les 10 dernières années. (<http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>)

L'amélioration des rendements est donc une préoccupation majeure des filières de sélection. Cependant, cet accroissement de production doit s'effectuer en prenant en compte la nécessité d'une agriculture durable, respectueuse de l'environnement, utilisant moins d'intrants (engrais, pesticides, fongicides, eau). Elle doit également faire face au défi majeur du réchauffement climatique avec des épisodes plus fréquents et plus intenses de sécheresse et de canicule. Le changement climatique induit également des hivers plus doux et des périodes de froid plus tardives qui se traduisent par une recrudescence des maladies virales sur blé, orge et avoine telles que la jaunisse nanisante de

l'orge (JNO), la plus grave causée par des virus (Barley yellow dwarf virus, BYDV) transmis exclusivement par pucerons (*Rhopalosiphum padi* L. et *Sitobion avenae* J.Fabr.). Cette virose impacte fortement la production céréalière et entraîne des pertes de rendements en moyenne de 30% dans les champs infectés qui peuvent, lors de fortes épidémies (campagne 2015-2016), atteindre plus de 80%. Si la lutte chimique contre les pucerons a été la réponse la plus efficace jusqu'à maintenant, la réduction recommandée de l'utilisation des pesticides (plan Ecophyto II) et l'interdiction à court terme de familles chimiques (néonicotinoïdes) changent la donne et imposent de se tourner vers de nouvelles solutions pour maintenir une production suffisante et de qualité.

Une façon séduisante de résoudre cette équation est d'exploiter le réservoir des résistances présentes dans des espèces sauvages apparentées au blé (*Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth & D.R.Dewey et *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn.) qui ont déjà servi par le passé à introduire des phénotypes de tolérance à la JNO. Cependant, l'inconvénient de cette approche est l'introduction simultanée de caractères délétères (pertes de rendement, verse...) qu'il est primordial d'éviter. Une façon d'y parvenir est de maîtriser les échanges (ou crossovers) qui ont lieu lors de la méiose entre les chromosomes issus des espèces apparentées et ceux du blé tendre. Une stratégie originale consiste à travailler sur des mutants des gènes qui contrôlent ces échanges et en particulier le gène *ph1* dont la mutation induit une hausse de la fréquence des crossovers entre chromosomes apparentés (appelés homéologues).

L'objectif global du projet DéLiBéRé-JNO était de développer des lignées de blé proches d'un matériel élite d'hiver employé dans les schémas de sélection Européens mais portant des introgressions issues d'espèces apparentées leur conférant un niveau de résistance à la JNO satisfaisant. Le projet repose sur la création et la caractérisation moléculaire et phénotypique d'une population de lignées recombinantes issues du croisement entre une variété proche de l'élite européenne (Cadenza) et mutée pour le gène *ph1*, et différentes variétés exotiques apportant une bonne tolérance à la JNO de par leurs introgressions issues de *Thinopyrum intermedium* et *Agropyron cristatum*, mais inadaptées aux pratiques culturales européennes.

2 Matériel et méthode

► 2.1. Matériel végétal

Pour le développement des populations, les croisements font intervenir deux lignées dérivées de la variété Cadenza mutée par Éthyle-Méthane-Sulfonate (EMS) au niveau du gène *ph1* (identifié comme étant *TaZip4-B2* ; Rey *et al.* 2017) : Cadenza-0348 et Cadenza-1691. Cinq lignées connues comme ayant un bon niveau de résistance à la JNO ont été choisies : Glover (*BYDV2*), Mackellar (*BYDV2*), P29 (*BYDV3*), P961341 (*BYDV3*), Zhong-4 (*BYDV4*). Afin d'optimiser les réalisations des croisements, un test pour déterminer les besoins en vernalisation a été effectué préalablement. Il montre que Cadenza, Glover et Zhong 4 sont de type printemps alors que Mackellar, P29, P961341 sont de type hiver et nécessitent une vernalisation. Les croisements par Zhong-4 ont été abandonnés pour cause de nécrose hybride.

Les croisements entre les deux individus Cadenza et les quatre lignées tolérantes ont été effectués dans les deux sens, en utilisant les individus Cadenza soit comme mâle, soit comme femelle. Par la suite, les individus hybrides ont été rétro-croisés par les individus Cadenza correspondant (génération BC1F1). Après, un tri moléculaire pour isoler les individus homozygotes mutants *ph1* et hétérozygotes au niveau des introgressions, ceux-ci ont été autofécondés pour générer une population en ségrégation (BC1F2). Les individus ont ensuite été conduits par autofécondations successives jusqu'en génération BC1F5.

► 2.2. Marquage moléculaire

Les ADN sont extraits à partir de feuilles de jeunes plantules au stade trois feuilles à l'aide d'un kit BeadX selon le protocole en vigueur sur la plateforme GENTYANE de l'UMR GDEC. Les ADN sont ajustés à 10ng/ μ L après extraction et 30ng sont utilisés pour la préparation des banques nécessaires au génotypage par puce.

Les parents des populations et les descendants ont été analysés à l'aide d'une puce SNP AXIOM™ comportant 35 000 marqueurs (Rimbert *et al.* 2018). La présence d'introgressions dans le génome de blé provenant d'espèces apparentées se traduit par un génotypage aberrant d'une succession de SNP localisés dans la région concernée (Off Target Variants : OTV). Brièvement, chaque SNP émet un signal fluorescent dont l'intensité varie selon les individus. L'intensité du signal est comparée à celle d'un génotype de référence (ici Cadenza) pour normaliser les données. Une valeur de normalisation négative traduit un signal d'intensité inférieur à la référence. Un algorithme de segmentation est ensuite appliqué sur la matrice des valeurs normalisées pour identifier les points de rupture correspondant aux introgressions. La position de chaque SNP étant connue à la base près sur la séquence de référence (Chinese Spring ; Zhu *et al.* 2020), cela permet de déterminer la position et la taille des différentes introgressions.

► 2.3. Phénotypage en conditions contrôlées

Les tests sur plantes juvéniles ont été effectués en serre sous conditions contrôlées ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, 60 % humidité, alternance jour/nuit 16h/8h) sur un panel d'accessions incluant des blés d'hiver et de printemps.

Dix plantules par accessions ont été inoculées, chacune par cinq pucerons *Rhopalosiphum padi* virulifères (BYDV-PAV). Après une incubation de sept jours, les pucerons sont tués par un traitement insecticide. Cinq semaines après inoculation, le BYDV est détecté par analyse sérologique (DAS-ELISA : double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay). Les données acquises donnent des informations sur le taux d'infection mais également sur la teneur relative du virus pour les accessions testées. La notation des symptômes sur une échelle de 1 (en bonne santé) à 9 (morte) soutiendra, en plus des données acquises par ELISA, la sélection des accessions résistantes au BYDV.

► 2.4. Phénotypage aux champs

Dans ce projet DéLiBéRé JNO, un réseau conséquent d'expérimentations a été mis en place afin de multiplier les chances de pouvoir observer et caractériser des symptômes de JNO sur différents panels. Ainsi, nous disposons d'un réseau maximum de six lieux d'expérimentation entre les membres du groupe CETAC : Mons en Pévèle (59), Auchy Lez Orchies (59), Maule (78), Terminiers (28), Reclainville (28) et Aiguisy (60). En 2019, un premier panel de 30 accessions a été testé sur deux sites.

En 2020, un panel de 109 accessions (deux lignes de 1.5 m par accession) a pu être mis en place sur trois lieux avec un très bon niveau d'infection (Figure 2).

Enfin en 2023, deux panels d'environ 530 variétés (deux répétitions par variété) chacun, ont été évalués sur trois lieux différents.

Pour les notations de symptômes, la même échelle que pour les conditions contrôlées est utilisée.



Figure 2 : Expérimentation JNO blé 2019/2020 à Aiguisy (60).

3 Résultats

► 3.1. Évaluation et caractérisation des ressources génétiques aux champs et en conditions contrôlées

Le Tableau 1 donne un résumé du phénotypage des niveaux de résistance moyen sur les trois lieux d'expérimentation et pour deux stades de développement des plantes. Les essais ont été couronnés de succès. Il y avait un bon niveau

d'infection. Toute la gamme de résistance (1 à 9) a été observée. Une quinzaine d'accessions a montré un niveau de tolérance intéressant aux deux stades d'observation. Parmi les lignées parentales utilisées, OK7211542 et P29 ont montré le meilleur niveau de tolérance. Glover, P961341 et Mackellar sont d'un niveau inférieur. Zhong 4, qui a été également utilisée comme lignée parentale, a montré de bons résultats mais malheureusement les croisements n'ont pas pu être développés pour cause de nécrose hybride. La lignée Zhong 4 possédant le gène *Bydv4* présente le plus haut niveau de résistance parmi les lignées parentales.

Génotype	Score 1	Écartype 1	Score 2	Écartype 1
AUS 11955	1,5	0,9	1,2	0,3
CPI 147233b	1,8	0,4	2,0	0,7
ZHONG 4	1,0	0,0	2,0	0,0
CPI 147251b	2,8	1,1	2,5	1,4
CPI 147236a	2,3	1,2	2,7	1,5
CPI 147242b	1,8	0,8	2,7	1,5
OK7211542	2,3	1,2	3,0	1,7
AUS 6770	2,7	0,3	3,2	0,6
CPI 147239b	1,7	1,2	3,2	2,0
CPI 147247a	1,7	1,2	3,3	2,1
CPI 147280b	2,3	1,5	3,5	2,5
CPI 147232 a/b	2,2	0,8	3,7	2,0
CPI 147238b	2,3	1,5	3,7	2,3
CPI 147231b	2,3	1,5	3,8	3,3
CPI 147234b	1,7	0,6	3,8	2,5
CPI 147250a	3,2	2,0	4,5	3,1
AABBVV	4,0	3,5	4,7	3,8
CPI 147247b	4,7	0,6	5,3	0,3
P29	3,2	1,6	5,3	2,4
P961341	6,3	2,5	7,2	3,2
GLOVER	6,0	2,8	7,5	2,1
MACKELLAR	6,5	0,7	8,0	1,4
Toluca.50	8,2	0,8	8,7	0,6
Ts'ao Yuan 2	8,2	1,0	8,7	0,6
FAO.33.316	8,8	0,4	8,8	0,4
I.BO.1828	8,5	0,9	8,8	0,3

Tableau 1 : Résultats obtenus après observation aux champs sur les lignées parentales (encadrées) et sur les meilleures ressources génétiques testées par le CETAC ; Moyenne sur trois lieux ; année 2019/20 (1 = tolérant / 9 = sensible)

Génotype	Titre du virus
Mackellar	0,34
P 9613 41	0,59
Glover	0,72
Zhong 4	0,72
Frontana Nr. 568	0,89
Spinebill	0,91
Milan 1	0,98
89 Zhong 2	0,98
P 29	0,98
Anza Lr 37Yr17 Sr 38	1,03
Hybnos	1,33
Condor 2	1,34
Anza 4	1,42
Condor 3	1,47
Anza 3	1,60

Tableau 2 : Valeurs du titre du virus BYDV pour chaque génotype à partir du test DAS-ELISA. Les valeurs proches de 0 indiquent un bon niveau de tolérance. Les lignées parentales sont en gras.

En effet, un premier panel de 30 accessions en 2019 puis une sélection de six variétés sensibles et de six variétés tolérantes en 2020 ont permis de valider l'ensemble de nos notations. Le Tableau 2 reprend 15 des 30 accessions testées au JKI.

► 3.2. Production des populations

Les croisements initiaux ont été effectués dans deux environnements contrôlés à l'Institut de Genech et chez KWS Momont. Au total 963 grains BC1F1 ont été produits avec des variations selon les croisements allant de 39 grains pour le croisement P961341 x Cad-0348 à 195 grains pour le croisement P29 x Cad-1691 (Tableau 3).

Croisement	Genech	Momont	Total
Glover x Cad-0348	132	47	179
Glover x Cad-1691	99	46	145
Mackellar x Cad-0348	17	101	118
Mackellar x Cad-1691	41	68	109
P29 x Cad-0348	-	40	40
P29 x Cad-1691	31	164	195
P961341 x Cad-0348	3	36	39
P961341 x Cad-1691	15	123	138
Total	338	625	963

Tableau 3 : Résultat de la production des grains BC1F1 à partir des huit croisements initiaux dans deux environnements (Institut de Genech et KWS Momont) en conditions contrôlées.

Afin d'isoler les individus mutants homozygotes pour la mutation *ph1* et hétérozygotes aux introgressions, 40 grains pour chaque croisement ont été semés (319 grains) en équilibrant autant que possible les deux sources (Institut de Genech, KWS Momont). 274 plantules se sont développées (86 % ; Tableau 4).

Croisement	Grains semés (Genech/KWS)	Plantules obtenues	Plantes pos.	Grains récoltés
Glover Cad-0348	40 (20+20)	38 (19+19)	11 (6+5)	240
Glover Cad-1691	40 (20+20)	39 (20+19)	12 (6+6)	926
Mackellar Cad-0348	40 (17+23)	37 (16+21)	5 (3+2)	55
Mackellar Cad-1691	40 (20+20)	37 (20+17)	9 (7+2)	177
P29 Cad-0348	40 (0+40)	32 (0+32)	4 (0+4)	0
P29 Cad-1691	40 (20+20)	39 (19+20)	4 (0+4)	26
P961341 Cad-0348	39 (3+36)	19 (1+18)	3 (1+2)	16
P961341 Cad-1691	40 (15+25)	33 (14+19)	5 (2+3)	314
Total	319	274 (109+165)	53 (25+28)	1754

Tableau 4 : Résultat des tests de génotypage pour sélectionner les individus mutants homozygotes *ph1* et hétérozygotes aux introgressions (Plantes pos.) et nombre total de grains récoltés par croisement.

Un échantillon de feuille a été prélevé pour l'extraction d'ADN et la réalisation des tests moléculaires. Les individus sont conservés en chambre à vernaliser (6°C, 8h jour/16h nuit) en attendant le résultat.

Sur les 274 individus testés, 53 sont conformes à l'attendu à savoir homozygotes pour la mutation *ph1* et hétérozygotes au niveau des introgressions supposées (19%) ce qui est légèrement inférieur au nombre espéré (25% soit 68).

Les plantules ont été cultivées en conditions contrôlées jusqu'à la récolte ce qui a permis de produire 1754 grains pour les huit croisements, un seul ayant été totalement stérile (P29 x Cad-0348 ; Tableau 4). Les grains ont été fournis à l'Institut de Genech pour la poursuite de la production des populations jusqu'au stade BC1F5. Au stade BC1F3, deux plantes par numéro ont été menées en parallèle chez KWS-Momont et à l'Institut de Genech. Au total, 1245 individus BC1F5 ont été développés.

► 3.3. Analyse des introgressions chez les parents par puce SNP

Afin de déterminer la position et la taille des introgressions chez les lignées parentales, celles-ci ont été génotypées à l'aide de la puce SNP AXIOM™ 35K. Cinq plantes différentes sont analysées pour chaque génotype de façon à éviter un manque d'homogénéité des lots de semences. L'introgression est validée lorsqu'elle est retrouvée sur au moins quatre des cinq plantes. Les résultats sont compilés dans le Tableau 5.

Géno-me	A	B	D
1	P29 (L 10.6)	P96 (S 238.2)	Glo/Mac (L 9.2)
2	Glo/P29 (S 2-5) Glo (L 2.8)	P96 (683)	Mac (L 16) P29 (L 189.5)
3	P29 (S 18.4)	P29 (S 10.6) P96 (L 3.2)	
4	Glo (S 2.5) P29 (L 31.1)		P29 (L 78.7)
5	Mac (S 0.5)	Glo/Mac (L 13-21)	
6	Glo (S 1 ; L1.8)	Glo (L 0.2)	P29 (L 28.7)
7	P29 (S 3.6)		P96 (S 51.6) Glo (L 477.5) Mac (L297.6) P96 (L107.6)

Tableau 5 : Résultat de l'analyse des lignées parentales à l'aide de la puce AXIOM™ 35K. Glo : Glover ; Mac : Mackellar ; P29 : P29 ; P96 : P961341. S : bras court ; L : bras long. La taille est donnée en Mégabases (Mb). Les données en rouge et gras sont les introgressions de plus grande taille.

L'analyse des données montre que chaque lignée parentale possède plusieurs introgressions de taille variable. Comme attendu du fait de la distribution de la recombinaison le long des chromosomes chez le blé, celles-ci sont en général distales et de petite taille (moins de 10 Mb). Cependant, certaines sont de très grande taille (>200 Mb) et la lignée P961341 a même probablement le chromosome 2B entier qui a été substitué. Toutes les lignées ont des introgressions au niveau du chromosome 7D ce qui suggère qu'elles possèdent toutes BYDV2 mais peut-être aussi BYDV3 (P961341). Les lignées P29 et P961341 qui ont de larges introgressions sur les chromosomes du groupe 2 (respectivement 2D et 2B) pourraient également être porteuses du gène BYDV4.

► 3.4. Analyse des introgressions dans la descendance

Suite aux analyses précédentes concernant les introgressions chez les lignées parentales, il a été décidé de focaliser le génotypage sur seulement quatre populations : P29 x Cad-0348, P29 x Cad-1691, P961341 x Cad-0348 et P961341 x Cad-1691. Au total, 965 descendants ont été produits pour ces quatre populations (68 pour les populations avec P29 et 897 avec P961341). Suite à la perte de quelques individus, 784 individus ont effectivement été génotypés sur trois puces SNP AXIOM™ 35K (32 avec P29 et 752 avec P961341). L'analyse comparative des parents (qui sont présents en duplicat sur chaque puce) montre que la reproductibilité est excellente entre les trois puces avec moins de 2% de données manquantes et 97.5% de données cohérentes, y-compris pour les OTV qui permettent l'identification des introgressions.

L'analyse des descendants issus des deux populations P29 (Figure 3) montre que 11 plantes sur les 32 recombinant dans les fragments introgressés de la lignée P29 (représentés en rouge sur la Figure 2, les recombinants sont identifiés par des flèches rouges également). Les fragments localisés sur les chromosomes 2B, 3A et 7D ne recombinent jamais.

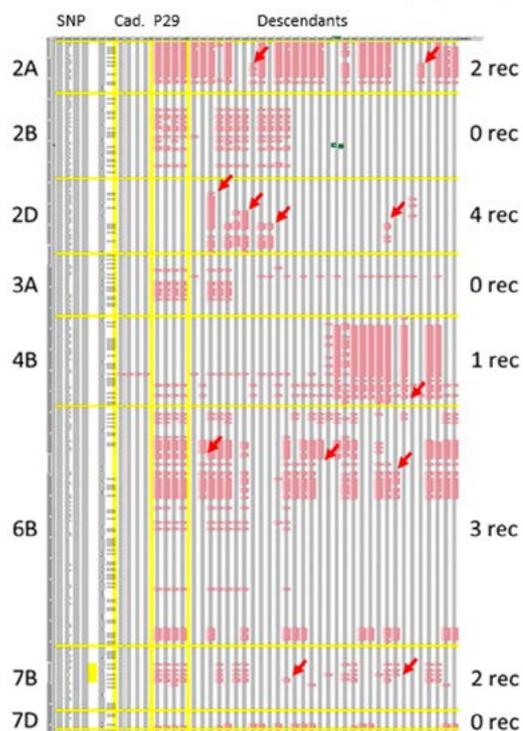


Figure 3 : Analyse des individus issus du croisement entre Cadenza muté pour *ph1* et P29 (BC1F5). Chaque ligne représente un marqueur SNP (colonne 1). Les marqueurs sont ordonnés selon leur position le long des chromosomes depuis le télomère du bras court en haut, jusqu'au télomère du bras long en bas. Cad. : génotype de Cadenza (colonne 2). P29 : génotype de P29 (colonne 3). Descendants : génotype des descendants (colonne 4). Les génotypes marqués en rouge (OTV) correspondent aux introgressions.

De la même façon, l'analyse des descendants issus des deux populations dérivées des croisements entre Cadenza muté pour *ph1* et P961341 sont donnés dans la Figure 4. De façon intéressante, beaucoup plus d'individus recombinants sont observés (97). En particulier, les fragments introgressés du chromosome 2B sont régulièrement de taille plus réduite et les deux introgressions du Chromosomes 7D (Figure 4) sont séparées chez certains individus.

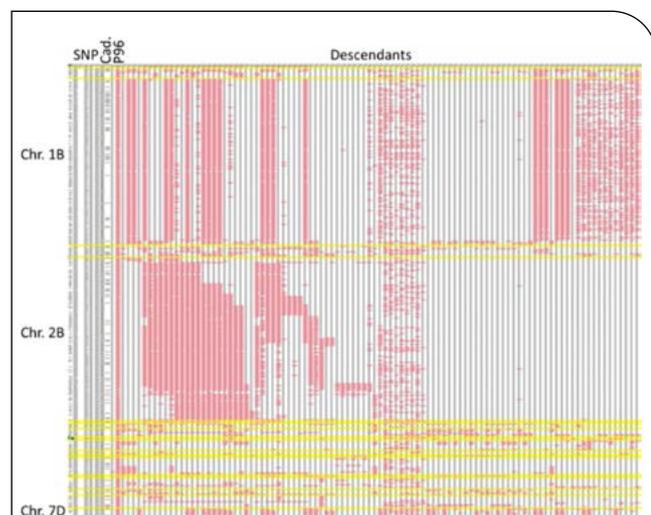


Figure 4 : Analyse des individus issus du croisement entre Cadenza muté pour *ph1* et P961341 (BC1F5). Chaque ligne représente un marqueur SNP (colonne 1). Les marqueurs sont ordonnés selon leur position le long des chromosomes depuis le télomère du bras court en haut, jusqu'au télomère du bras long en bas. Cad. : génotype de Cadenza (colonne 2). P96 : génotype de P961341 (colonne 3). Descendants : génotype des descendants (colonne 4). Les génotypes marqués en rouge (OTV) correspondent aux introgressions. Seuls 97 individus qui recombinent dans les introgressions sont représentés.

► 3.5. Phénotypage des populations recombinantes aux champs et en condition contrôlé

Malheureusement l'année 2023 ne nous a pas permis d'évaluer les individus avec autant de fiabilité qu'en 2020. Le taux d'infection n'a pas été aussi élevé et seuls deux lieux sur six ont pu permettre de dégager une tendance de tolérance. Notre sélection s'est donc portée d'abord sur les résultats obtenus en conditions contrôlées comme décrit dans l'annexe 1 (80 individus seulement sur 975). Une vingtaine d'individus a été sélectionnée de manière robuste. Pour les individus triés à partir des données d'expérimentation, nous allons devoir les tester de nouveau aux champs pour affiner notre sélection. Enfin, pour les individus pour lesquels nous n'avons pas pu déterminer le niveau de tolérance, nous allons grâce aux données de génotypages et l'ensemble des données de phénotypage, essayer de déterminer un profil génétique qui pourrait correspondre à nos attentes.

► 3.6. Analyses de la tolérance des descendants recombinants

Pour des raisons d'effectif, seulement 80 individus recombinants ont été phénotypés pour leur tolérance à la JNO en conditions contrôlées : 21 issus de la population Cadenza x P29 et 59 issus de la population

Cadenza x P961341. Pour chaque génotype, entre cinq et huit plantes sont testées (Annexe 1). Certains individus montrent un niveau de tolérance satisfaisant, en particulier dans la population issue de P961341. Une analyse rapide de leur génotype tend à montrer qu'ils ont probablement intégré le gène *BYDV2* sur le bras long du chromosome 7D et pour certains, peut-être même le gène *BYDV3* sur ce même chromosome mais sur le bras court. Une analyse plus approfondie devra être menée pour confirmer ces données.

► 3.7. Exploitation des résultats

Les données concernant le génotypage de tous les individus des deux populations Cadenza x P29 et Cadenza x P961341 ont été transférées aux partenaires du projet. En combinant les résultats de phénotypage et les données de génotypage, il sera possible pour chaque partenaire d'identifier les génotypes montrant le meilleur taux de résistance et ayant les fragments introgressés des deux lignées donneuses les plus courts de façon à revenir vers un génotype élite le plus rapidement possible. Tous les génotypes restent pour l'instant dans un fond génétique *ph1*. En continuant de maintenir ce fond, il est également possible de continuer de réduire la taille des introgressions de façon à limiter au maximum les effets négatifs du *linkage drag*.

4 Discussion et Conclusion

L'objectif du projet était de développer des génotypes adaptés aux pratiques culturales européennes et tolérants au virus de la jaunisse nanisante de l'orge (BYDV) à partir de nouvelles ressources génétiques exotiques (P29, P961341, Mackellar, Glover, Zhong-4), en utilisant une approche originale faisant intervenir des mutants du gène *ph1* impliqué dans le contrôle de la recombinaison entre chromosomes apparentés (homéologues). De ce point de vue, nous avons montré qu'il était possible de réduire par cette voie la taille des introgressions en produisant plusieurs dizaines de lignées ayant des fragments plus courts que ceux initialement présents chez les parents donneurs exotiques. La stratégie est donc tout à fait adaptée pour produire un matériel original à partir de ressources génétiques apparentées au blé.

Malgré les difficultés pour établir un phénotype précis de tolérance au virus, les essais pratiqués à la fois aux champs et en conditions contrôlées montrent que certains génotypes sont plus résistants ce qui suggère qu'ils ont bien intégré des facteurs favorables pour lutter contre cette virose. Certains génotypes semblent même avoir des introgressions différentes de celles connues portant le gène *BYDV2*. Cela suggère qu'il serait possible de combiner les deux pour produire des lignées avec un niveau de tolérance encore accru. Certains fragments restent néanmoins de grande taille et il conviendrait de poursuivre la démarche pour tenter de les réduire un peu plus de façon à éviter certains effets délétères apportés par les donneurs exotiques.

Globalement, le projet DéLiBéRé-JNO a permis de produire une collection relativement étendue de génotypes d'intérêt pour l'introduction de nouvelles sources de tolérance à la JNO dans les programmes de sélection développés en France et en Europe.

Références bibliographiques

Rey MD, Martin AC, Higgins JD, Swarbreck D, Uauy C, Shaw P, Moore G (2017) Exploiting the ZIP4 homologue within the wheat Ph1 locus has identified two lines exhibiting homoeologous crossover in wheat-wild relative hybrids. *Mol Breed*, 37, 95.
<https://doi.org/10.1007/s11032-017-0700-2>

Rimbert H, Darrier B, Navarro J, Kitt J, Choulet F, Leveugle M, Duarte J, Rivière N, The International Wheat Genome Sequencing Consortium, The BreedWheat Consortium, Davassi A, Balfourier F, Le Paslier M-C, Bérard A, Brunel D, Feuillet C, Poncet C, Sourdille P, Paux E (2018) High

throughput SNP discovery and genotyping in hexaploid wheat. *PLoS One*, 13(1): e0186329
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186329>

Zhu T, Wang L, Rimbert H, Rodriguez JC, Deal KR, De Oliveira R, Choulet F, Keeble-Gagnere G, Tibbits J, Rogers J, Eversole K, Appels R, Gu YQ, Mascher M, Dvorak Jan, Luo MC (2021) Optical maps refine the bread wheat *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring genome assembly. *The Plant Journal* 107, 303-314.
<https://doi.org/10.1111/tpj.15289>

Annexe 1

P29				P961341											
Gen.	Nb. P	Tx. Inf.	Res.	Gen.	Nb. P	Tx. Inf.	Res.	Gen.	Nb. P	Tx. Inf.	Res.	Gen.	Nb. P	Tx. Inf.	Res.
90-3	7	100.00	1.19	108-4	8	62.50	1.04	164_1	8	62.50	1.00	203_1	8	100.00	1.54
90_1	8	100.00	1.45	108_1	8	75.00	0.72	173_1	8	75.00	0.53	203_2	7	100.00	1.69
90_2	8	87.50	1.39	109_1	8	50.00	0.81	177_1	8	100.00	0.62	204-3	8	100.00	1.84
91_2	7	100.00	1.08	110_1	8	100.00	0.74	177_2	8	87.50	0.74	204_1	7	100.00	1.41
92-3	8	100.00	1.58	110_2	8	100.00	0.87	180_2	7	100.00	0.74	205-4	8	100.00	1.09
92_1	8	100.00	1.39	112_2	8	100.00	0.74	181_2	8	100.00	1.40	205_1	8	100.00	1.51
92_2	7	100.00	1.32	116_1	7	85.71	0.59	187_1	8	100.00	1.47	206-3	8	100.00	1.66
93-3	8	100.00	1.18	117_2	7	100.00	0.94	187_2	7	100.00	0.78	206-4	8	100.00	1.57
95-4	8	100.00	1.44	121_1	8	62.50	0.61	188_2	8	100.00	0.60	206_1	8	100.00	1.13
95_1	8	100.00	1.30	128_1	8	50.00	0.47	190-4	7	100.00	0.89	208_2	8	50.00	1.05
95_2	8	100.00	1.23	130_1	8	100.00	1.34	190_1	8	87.50	0.75	209-4	8	75.00	1.74
96-4	8	100.00	1.13	131-4	8	75.00	0.90	190_2	8	87.50	0.47	210-4	8	100.00	1.79
96_1	8	100.00	1.36	131_2	6	33.33	0.49	192_1	8	100.00	1.33	210_2	8	100.00	1.73
97_2	6	100.00	1.60	137-4	8	75.00	1.08	194_1	8	100.00	0.81	211_1	8	87.50	1.40
99-4	8	100.00	0.86	139-3	5	60.00	0.68	195_1	8	87.50	0.90	212_1	8	100.00	1.26
99_2	8	100.00	0.97	142_2	8	87.50	0.71	196_2	8	75.00	0.70	213_2	8	100.00	1.71
101-3	8	100.00	1.64	143_2	7	71.43	0.78	198_1	8	75.00	0.55	215_2	8	100.00	1.28
101_1	8	100.00	1.31	149_1	8	87.50	0.57	199_2	8	100.00	1.17				
102_1	8	100.00	1.33	156-4	8	87.50	1.33	201_1	8	100.00	1.59				
103_2	7	85.71	1.26	156_1	8	87.50	0.69	202_1	8	100.00	1.45				
106_2	8	87.50	1.35	162-3	8	87.50	0.50	203-4	8	100.00	1.57				

Valeur de résistance à la JNO des individus recombinants des deux populations dérivées des croisements entre Cadenza et P29 ou P961341 obtenues en conditions contrôlées (JKI).

Gen. Numéro de l'individu ; Nb. P : nombre de plantes semées ; Tx. Inf. : taux d'infection ; Res. : valeur de résistance (plus la valeur est proche de 0, plus la lignée est résistante).

DéLiBéRé-JNO : Développement de Lignées de Blé adaptées et Résistantes à la Jaunisse Nanisante (JNO)

Edouard PENEZ^{1*}, Philippe MOMONT¹, Charles SNIJDERS¹, Anne-Charlotte LOMBART¹, Pascal GIRAudeau¹, Romain LAMERAND¹, Gemma MOLERO¹, Patrice SENELLART¹, Sylvie DUTRIEUX¹, Matthieu MICHEL¹, Raphaël VEQUAUD¹, Paul FORGEOIS², Charlotte THIBAUT², Torsten WILL³, Pierre SOURDILLE⁴

1 - CETAC - 7, rue du Coq HERON, 75030 Paris

2 - INSTITUT DE GENECH - rue de la libération, 59242 Genech

3 - JULIUS-KÜHN-INSTITUT - Erwin Baur Strasse 27, 06484 Quedlinburg, ALLEMAGNE

4 - INRAE - UMR 1095 Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales, 63100 Clermont-Ferrand

*Coordinateur : Edouard PENEZ, edouard.penez@asur-plantbreeding.com

Résumé

L'objectif global du projet DéLiBéRé-JNO était de développer des lignées de blé proches d'un matériel élite d'hiver employé dans les schémas de sélection Européens mais portant des introgressions issues d'espèces apparentées leur conférant un niveau de résistance à la JNO satisfaisant. Le projet repose sur la création et la caractérisation moléculaire et phénotypique d'une population de lignées recombinantes issues du croisement entre une variété proche de l'élite européenne (Cadenza) et mutée pour le gène *ph1*, et différentes variétés exotiques apportant une bonne tolérance à la JNO de par leurs introgressions issues de *Thinopyrum intermedium* et *Agropyron cristatum*, mais inadaptées aux pratiques culturales européennes. Le projet DéLiBéRé-JNO a permis de produire une collection relativement étendue de génotypes d'intérêt pour l'introduction de nouvelles sources de tolérance à la JNO dans les programmes de sélection développés en France et en Europe.

Introduction

La jaunisse nanisante de l'orge (JNO) est la plus grave maladie virale des céréales à paille. Causée par des virus (Barley yellow dwarf virus, BYDV) transmis exclusivement par pucerons (*Rhopalosiphum padi* et *Sitobion avenae* Fig.1), elle impacte fortement la production sans possibilité de lutter directement contre les virus. Par ailleurs, les recommandations du plan Ecophyto II (réduction de l'utilisation des pesticides) et l'interdiction des Néonicotinoïdes sur céréales à compter de l'automne 2018 imposent aux différents acteurs de la filière (de l'agriculteur à l'obteneur) la recherche de nouvelles solutions pour garantir la qualité sanitaire des cultures. De plus, le changement climatique induit également des hivers plus doux et des périodes de froid plus tardives qui se traduisent par une recrudescence des maladies virales. Cette virose impacte fortement la production céréalière et entraîne des pertes de rendements en moyenne de 30% dans les champs infectés qui peuvent, lors de fortes épidémies (campagne 2015-2016), atteindre plus de 80%.

Le développement de variétés résistantes/tolérantes à la JNO représente donc une priorité. L'introgression d'une résistance partielle à la JNO chez le blé à partir d'espèces apparentées s'accompagne de l'introduction de caractères délétères apportés par des allèles liés aux gènes d'intérêt (*linkage drag*). L'enjeu des programmes d'amélioration du blé pour la résistance à la JNO est donc de limiter la taille des introgressions de génomes d'espèces sauvages pour s'affranchir des conséquences du *linkage drag*.



Figure 1 : *Rhopalosiphum padi* et *Sitobion avenae*, vecteurs de la JNO.



Figure 2 : expérimentation JNO blé 2019/2020 à Aiguay (60)

WP1 : Caractérisation par phénotype en conditions aux champs et en conditions contrôlées des ressources génétiques :

En 2020, 109 accessions ont été évaluées aux champs avec un très bon niveau d'infection comme le montre la Figure 2, avec au centre de l'image, les ressources génétiques en évaluation, entourées d'orge présentant des symptômes caractéristiques de la JNO.

Le Tableau 1 reprend une partie des résultats obtenus sur 3 lieux d'expérimentation. Toute la gamme de résistance (1 à 9) a été observée avec un faible écart type entre les mesures. Pour consolider nos résultats, un panel de 6 variétés sensibles et de 6 variétés résistantes a été envoyé au JKI (Figure 3).

A partir de ces résultats, nous avons identifié les ressources génétiques (en gras dans le Tableau 1) à utiliser comme lignées parentales dans notre programme de croisements.

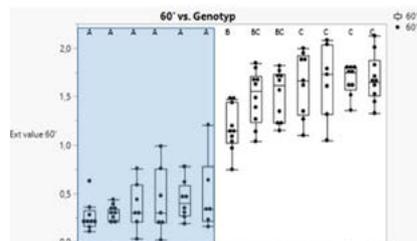


Figure 3: Représentation graphique du titre de virus après 7 jours d'inoculation en conditions contrôlées des 2 groupes des accessions. A gauche du graphique sur fond bleu, les accessions tolérantes et à droite les sensibles.

WP2 : Développer du matériel végétal original résistant à la JNO avec des introgressions de taille réduite en s'appuyant sur l'utilisation de lignées de blé ayant une aptitude à la recombinaison homéologue : Pour le développement des populations, les croisements font intervenir deux lignées dérivées de la variété Cadenza mutée par Éthyle-Méthane-Sulfonate (EMS) au niveau du gène *ph1*: Cadenza-0348 et Cadenza-1691 avec cinq lignées connues comme ayant un bon niveau de résistance à la JNO : Glover (*BYDV2*), Mackellar (*BYDV2*), P29 (*BYDV3*), P961341 (*BYDV3*), Zhong-4 (*BYDV4*). Par la suite, les individus hybrides ont été rétro-croisés par les individus Cadenza correspondant (génération BC1F1). Après, un tri moléculaire pour isoler les individus homozygotes mutants *ph1* et hétérozygotes au niveau des introgressions, ceux-ci ont été autofécondés pour générer une population en ségrégation (BC1F2). Les individus ont ensuite été conduits par autofécondations successives (*Single Seed Descent*) jusqu'en génération BC1F5.

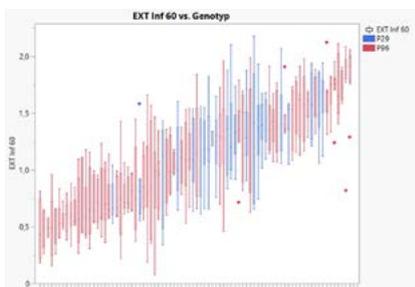


Figure 4 : Résultats obtenus après test ELISA, EXT Inf 60 : valeur de résistance (plus la valeur est proche de 0, plus la lignée est résistante) sur 80 individus recombinants BC1F5 issus de 2 sources P29 (en bleu) et P961341 (en rouge)

Génotype	Score 1	Écartype 1	Score 2	Écartype 2
AUS 1965	1.5	0.3	3.2	0.3
CP 147233b	1.8	0.4	2.0	0.7
ZHONG4	1.0	0.8	2.0	0.9
CP 147251b	2.6	1.1	2.5	1.8
CP 147236a	2.3	1.2	2.7	1.5
CP 147242c	1.8	0.5	2.7	1.8
QW14194d	2.3	1.2	3.0	1.7
AUS 6770	2.7	0.3	3.2	0.6
CP 147298e	1.7	1.2	3.2	2.0
CP 147249a	1.7	1.2	3.3	2.1
CP 147200b	2.3	1.5	3.5	2.5
CP 147212 a/b	2.2	0.8	3.7	2.0
CP 147296c	2.3	1.5	3.7	2.3
CP 147231b	2.3	1.5	3.8	3.3
CP 147294e	1.7	0.6	3.8	2.6
CP 147259a	3.2	2.1	4.5	3.1
AABRW	4.0	3.5	4.7	3.8
CP 147247b	4.7	0.6	5.3	0.3
P29	3.2	1.6	6.3	2.4
P961341	6.3	2.5	7.2	3.2
GLOVER	6.0	2.8	7.5	2.1
MACKELLAR	6.5	0.7	6.9	1.4
Talica 50	8.2	0.3	9.7	0.6
Tylen Yvan 2	8.2	1.8	8.7	0.6
FAC 33316	8.8	0.4	8.8	0.4
LEO 1929	8.5	0.3	8.3	0.3

Tableau 1 : Résultats obtenus après observations aux champs sur les lignées parentales (en gras) et sur les meilleures ressources génétiques testées par le CETAC - Moyennes sur 3 lieux - année 2019/20 (1 = tolérant / 9 = sensible)

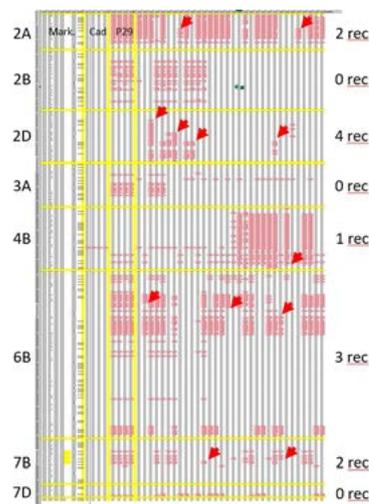


Figure 5 : Analyse des individus issus du croisement entre Cadenza muté pour *ph1* et P29 (BC1F5). Chaque ligne représente un marqueur SNP (colonne 1). Les marqueurs sont ordonnés selon leur position le long des chromosomes depuis le télomère du bras court en haut, jusqu'au télomère du bras long en bas. Cad. : génotype de Cadenza (colonne 2), P29 : génotype de P29 (colonne 3). Descendants : génotype des descendants (colonne 4). Les génotypes marqués en rouge (OTV) correspondent aux introgressions.

WP3 : Caractérisation phénotypique (inoculations calibrées au laboratoire et champs) et **moléculaire** (taille et position des introgressions, marqueurs diagnostics) du matériel créé.

A partir des 975 plantes BC1F5 développées, 80 individus recombinants ont été sélectionnés par rapport à leur profil génétique. Ils ont été ensuite phénotypés pour leur tolérance à la JNO en conditions contrôlées : 21 issus de la population Cadenza x P29 et 59 issus de la population Cadenza x P961341. La Figure 4 reprend les résultats obtenus en conditions contrôlées, des 80 individus recombinants issus de 2 sources (P29 et P961341).

Cernant le phénotype aux champs, malheureusement l'année 2023 ne nous a pas permis d'évaluer les individus (975 BC1F5) avec autant de fiabilité qu'en 2020. Le taux d'infection n'a pas été aussi élevé et seuls deux lieux sur six ont pu permettre de dégager une tendance de tolérance.

L'analyse des descendants issus des deux populations P29 (Figure 5) montre que 11 plantes sur les 32 recombinant dans les fragments introgressés de la lignée P29 (représentés en rouge sur la Figure 5, les recombinants sont identifiés par des flèches rouges également). Les fragments localisés sur les chromosomes 2B, 3A et 7D ne recombinent jamais.

Conclusion

L'objectif du projet était de développer des génotypes adaptés aux pratiques culturales européennes et tolérants au virus de la jaunisse nanisante de l'orge (BYDV) à partir de nouvelles ressources génétiques exotiques (P29, P961341, Mackellar, Glover, Zhong-4), en utilisant une approche originale faisant intervenir des mutants du gène *ph1* impliqué dans le contrôle de la recombinaison entre chromosomes apparentés (homéologues). De ce point de vue, nous avons montré qu'il était possible de réduire par cette voie la taille des introgressions en produisant plusieurs dizaines de lignées ayant des fragments plus courts que ceux initialement présents chez les parents donneurs exotiques. La stratégie est donc tout à fait adaptée pour produire un matériel original à partir de ressources génétiques apparentées au blé.



Fus'eye : Nouvel outil de phénotypage spectral au champ pour quantifier la Fusariose de l'épi sur céréales

Valérie CADOT^{1*}, Hadhami GARBOUGE^{1&14}, Nicolas MASCHER¹, Jorick CELARIER¹, Julien GARNIER¹, Frederic SERRE², Martin ECARNOT³, Pierre ROUMET³, Sylvie ROCHE², Jean Philippe MAIGNIEL¹, Hugo LAMMENS¹, Isabelle SERANDAT¹, Lama AL BASSIT², Gabriel BEUDIN⁴, Frederic MINARD⁴, Camille WABINSKI-DAUCHY⁵, Michael COCHARD⁵, Patrice SENELLART⁶, Sebastien CUVELIER⁷, Pascal GIRAUDEAU⁸, Carine ANDRE⁹, Auberi AVALLE¹⁰, Philippe LEREBOUR¹⁰, Sylvie DUTRIEZ¹¹, Jérôme AUZANNEAU¹², Stéphane PORREZ¹³, Christelle SABLAYROLLES¹³, David ROUSSEAU¹⁴

1 - GEVES - 49071 BEAUCOUZE & 49370 Erdre-en-Anjou

2 - INRAE UE PHACC & TSCF - 63000 Clermont-Ferrand

3 - INRAE UMR AGAP - 34000 Montpellier

4 - RAGT 2n - 28150 Louville-la-Chenard

5 - FLORIMOND DESPREZ Veuve & Fils - 32700 Lectoure

6 - KWS MOMONT - 28150 Allonnes

7 - DSV - 28140 Terminiers

8 - SECOBRA - 78580 Maule

9 - SYNGENTA - 28000 Chartres

10 - UNISIGMA - 60480 Froissy

11 - LIDEA - 28150 Reclainville

12 - AGRIOBTENTIONS - 78660 Orsonville

13 - ARVALIS - Station expérimentale, 91720 Boigneville & 31450 Montesquieu

14 - UNIVERSITE D'ANGERS IMORPHEN - 49000 Angers

*Coordinateur : Valérie CADOT, valerie.cadot@geves.fr

1 Introduction

La fusariose de l'épi causée par un complexe d'espèces dont la principale est *Fusarium graminearum*, est une maladie qui affecte de nombreuses céréales à paille en Europe. Elle entraîne une réduction du rendement de l'ordre de 0.2t/ha mais aussi la contamination des grains en fusariotoxines, se révélant nocive pour la santé humaine et animale. Pour limiter cette maladie et l'accumulation de ces toxines au champ, la réglementation CTPS encourage le développement de variétés résistantes à la fusariose de l'épi, en leur octroyant un bonus afin de faciliter leur inscription au catalogue français et défavorise les variétés sensibles en délivrant un malus. L'effort de sélection en blé tendre en France a permis une élévation du niveau de résistance à la fusariose des variétés inscrites en France depuis 2008, avec une baisse significative des variétés sensibles au profit des variétés intermédiaires et résistantes (Cadot et Maigniel, 2013).

Afin d'estimer le niveau de résistance à la fusariose des variétés de blé tendre, blé dur et triticale, lors du processus d'inscription, des estimations visuelles du taux d'épillets fusariés sont actuellement réalisées dans le réseau CTPS piloté par le GEVES, avec des essais inoculés au champ, incluant des expérimentateurs du GEVES, des sélectionneurs et des instituts techniques. Mais ces notations visuelles fastidieuses requièrent des experts qualifiés pour identifier et quantifier les symptômes correctement en les différenciant notamment de ceux générés par *Microdochium spp.*

Disposer d'un outil d'évaluation de la résistance fiable, reproductible, permettant du phénotypage à grande échelle est aujourd'hui indispensable pour identifier de potentielles sources de résistance et pour mieux

en comprendre les bases génétiques exploitables en sélection. La subjectivité des notations et/ou la présence d'autres pathogènes (Rouille, *Microdochium...*) peuvent rendre non robustes les notations visuelles.

Concernant le phénotypage au champ automatisé, très peu d'études étaient recensées lors du lancement du projet Fus'eye : citons l'imagerie RGB dans le visible sur blé tendre, mesurant le taux d'épillets fusariés (Serre *et al.*, 2015). Le protocole mis en œuvre est fondé sur l'analyse de photographies prises à partir d'un simple reflex numérique complémenté par des éclairages flash. Deux algorithmes ont été mis en œuvre. « SegEpis » permet d'isoler les seuls pixels appartenant aux épis et « SegFusa », basé sur la couleur, permet de calculer sur les photographies segmentées avec « SegEpis », la surface des épis présentant des symptômes de fusariose.

L'imagerie multi et hyperspectrale sont en plein essor. Elle résulte du couplage entre la spectroscopie et l'imagerie, génère une information en hyper cube dont la dimension spectrale dépend du nombre de longueurs d'ondes utilisées. Les expérimentations réalisées sur la fusariose du blé que ce soit sur grains (Cadot *et al.*, 2015 ; Jaillais *et al.*, 2015) ou sur épis (Serre *et al.*, 2015 ; Faure *et al.*, 2018) montrent qu'aujourd'hui, il apparaît envisageable de développer une méthodologie « plein champ » basée sur une approche multispectrale. En effet, les études de comparaison de l'imagerie en RVB et multispectrale pour la détection de la fusariose sur épi en parcelle ont montré l'avantage du multispectral en réduisant les faux positifs dans les parcelles saines, avec une capacité de calibration supérieure, une moindre sensibilité aux variations de couleur des génotypes et à la maturité des épis (Dammer *et al.*, 2011). Le choix des longueurs d'onde permet d'affiner les contrastes (Oldenburg *et al.*, 2015), ce qui peut

être extrêmement utile dans le cas de mélange de pathogènes. Beaucoup d'études ont utilisé l'imagerie hyperspectrale en laboratoire dans le proche infra-rouge sur épis ou sur grains mais le haut débit n'est pas forcément associable ; par exemple pour quantifier le taux de grains fusariés ou la teneur en DON (Tekle *et al.*, 2015), ou pour différencier *Fusarium subglutinans*, *F. proliferatum* et *F. verticillioides* sur grains de maïs (Williams *et al.*, 2012) ou sur blé (Delwiche *et al.*, 2011). Pour une détection précoce de la fusariose sur épi, une caméra hyperspectrale a été utilisée entre 400 et 1000 nm, avec des mesures au stade optimal, début du stade laitieux (BBCH 75), donnant un taux satisfaisant de bonne classification (87%). Mais l'utilisation de toutes les longueurs d'onde s'est avérée trop consommatrice en temps. Une autre méthode HBI (Derived Head Blight Index) a été testée, ciblant les longueurs d'ondes 550-560 nm et 665-675 nm mais les études doivent se poursuivre pour améliorer le taux de bonne classification (67%) (Bauriegel *et al.*, 2011).

L'objectif du projet Fus'eye est d'utiliser l'analyse spectrale pour définir un nouvel outil de phénotypage au champ pour évaluer la résistance variétale à la fusariose des épis, en blé tendre, blé dur et triticale, en utilisant une méthode non destructive permettant d'objectiver les notations sur épis et de mieux distinguer le FHB des autres pathogènes (Rouilles, *Microdochium*...).

Disposer d'un outil d'évaluation de la résistance fiable, reproductible, permettant du phénotypage à grande échelle est aujourd'hui indispensable pour identifier de potentielles sources de résistance et pour mieux en comprendre les bases génétiques exploitables en sélection.

2 Matériel et méthode

Le développement du phénotypage par imagerie spectrale de la fusariose s'est déroulé en 4 étapes indiquées **Figure 1, A à D**.

► 2.1 Sélection des longueurs d'onde à partir d'images hyperspectrales en laboratoire

Un des enjeux du programme Ecophyto IRIGAM (2015-2017) a consisté à évaluer la capacité de l'imagerie hyperspectrale pour quantifier la fusariose sur épis de blé tendre, blé dur et triticale afin de remplacer l'œil humain au champ de 2016 à 2018 (Faure *et al.*, 2018). Le projet FSOV Fus'eye piloté par le GEVES a ensuite pris le relais en 2018-2019.

Trois phases ont été effectuées pour valider les longueurs d'onde discriminantes de la fusariose sur épis :

Phase 1 : Création de la base de données hyperspectrale

L'acquisition des images hyperspectrale a été effectuée en laboratoire par le GEVES, en lien avec INRAE PHACC, sur le site de Montpellier à l'INRAE AGAP, par la caméra hyperspectrale NEO Hypspec VNIR. Cette caméra comprend 216 longueurs d'onde sur une plage spectrale allant de 400 nm à 1000 nm. En 2019, 532 images à 2 dates d'acquisition ont été acquises et se cumulent aux données préexistantes du projet IRIGAM (2016 et 2017) et au pré projet (2018), permettant de constituer une base de données de 1506 images hyperspectrales, avec 5 épis /image de 10 à 20 variétés

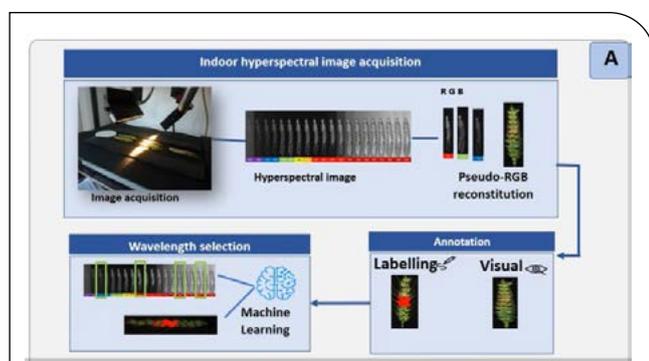


Figure 1A : Sélection des longueurs d'ondes discriminantes *Fusarium Section Discolor* en conditions contrôlées avec une caméra hyperspectrale.

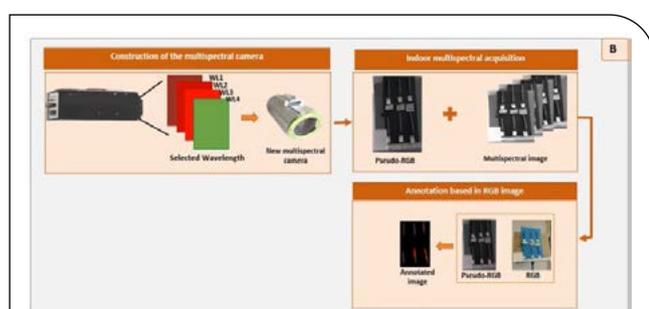


Figure 1B : Étude du transfert de ces longueurs d'onde dans une caméra multispectrale en laboratoire et étude de leurs spécificités.

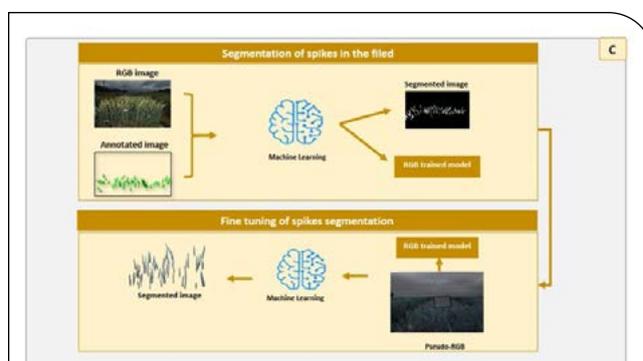


Figure 1C : Segmentation des épis au champ par deep learning.

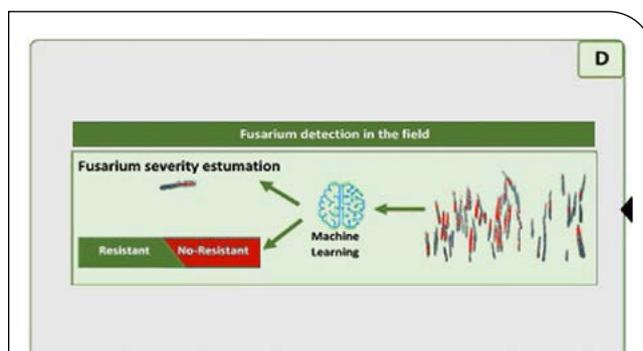


Figure 1D : Identification et quantification de la fusariose au champ par machine learning, avec conception d'un vecteur piéton.

pour les 3 espèces : blé tendre, blé dur et triticale. Ces images ont été acquises entre 240°C/j à 570°C/j après inoculation par *F. graminearum* dans 4 essais. Afin d'étudier aussi en 2019 l'impact de la congélation des épis sur la détection de la fusariose, la base a été découpée en 2, avec 50% pixels d'épis congelés et 50% d'épis non congelés pour les 3 espèces.

Données de référence

Des images RGB ont été reconstruites à partir des images hyperspectrales (**Photo 1**) pour servir de données de référence, selon 3 modalités :

- Notes visuelles données par 3 experts à partir des images RGB reconstruites, correspondant au taux de symptômes de fusariose présents sur chaque épi,
- Zones fusariées repérées et annotées visuellement par un expert sur chacune des images
- Analyses sanitaires par le GEVES- SNES en cas de doute pour confirmer la présence de *Fusarium Discolor* ou de *Microdochium*



Construction de données d'apprentissage

Une base d'apprentissage a été créée pour pouvoir appliquer des méthodes de sélection supervisées afin d'identifier les longueurs d'ondes les plus pertinentes. Trois bases d'apprentissage de 500 000 pixels ont été créées avec 50% des pixels appartenant à la classe « sain » et 50% des pixels appartenant à la classe « fusa ». Cinq épis ont été analysés pour chaque variété.

Phase 2 : Sélection des longueurs d'onde pour la discrimination de la fusariose (Figure 2)

A l'aide des données hyperspectrales des jeux de données respectifs, 4 méthodes de sélection supervisées ont été retenues pour sélectionner les longueurs d'onde les plus pertinentes pour détecter la fusariose sur épi :

1. Analyse discriminante pas à pas (ADPP) séquentielle
2. Covariance Selection (Covsel) :
3. Analyse discriminante pas à pas (ADPP) non séquentielle, avec un sous-ensemble de 2 longueurs d'onde sélectionnées.
4. Analyse discriminante pas à pas (ADPP) non séquentielle avec un sous-ensemble de 3 longueurs d'onde sélectionnées.

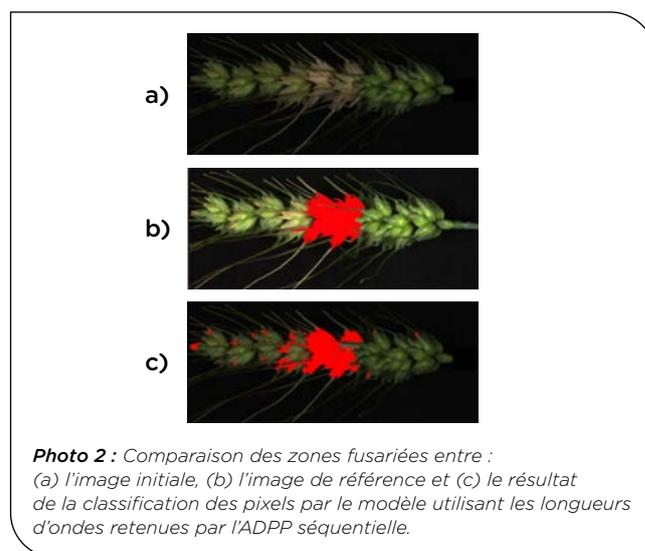
Ces analyses chimiométriques ont été réalisées sur 4 années de données pour le blé tendre, 3 années pour le blé dur et 2 années pour le triticale.



Phase 3. Validation des longueurs d'ondes sélectionnées pour discriminer la fusariose de l'épi

Pour chaque méthode de sélection, un modèle de classification utilisant uniquement les longueurs d'onde sélectionnées a été créé. Celui-ci permet de classer les pixels de chaque épi en deux classes sain/fusariés et de calculer le pourcentage de pixels appartenant à la classe fusariée. Ce taux de pixels fusariés a été comparé aux données de référence pour valider les longueurs d'onde retenues

Pour chaque épi, une comparaison de la zone fusariée prédite par les 4 modèles et la référence (annotations d'experts) a été réalisée à l'aide d'une matrice de confusion indiquant le bon positionnement de la zone fusariée détectée par analyse multispectrale par rapport à l'expertise visuelle, cad le taux moyen de bonne classification (**Photo 2**).



► 2.2 Validation en laboratoire du transfert des longueurs d'onde discriminant la fusariose dans une caméra multispectrale et étude de leurs spécificités

L'étude en laboratoire a pour objectif d'étudier la potentialité des capteurs sélectionnés à révéler uniquement les symptômes de Fusariose sur épis ainsi que la spécificité de ses longueurs d'onde par rapport à d'autres pathogènes (rouille jaune, *Microdochium sp.*).

Cahier des charges du prototype

Un cahier des charges a été rédigé par le GEVES, validé par tous les partenaires, pour sélectionner des caméras avec comme objectif final l'utilisation au champ, après validation de son aptitude à détecter la fusariose en laboratoire de façon spécifique. Parmi les spécifications requises, citons notamment :

- des longueurs d'ondes se rapprochant des 4 longueurs d'onde sélectionnées entre 400 et 1000 nm,
- une résolution assez fine pour bien différencier les épillets lors d'une acquisition transversale d'une ligne d'épi de 1 m de longueur, à une distance de 0.6 à 0.8 m,
- un système de prise de vue par Global Shutter pour éviter les problèmes de flou lié à un temps d'exposition trop long en cas de vent,
- une caméra devant s'affranchir des variations de lumière du soleil.

En complément, une enquête a été réalisée à l'INRAE PHACC pour définir les critères de choix d'une caméra par les expérimentateurs (**Figure 3**).

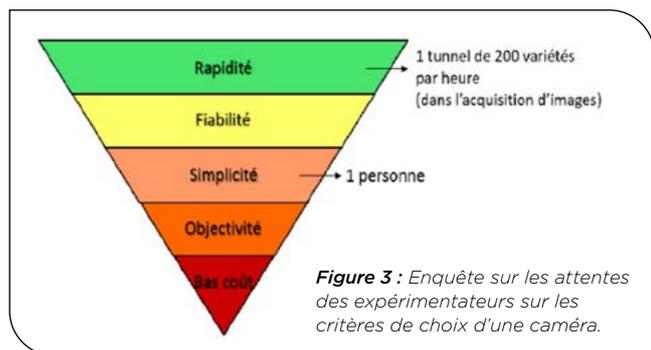


Figure 3 : Enquête sur les attentes des expérimentateurs sur les critères de choix d'une caméra.

Comparaison des performances des premières caméras sélectionnées

En 2019, une recherche de capteurs candidats a permis d'identifier 3 caméras pouvant répondre au cahier des charges ainsi qu'une caméra RGB :

- 2 caméras hyperspectrales pour valider l'approche spectre spécifique : Specim + Hinalea
- 1 capteur hyperspectral AQiT sensor Carbon Bee pour l'approche Deep Learning
- 1 capteur RGB Nikon qui représente la méthode de référence.

Un pré test comparatif de ces caméras a été réalisé à l'INRAE PHACC, en lien avec le GEVES, selon 3 facteurs :

- Distance d'acquisition et résolution de la caméra
- Vent pour tester la netteté
- Luminosité avec ou sans éclairage, avec différentes sources d'éclairage testées : xénon et halogène.

À la suite de cette pré-étude, la caméra hyperspectrale Hinalea et le capteur Aqit Sensor ont été retenus pour être testés au champ en juin 2019 dans 4 essais inoculés par *F. graminearum*. Mais la caméra Hinalea n'a pas pu être fournie à temps par ARDOP pour juin 2019, tandis que le capteur AQiT Sensor s'est avéré non performant (faible corrélation avec les annotations visuelles, problème d'images surexposées, seul le capteur RGB était exploitable). C'est pourquoi il a été décidé de construire une caméra multispectrale sur mesure.

Conception sur mesure de la caméra multispectrale CMS4

La caméra multispectrale CMS4 de Silios, de 4.2 MP a été conçue sur mesure pour contenir les 4 bandes spectrales sélectionnées. Sa résolution spatiale est de 30-50 nm. L'objectif était dans un premier temps de tester sa performance en laboratoire dans un environnement contrôlé en 2020, à partir d'épis prélevés dans les essais inoculés au champ, puis de valider ses performances directement au champ. Un objectif de



Photo 3 : Caméra CMS4. B : caméra avec le boîtier IP.

12 mm a été choisi pour avoir au moins 25 épis en ligne transversale à une distance d'acquisition de 75 cm. La caméra initialement petite et légère (170 g) a été alourdie par un boîtier IP de 1.4 Kg pour protéger la caméra contre la pluie et la poussière (**Photo 3**).

Dispositifs expérimentaux et matériel végétal

Des essais inoculés au champ par *Fusarium* section Discolor ont servi à collecter 6 épis par variété pour réaliser ensuite l'acquisition des images en labo afin de comparer la performance des caméras multispectrales et RGB.

De 2019 à 2020, 4 essais ont été inoculés sur 30 variétés, avec 10 variétés en blé tendre, 10 en blé dur et 10 en triticales :

- INRAE Clermont Ferrand (63) : pulvérisation de *F. graminearum*, souche FG10008 (chénotype DON, 15 aDON), à 1.10^6 spores/ml
- GEVES Anjouère (49) : pulvérisation en mélange de *F. graminearum*, souche FG10008 et *F. culmorum*, souche 09-03 = R964
- Arvalis Montesquieu (31) et Boigneville (91) : dépôt de cannes de maïs de *F. graminearum*
- Suite à des faibles pressions en fusariose des sites 63 et 31, un 5^{ème} site, Louville (28) de RAGT2n a été rajouté en 2020.

Facteurs testés et dispositif d'acquisition

Plusieurs expérimentations en labo ont été menées avec la caméra multispectrale CMS4 pour discriminer les épillets fusariés/épillets sains en lumière naturelle (2 sites : RAGT Louville 28 et GEVESD Anjouère 49) et en éclairage contrôlé (site INRAE Clermont Ferrand 63). 6 épis par variété à 2 dates de prélèvement ont été pris en photos par les caméras multispectrales CMS4 et RGB Nikon Reflex D750, 24 MP, en vue transversale.

Données de référence

Un protocole d'annotation de la fusariose a été élaborés par le GEVES à l'aide de Photoshop ou Gimp, en vue de disposer d'images de référence pour développer des algorithmes de détection de la fusariose.

- 546 épis ont été annotés sur les images en pseudo RGB de la CMS4, en transposant les symptômes de fusariose des images RGB prises avec la caméra Nikon (**Photo 4**).
- Des analyses sanitaires, réalisées par le GEVES SNES, ont confirmé les pathogènes présents sur épis, notamment en cas de de contamination naturelle par *Microdochium sp.*
- Des notations visuelles des épis fusariés ont également servi de référence.

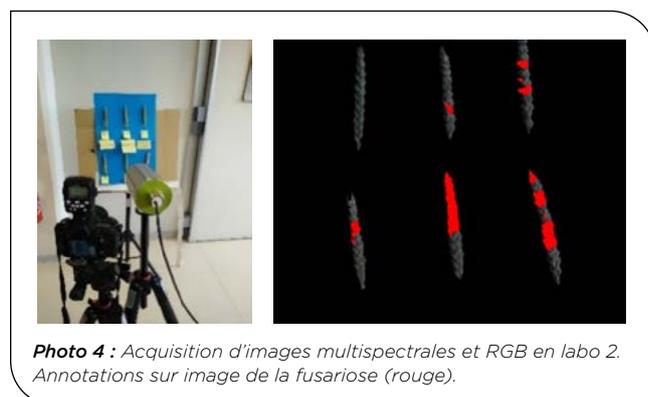


Photo 4 : Acquisition d'images multispectrales et RGB en labo 2. Annotations sur image de la fusariose (rouge).

Traitement des données pour discriminer les classes Fusa/sain

Pour construire un algorithme de classification de la fusariose sur épis, différents modèles basés sur le machine learning furent testés au GEVES, en utilisant l'application Classification Learner sur Matlab. L'analyse de la performance des modèles s'est appuyée sur les indicateurs de précision, rappel et justesse ainsi que sur les matrices de confusion.

- **Justesse (Accuracy) = $(VP+VN) / (VP+FP+VN+FN)$** : taux de pixels correctement prédits (sain ou fusa) par rapport à tous les pixels
- **Précision = $VP/(VP+FP)$** : taux de pixels fusariés bien prédits par rapport au taux total de pixels fusariés prédits
- **Rappel (Recall) = $VP/(VP+FN)$** : taux de pixels fusariés bien prédits par rapport aux taux de pixels fusariés de référence (annotés)

VP= Vrai Positif fusarié, VN= Vrai Négatif sain

Des prétraitements furent testés pour améliorer les performances des modèles. Une étude a aussi porté sur la détermination du taux de données d'entraînement par rapport au jeu de données complet, en faisant varier ce taux de 20 à 80% afin d'avoir les meilleurs indicateurs de justesse, rappel et précision.

Étude de la spécificité des longueurs d'onde

• Avec la caméra multispectrale CMS4 pour différencier la fusariose du microdochium

L'objectif de cette étude réalisée par le GEVES est de tester la spécificité de la caméra CMS4 pour différencier la fusariose du microdochium.

Matériel végétal

En 2020, les acquisitions d'images en labo ont porté sur le site de Louville (28), sur 22 épis issus de 14 variétés de blé tendre.

Acquisition et traitement des données

Des acquisitions d'images avec les caméras CMS4 et RGB ont eu lieu en laboratoire, selon le même protocole expliqué précédemment pour discriminer les classes Fusa/sain. Les annotations Fusa/micro se sont également appuyées sur les résultats des analyses sanitaires réalisées par le GEVES (Photo 5).



Photo 5 : Annotation sur images et analyses sanitaires du microdochium (en bleu) et de la fusariose (en rouge).

Les données d'entraînement ont été équilibrées sur la base de la classe la moins représentée. Une normalisation a été appliquée par rapport au spectralon et un prétraitement par flou gaussien, également. La réalisation du test a porté sur 50 tirages aléatoires des données équilibrées, représentant 60% du jeu de données entier.

Différents modèles de classification basés sur le machine learning ont été comparés en utilisant l'application Classification learner de Matlab pour discriminer les classes Fusa/micro, et en évaluant les performances des modèles selon les mêmes indicateurs que l'étude précédente pour discriminer les classes Fusa/sain.

• Avec un spectromètre à fibre optique ASD et la caméra hyperspectrale Neo Hypspx pour différencier Microdochium de Fusarium

L'objectif de cette étude réalisée par l'INRAE AGAP, en lien avec le stagiaire GEVES (ESIR Rennes) a été d'évaluer la potentialité de discriminer des épis contaminés par Fusarium ou par Microdochium en comparant 2 outils spectraux : la spectrométrie proche infrarouge et l'imagerie hyperspectrale.

Matériel végétal

En 2020, les échantillons provenaient de 3 sites (Montesquieu (31), Boigneville (91), Louville (28)), représentés par 3 espèces, Blé tendre, Blé dur, et Triticale, avec 10 variétés chacun. A 2 dates (450°j et 550°j après floraison), 6 épis ont été récoltés par variété, puis envoyés frais à l'UMR INRAE AGAP de Montpellier. Sur chaque épi, 2 épillets ont été prélevés pour être mesurés par spectrométrie infrarouge, puis stockés de manière individuelle dans un tube Eppendorf de 5 mL pour réaliser des analyses sanitaires au GEVES- SNES afin de vérifier la présence de Microdochium ou de Fusarium section Discolor sur chaque épillet.

Acquisition et Traitement des données

Les mesures spectrométriques ont été réalisées avec 2 instruments :

- Un spectromètre proche infrarouge ASD LabSpec 2500, mesurant la réflectance entre 400 et 2500 nm. 2 spectres sont moyennés.
- Une caméra hyperspectrale NEO Hypspx 1024 (Photo 6), permettant d'obtenir des images dont les pixels ont une dimension de 0,28 x 0,28 mm, et chaque pixel possède un spectre de 400 à 1000 nm.

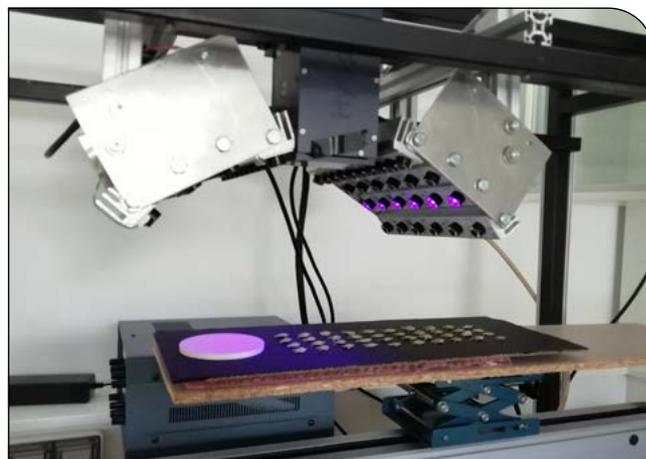


Photo 6 : Dispositif de prise d'image hyperspectrale sur épillets.

Grace au stage de 6 mois de Duncan Sourdin au GEVES (ESIR Rennes), nous disposons d'un outil qui permet d'extraire rapidement les spectres de tous les pixels d'un épi et d'en stocker la moyenne.

Les spectres et les données de référence issues des résultats de l'analyse sanitaire sont traités avec le package rnrirs du logiciel R. Les fonctions de ce package permettent de prétraiter les spectres et de mettre en œuvre les algorithmes de discrimination. Dans ce travail, les algorithmes de PLS-DA et PLS-DA locale (package rnrirs, logiciel R) sont comparés, pour la discrimination d'épis porteurs de Fusarium contre Microdochium.

► 2.3 Étude de la caméra multispectrale CMS4 au champ

Principe

Avec l'Université d'Angers, le GEVES a proposé 2 étapes pour quantifier la fusariose des épis (Figure 4)

La 1^{ère} étape consiste à développer un 1^{er} algorithme de segmentation des épis, en utilisant le deep learning. Cet algorithme a été développé par Hadhami Garbougé en thèse, à l'Université d'Angers, en lien avec le GEVES.

La 2^{ème} étape consiste à réutiliser ces épis segmentés pour développer un 2^{ème} algorithme pour différencier les pixels fusariés des pixels sains, basé sur le machine learning. Cet algorithme a été développé par le GEVES.

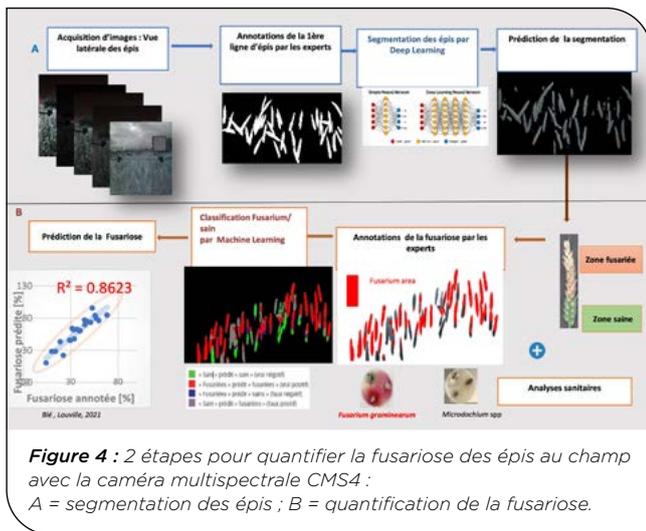


Figure 4 : 2 étapes pour quantifier la fusariose des épis au champ avec la caméra multispectrale CMS4 : A = segmentation des épis ; B = quantification de la fusariose.

2.3.1 Segmentation des épis au champ par deep learning

L'objectif de cette étude est de développer un algorithme segmentant la première ligne d'épis.

Acquisition des images

De 2019 à 2021, des acquisitions d'images RGB et multispectrales (Caméra CMS4) ont été réalisées au champ par le GEVES sur les 3 espèces, blé tendre, blé dur et triticale.

Segmentation manuelle

Le GEVES a développé un protocole et un tutoriel pour segmenter manuellement les épis de la 1^{ère} ligne sur Photoshop ou Gimp des images RGB et Pseudo RGB issues des images multispectrales. Ces images acquises de 2019 à 2022 ont servi de référence pour automatiser la segmentation des épis par l'Université d'Angers :

- en 2019 : 237 images RGB Nikon de 4 sites fusariose,
- en 2020 : 115 images RGB et 146 images de la caméra CMS4 de 3 sites,

- en 2021 : 182 images de la caméra CMS4 de 2 sites,
- en 2022 : 210 images de la caméra CMS4 de 7 sites.

Base de données : images RGB et multispectrales

Le réseau de neurones convolutionnel, U-Net a été utilisé pour segmenter les épis (Figure X). Afin d'augmenter le nombre d'images d'entraînement du modèle, la technique de Data augmentation par un Flip horizontal a été utilisée. Ainsi en 2019, 210 images RGB ont été obtenues en entraînement à partir de 105 images initiales et 250 images multispectrales en entraînement en 2021 (Tableau 1 et Figure 5).

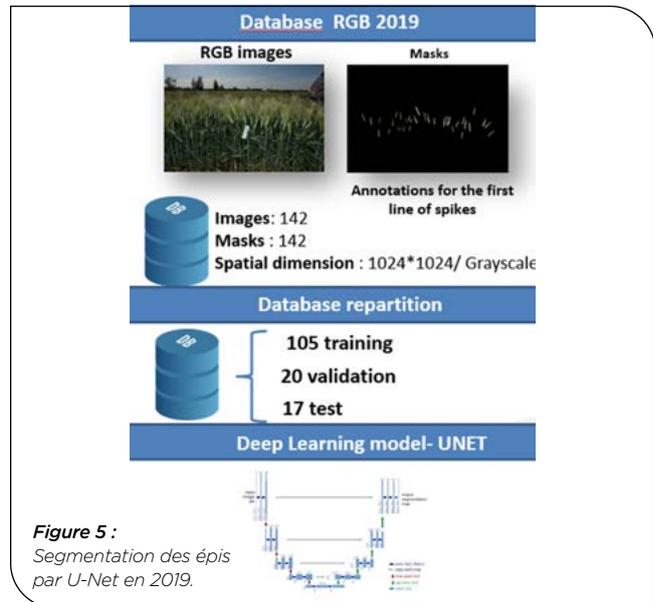


Figure 5 : Segmentation des épis par U-Net en 2019.

Base de données	2019 RGB	2021 MULTISPECTRALES
Entraînement (Data augmentation)	210 (105*2)	250 (125*2)
Validation	20	28
Test	17	30
Nb images totales	247	298

Tableau 1 : Nombre d'images RGB et multispectrales utilisées pour les modèles en 2019 et 2021.

L'évaluation des résultats a été calculée à l'aide de différents indicateurs de performance : le coefficient de Sørensen-Dice. Le processus de Fine tuning a été utilisé pour tirer parti des poids du modèle entraîné avec les images RGB pour l'entraînement d'un modèle multispectral.

2.3.2 Identification de la fusariose au champ par machine learning

Matériel végétal

Petit panel en 2021 :

Suite à une faible pression fusariose en 2020, dû à un manque d'irrigation en période covid, des études complémentaires ont été refaites en 2021 pour améliorer les modèles de la caméra multispectrale CMS4 au champ sur 105 images d'épis issus de 2 sites inoculés par *Fusarium section Discolor*, incluant des variétés en demande d'inscription, des témoins CTPS à la fusariose :

- GEVES Anjouère 49 : 75 images de variétés de blé tendre d'hiver, blé dur, triticale,
- RAGT2n Louville 28 : 30 images en blé tendre.

Grand panel en 2022 :

En 2022, la caméra CMS4 a été testée sur un plus large panel de variétés et de sites inoculés par *Fusarium* section *Discolor* afin de valider le modèle fusariose ou l'améliorer avec ces nouvelles données 2022. L'étude a porté sur blé tendre, blé dur et triticale, avec implantation d'essais inoculés de 100 variétés/site par 9 semenciers, intégrant principalement du blé tendre ; de l'ordre de 60 variétés, complété par environ 20 variétés en blé dur et triticale. Suite à des pressions insuffisantes de fusariose dans 3 lieux (Réclainville, Orsonville et Monbéqui), l'acquisition d'images a porté sur 7 lieux en blé tendre avec 415 images, 5 lieux en blé dur avec 102 images et 4 lieux en Triticale avec 86 images, soit un total de 603 images multispectrales et RGB (**Tableau 2**).

Semenciers	Sites (Dpt)	BTH	BDH	TRITI	Nb d'images
KWS Momont	Allonnes 28	58	20	20	98
Syngenta	Chartres 28	98	22	20	140
Unisigma	Froissy 60 essai Fusa	21	0	0	21
Unisigma	Froissy 60 essai Rouille Jaune	25	0	6	31
Florimond Desprez	Lectoure 32	63	20	20	103
Ragt2n	Louville 28	50	0	0	50
Secobra	Maule 78	62	21	0	83
DSV	Terminiers 28	38	19	20	77
Nb images/espèce		415	102	86	603

Tableau 2 : Nombre d'images multispectrales et RGB acquises dans 7 sites en 2022.

Dispositif d'acquisition au champ

Un protocole d'acquisition a été défini en 2021, indiquant comment faire la balance des blancs, régler l'exposition de l'image, codifier le nom des images afin de les exploiter dans les programmes ensuite. Ce protocole prend également en compte 2 manières de supporter les caméras : avec le vecteur trépied et avec le vecteur brouette. Dans les 2 cas, l'acquisition est assez rapide : après un pré-réglage de 10 minutes, les acquisitions groupées des images multispectrales et RGB prennent environ 2 minutes/variété.

L'acquisition des images a été réalisée avec 2 caméras : une caméra Sony RX0, prenant des images RGB, et la caméra multispectrale CMS4.

Le spectralon blanc en cas de nuage (255) ou gris en cas de soleil (127) permet de « normaliser » les valeurs des pixels, entre images. Il est incorporé à une position fixe de 75 cm des deux caméras dans les 2 vecteurs, représentant aussi la distance entre la caméra et la ligne d'épi d'intérêt (**Photo 7**).

En 2021, les acquisitions ont été faites entre 350°C et 550°C jour après inoc. Le vecteur Brouette Makita été utilisé à l'Anjouère et le vecteur trépied plus facilement déplaçable à Louville.

En 2022, le trépied a été utilisé en 2022 chez les semenciers.

Création des images de référence

- Annotation de la fusariose sur images
Comme en laboratoire, un protocole a été établi pour réaliser les annotations de la fusariose sur épis sur Photoshop ou Gimp, à partir des épis segmentés manuellement, en transposant les zones fusariées détectées sur les images RGB de la Sony sur les images CMS4. Un code couleur a été instauré pour les différents pathogènes (Fusariose, Microdochium, rouille jaune) ou les zones saines. En 2022, en blé tendre d'hiver, 77 images ont été annotées et en blé dur d'hiver, 43 images ont été annotées.

- Notations visuelles des expérimentateurs au champ
Deux types de référence ont pu être utilisées.

- Notation visuelle : note de 1 à 9, échelles différentes selon les expérimentateurs
- Le taux d'épillets fusariés sur 25 épis/parcelle

Un coefficient $R^2=0.71$ a été déterminé entre la notation visuelle et le % épillets fusariés par l'expérimentateur à Louville en 2022 sur blé tendre.

Modèles de machine learning pour identifier et quantifier la fusariose au champ

Les jeux de données de 2021 et 2022 ont été équilibrés entre pixels « sains » et fusariés.

Les données d'apprentissage représentent 60% de tous les pixels retenus, et 40% pour les données de test. L'application Classification Learner a été utilisée pour créer et comparer les performances de différents modèles de classification de machine learning sur Matlab, à partir de différents jeux d'entraînement. Les indicateurs de justesse, rappel et précision ont été calculés, à parti des résultats de la matrice de confusion.

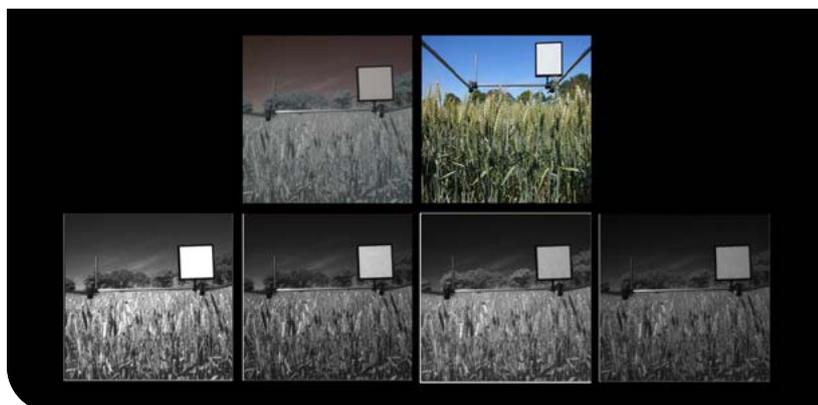
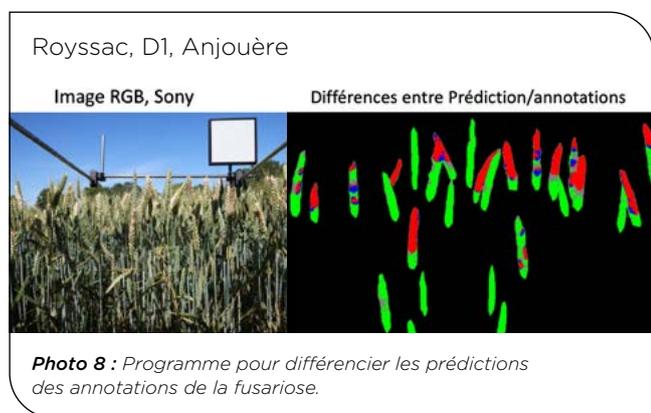


Photo 7 : Exemple d'images acquises au champ avec les caméras RGB et CMS4.

Le GEVES a amélioré Les programmes de machine learning créés en 2020 sous Matlab pour différencier les pixels fusariés des pixels sains, en créant **3 programmes spécifiques** :

- **Le premier programme Matlab** a été développé avec les 3 meilleurs modèles sélectionnés : Fine Gaussian SVM, Coarse KNN, et Bagged trees pour comparer leurs performances.
- **Le 2^{ème} programme Matlab** a été développé pour visualiser et prédire les zones fusariées et saines des épis et calculer une matrice de confusion par rapport aux annotations de référence. On obtient ainsi des images où on peut facilement distinguer les vraies positifs et négatifs pour les zones fusariées et saines et les faux positifs et négatifs (**Photo 8**).
 - **Pixels verts (VN)** : Sains prédit Sains
 - **Pixels rouges (VP)** : Fusariés prédit Fusariés
 - **Pixels bleus (FN)** : Fusariés prédit Sains
 - **Pixels gris (FP)** : Sains prédit Fusariés



- **Le 3^{ème} programme Matlab établit un classement de la résistance des variétés**, basé sur la prédiction de % de pixels fusariés, par comparaison avec le % pixels fusariés annotés, avec une sortie sur un fichier Excel, afin d'étudier la qualité de prédiction (R^2) du classement de la résistance variétale par imagerie multispectrale par rapport aux données de référence (annotation sur images ou notations visuelles).

► 2.4 Construction de vecteurs kit piéton support des caméras multispectrales et RGB au champ

Un cahier des charges du vecteur piéton a été défini et validé par les partenaires du projet. Il doit être maniable par une personne, et supporter les capteurs, l'ordinateur, les batteries, le spectralon ainsi que les batteries alimentant l'automatisation du déplacement vertical du capteur. La construction a été menée par l'INRAE PHACC et l'INRAE ex IRSTEA spécialisée dans la robotique agricole, en lien avec le GEVES.

3 Résultats

► 3.1 Sélection des longueurs d'ondes optimales pour la détection de Fusarium Section Discolor à partir d'images hyperspectrales en laboratoire

Sélection des longueurs d'ondes les plus pertinentes pour la discrimination de la fusariose de l'épi

Selon la méthode de sélection utilisée (ADPP séquentielle ou non séquentielle, Covsel), deux à cinq longueurs d'ondes ont été retenues en blé tendre (**Figure 6**) mais aussi en blé dur et triticale (**Figure 7**). Pour chaque sous-ensemble, les longueurs d'onde sélectionnées sont similaires, avec 3 appartenant au visible et la 4^{ème} au proche infrarouge. Elles reflètent les variations de teneur en chlorophylle et en eau entre les zones saines et fusariées. De plus, la sélection des longueurs d'ondes à partir des différentes bases d'apprentissage a permis de mettre en avant une similarité des longueurs d'ondes retenues entre les années.

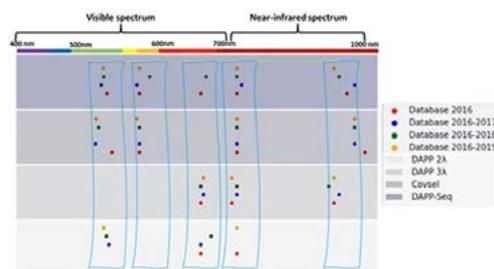


Figure 6 : Sélection des longueurs d'onde identifiant la fusariose pour le blé tendre, à partir d'une base d'images hyperspectrales enrichies de 2016 à 2019, et selon 4 méthodes supervisées.

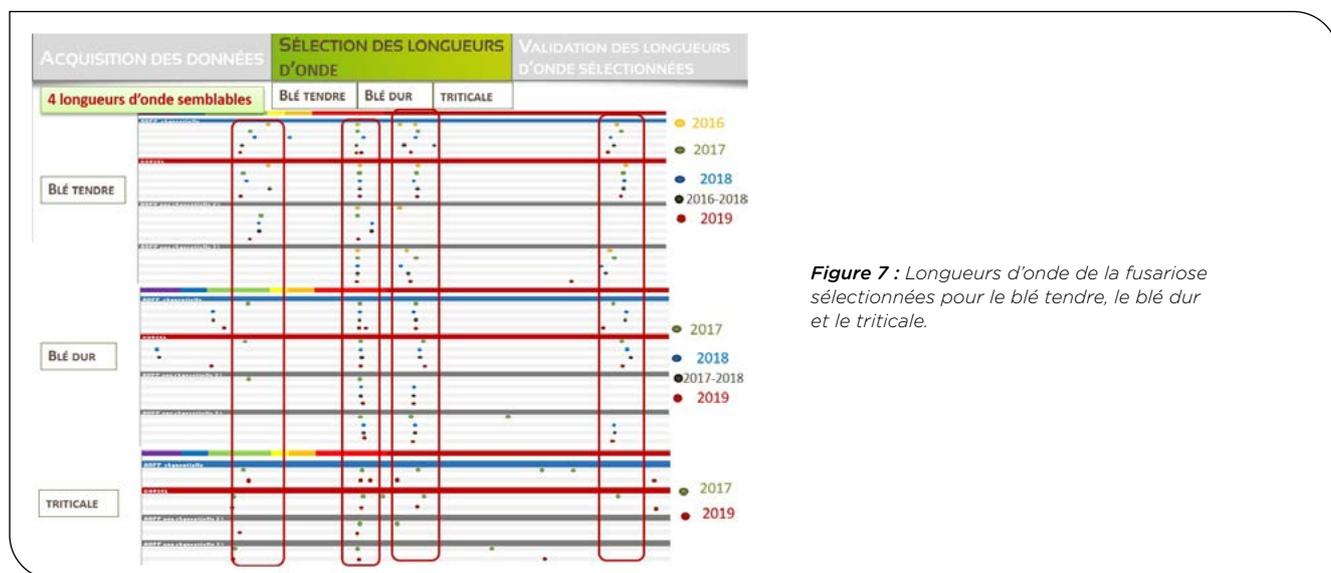
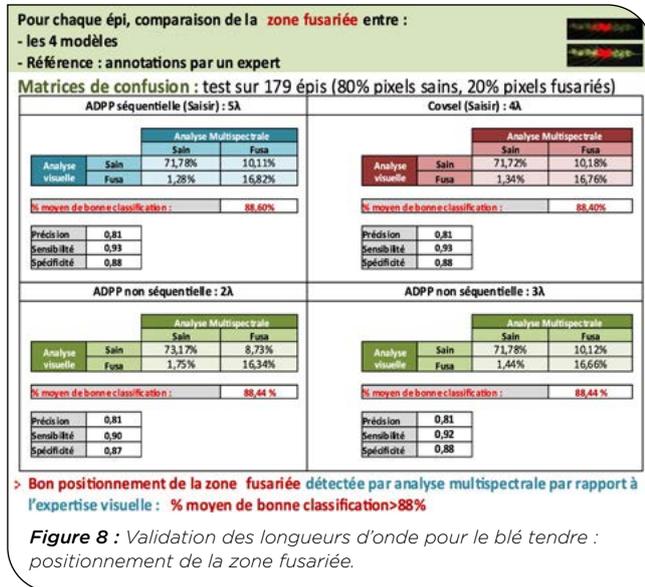


Figure 7 : Longueurs d'onde de la fusariose sélectionnées pour le blé tendre, le blé dur et le triticale.

Validation des longueurs d'ondes sélectionnées

Le pourcentage de bonne classification des zones fusariées détectées par analyse multispectrale par rapport à l'expertise visuelle est élevé pour les 3 espèces, d'après le calcul issu des matrices de confusion :

- **Blé tendre** : > 88 % pour les 4 modèles (**Figure 8**)
- **Blé dur** : > 80 % pour les 4 modèles ?
- **Triticale** : > 87 % pour 3 modèles (sauf ADPP 2λ)



Pour chaque épi, le taux de surface fusariée obtenu par les différents modèles a également été comparé aux notations de référence par expertise visuelle, montrant une bonne prédiction du taux de surface fusariée, pour les 3 espèces :

- Blé tendre : 4 méthodes validées, avec $R^2 > 0,85$ (**Tableau 3**)
- Blé dur : 3 méthodes validées sur 4 ; la méthode ADPP 2λ n'a pas été retenue, avec $R^2_{moy} > 0,80$.
- Triticale : 3 méthodes validées sur 4 ; la méthode ADPP 2λ n'a pas été retenue, avec $R^2 > 0,76$.

R ²	Variables	Expert 1: S	Expert 2: G	Expert 3: M	ADPP Saisir	Covsel	ADPP 3λ	ADPP 2λ
		179 images	Expert 1:5	1	0,95	0,97	0,85	0,84
	Expert 2: G		1	0,96	0,85	0,85	0,85	0,87
	Expert 3: M			1	0,88	0,87	0,87	0,89
	ADPP Saisir				1	1,00	1,00	0,99
	Covsel					1	1,00	0,99
	ADPP 3 A						1	0,98
	ADPP 2 A							1

Tableau 3 : Blé tendre : Coefficient de détermination entre le taux de surface fusariée obtenu par les modèles supervisés et les expertises visuelles des données 2019, avec les longueurs d'onde sélectionnées en 2019.

En conclusion, quatre longueurs d'onde ont été validées allant du visible au proche infra-rouge pour les 3 espèces pour discriminer la fusariose, avec pour objectif leur transfert dans une caméra multispectrale, plus économe en termes de stockage d'images qu'une caméra hyperspectrale.

Étude de l'effet de la congélation sur l'identification des longueurs d'onde identifiant la fusariose des épis

En blé tendre, nous avons montré que les longueurs d'onde identifiées à partir des données 2016-2018 utilisées sur la base de données 2019 comprenant 560 images hyperspectrales, avec 50% pixel d'épis congelés et 50% d'épis non congelés, ont permis la reconstitution des zones fusariées, aussi bien sur épis congelés qu'épis non congelés. **Il n'y a donc pas d'effet de la congélation sur les longueurs d'onde identifiant la fusariose**, ce qui permettra une plus grande souplesse temporelle pour réaliser des acquisitions hyperspectrales dans le futur.

Identification des longueurs d'onde différenciant Microdochium/Fusariose

Si une bonne prédiction des zones saines et fusariées a été montrée, une confusion de l'ordre de 16% demeure pour différencier les zones avec du *Microdochium* ou de la fusariose dans les essais inoculés fusariose du 49 et 63 ; avec une sous-estimation du taux de mal classé en *Microdochium* car le taux de zones saines est élevé (80%).

3.2 Validation en laboratoire du transfert des 4 longueurs d'onde discriminant la fusariose dans la caméra multispectrale CMS4

Parmi les différentes expérimentations en labo, nous ne présenterons que celles qui ont apporté des conclusions intéressantes.

3.2.1 Différenciation des pixels fusariés/sains

Concernant le jeu de données d'épis de blé tendre combinant annotation visuelle confirmée par analyse sanitaire des 2 sites GEVES 49 et RAGT 28, avec une variabilité de précocité, le modèle SVM Fine Gaussian est celui qui a donné les meilleures performances pour les données d'entraînement, d'après les indicateurs suivants :

- Justesse : 65.2%
- Précision : 63.3%
- Rappel : 56.1%

La meilleure prédiction de la fusariose en test s'avère être celle qui utilise un jeu d'entraînement représentant 60% des données (**Tableau 4**), avec 70% en précision et justesse et 71% en rappel.

Quantité de données de l'entraînement	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%
Précision	64% ± 4%	67% ± 4%	73% ± 4%	63% ± 4%	70% ± 4%	66% ± 4%	70% ± 4%
Rappel	65% ± 5%	72% ± 5%	71% ± 3%	65% ± 5%	71% ± 3%	67% ± 3%	72% ± 3%
Justesse	65% ± 2%	69% ± 2%	69% ± 3%	66% ± 2%	70% ± 2%	68% ± 2%	70% ± 3%

Tableau 4 : Prédiction de la fusariose sur des données en test, selon le taux de données d'entraînement.

Des prétraitements ont été effectués pour améliorer les performances des modèles ; notamment, la normalisation par rapport au spectralon et le flou gaussien pour réduire des problèmes de faux positifs dans les interstices entre épillets lors de la reconstruction des images prédites. En

équilibrant les données d'entraînement sur la base de la classe la moins représentée, les résultats ont également été fiabilisés.

- Un modèle entraîné sur deux dates de notation et plusieurs sites s'avère plus robuste qu'un modèle entraîné sur une seule date, et un seul site.
- Les modèles de prédiction de la fusariose ont été améliorés par des pré-traitements de normalisation par rapport au spectralon (référentiel blanc), de flou gaussien pour enlever les faux positifs des interstices, et d'équilibrage des classes (sain/fusa, sites, dates) du jeu de données d'entraînement pour éviter une surestimation des performances de la classe majoritaire (la classe saine).
- Les meilleurs résultats pour discriminer les zones fusariées /saines sur épis ont obtenus en utilisant les résultats de l'analyse sanitaire combinés aux annotations visuelles plutôt que les annotations visuelles seules.

3.2.2 Étude de la spécificité des longueurs d'onde par rapport à d'autres pathogènes sur épis

• Avec la caméra multispectrale CMS4 pour différencier la fusariose du Microdochium

Dans l'expérimentation pour différencier *Fusarium*/ *Microdochium* sp., basée sur l'annotation sur images confirmée par analyses sanitaire, en éclairage naturelle en labo, les résultats de test montrent que les 2 meilleurs modèles pour discriminer *Fusarium*/ *Microdochium* sont le **Weighted KNN** et le **Fine Gaussian SVM** (Figure 9).

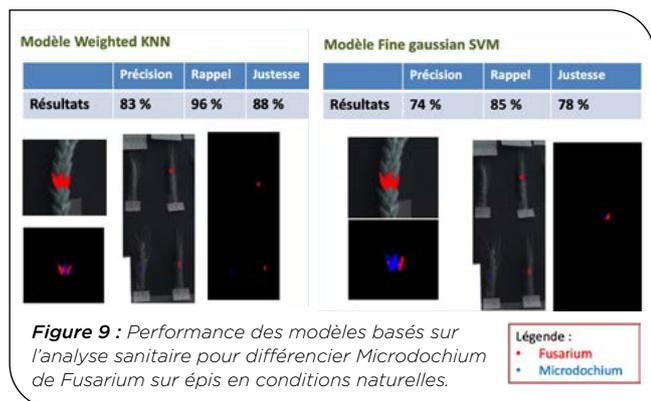


Figure 9 : Performance des modèles basés sur l'analyse sanitaire pour différencier *Microdochium* de *Fusarium* sur épis en conditions naturelles.

Ces résultats prometteurs sont néanmoins à prendre avec précaution car réalisés sur un faible nombre d'épis (22 épis de 14 variétés). Ils devront être confirmés sur un plus grand panel.

• Avec un spectromètre à fibre optique ASD et la caméra hyperspectrale NeoHypex pour différencier *Microdochium* de *Fusarium*

Discrimination *Fusarium* / *Microdochium* par Spectromètre proche infrarouge ASD

Puisqu'il s'agit de montrer une faisabilité, la stratégie choisie est celle d'utiliser l'ensemble des données en validation croisée. Les résultats présentés sont donc les erreurs de prédiction en validation (dans la validation croisée) en fonction du nombre de composantes du modèle PLS (présenté entre parenthèses). Chaque validation croisée est répétée, donc une courbe d'un graphique est une des répétitions. En prenant l'ensemble des données, issues des tous les sites,

toutes les dates et toutes les variétés, la discrimination *Fusarium* / *Microdochium* est faite avec une erreur de 32% (15 composantes) avec la PLS-DA, contre 30% (9 composantes) avec la PLS-DA locale (Figure 10). Dans la suite des résultats, la PLS-DA locale donnera systématiquement des résultats au moins aussi bons que la PLS-DA, qui ne sera donc plus montrée. Dans les figures suivantes, l'erreur de prédiction (errp) affichée entre 0 et 1 correspond à un pourcentage entre 0 et 100.

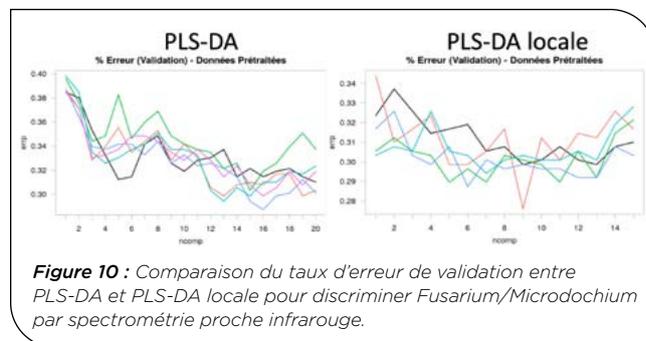


Figure 10 : Comparaison du taux d'erreur de validation entre PLS-DA et PLS-DA locale pour discriminer *Fusarium*/*Microdochium* par spectrométrie proche infrarouge.

Le résultat global a été comparé à des modèles similaires, qui ne conservent qu'un seul niveau d'un facteur, notamment le lieu et l'espèce.

Facteur lieu : selon la pression de *Microdochium*

Il est intéressant de voir que le taux d'erreur décroît avec la pression *Microdochium* présente sur le site. Ainsi, le site 31, présentant une pression *Microdochium* très faible présente une erreur plus grande (supérieur à 45%) que le site 91 à pression moyenne (erreur de l'ordre de 29%), lui-même ayant une erreur supérieure au site 28, à forte pression (erreurs de l'ordre de 22,7%) (Figure 11).

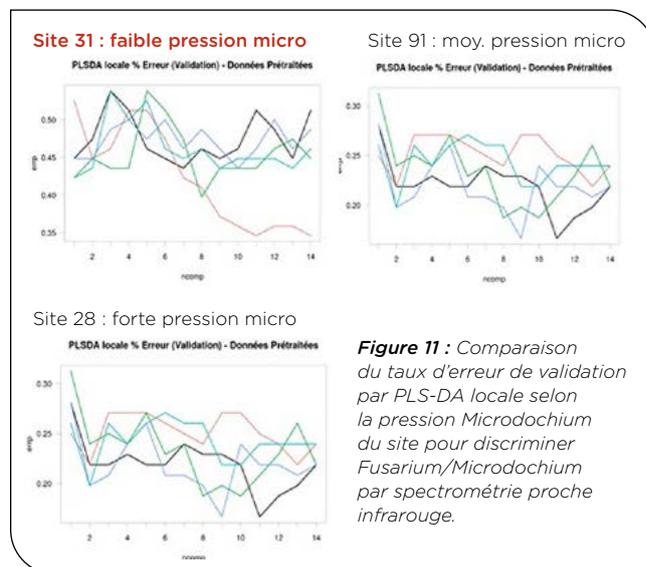


Figure 11 : Comparaison du taux d'erreur de validation par PLS-DA locale selon la pression *Microdochium* du site pour discriminer *Fusarium*/*Microdochium* par spectrométrie proche infrarouge.

Facteur Espèce

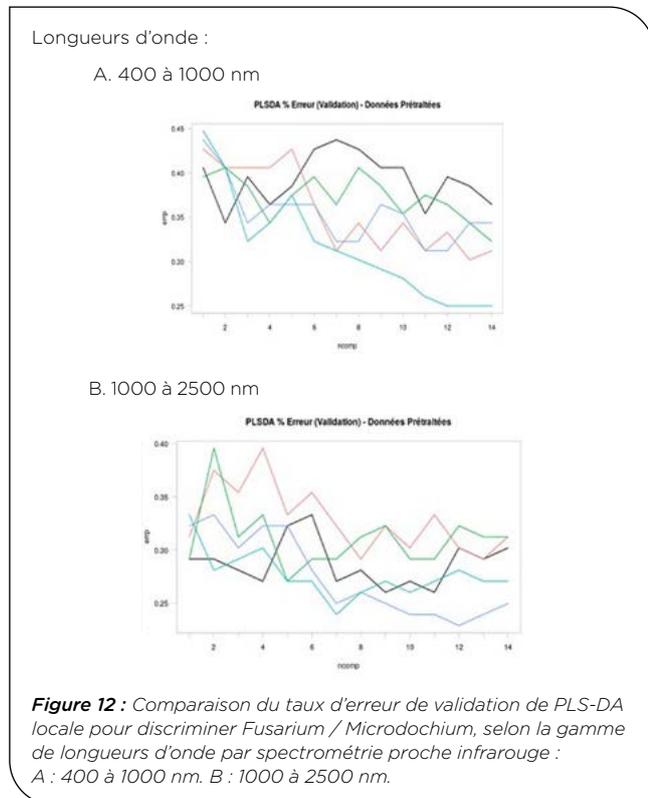
La validation est meilleure pour le modèle n'incluant que le blé tendre. Le moins bon modèle est obtenu pour le triticale (Tableau 5).

Blé tendre d'hiver	Blé dur d'hiver	Triticale
28,1% (14)	33,2% (2)	36,1% (13)

Tableau 5 : Erreur du taux de prédiction *Microdochium*/*Fusarium* selon l'espèce par spectrométrie proche infrarouge.

Dans l'objectif, de mieux comprendre le comportement du modèle de discrimination, et d'envisager l'utilisation d'un nombre limité de longueurs d'onde, il est important d'analyser les zones du spectre qui ont le plus d'influence sur le modèle.

Pour cela, le même modèle a été réalisé, à partir des données du site 28 à forte pression, en ne conservant que les longueurs d'onde de 400 à 1000nm, ou de 1000 à 2500 nm.



Il est à noter que, dans la zone 400-1000nm, il existe quelques pics, correspondant à l'absorption des pigments (chlorophylle, anthocyane, caroténoïdes), mais les pics sont plus nombreux et plus larges dans la gamme 1000-2500nm, où l'on retrouve l'absorption des molécules contenant des liaisons -OH (dont l'eau), et -NH₂ (dont les protéines). L'erreur de validation est 32,8% pour la gamme 400-1000 nm, et de 26,9% pour la gamme 1000-2500nm (**Figure 12**).

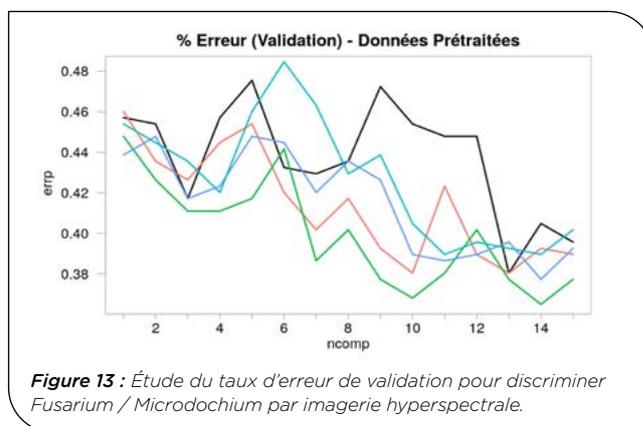
La gamme 1000-2500 nm semble plus informative pour la discrimination *Fusarium* / *Microdochium* mais le modèle reste meilleur en utilisant l'ensemble du spectre

Filtrage des épis peu attequés pour améliorer la validation.

Afin de ne garder que les épis où la présence du champignon est forte, seuls sont conservés les épis dont les 2 épis sont contaminés par le même champignon. L'erreur de validation devient, pour le jeu de données global, 22,1% contre 30% sans ce filtrage. Cette amélioration ne provient pas de l'effet de baisse de l'effectif : Un tirage aléatoire du même nombre d'échantillons que ce filtre change peu l'erreur de validation (30,9%). En appliquant cette contrainte aux échantillons du Lieu 28, l'erreur devient 15,1% et 23,7% pour le lieu 91.

Discrimination *Fusarium* / *Microdochium* par imagerie hyperspectrale

Les mêmes conditions ont été appliquées en utilisant les spectres issus de la caméra hyperspectrale (NEO Hypspec VNIR-1800), avec 216 longueurs d'onde, allant de 400 à 1000 nm (**Figure 13**).



Le modèle réalisé sur blé tendre d'hiver donne un pourcentage d'erreur légèrement plus élevé, qu'en blé dur et triticale (**Tableau 6**).

Blé tendre d'hiver	Blé dur d'hiver	Triticale
39,5% (1)	35,9% (3)	36,4%

Tableau 6 : Erreur du taux de prédiction *Microdochium/fusarium* selon l'espèce par imagerie hyperspectrale.

La discrimination en PLS-DA locale sur l'ensemble des données donne une erreur de 37,7%. La stratégie de ne conserver que les épis dont les 2 épis sont contaminés par le même champignon a un effet très fort sur les données de caméra hyperspectrale. L'erreur de validation devient, pour le jeu de données global, 21,9%.

En conclusion, les modèles incluant l'ensemble des données, aussi bien avec des mesures de spectrométrie que l'imagerie hyperspectrale, donnent des résultats mitigés, avec des pourcentages d'erreur supérieurs à 30% pour la discrimination de *Fusarium* contre *Microdochium*. Cependant, cette étude montre des résultats encourageants signifiant qu'il est possible d'obtenir une information capable de faire cette discrimination dans certaines conditions. Avec le spectromètre ASD, et en élaborant un modèle sur les données du lieu 28, on obtient une erreur inférieure à 23%. De plus, en ne conservant que les épis où la sévérité de l'attaque du champignon est importante, cette erreur descend à 15%, soit 85% de bonne prédiction *Fusarium*/*Microdochium*.

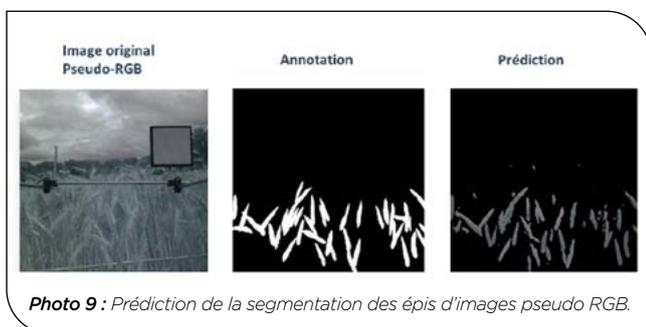
Au final, la gamme spectrale 1000-2500 nm s'avère la plus informative pour la discrimination *Microdochium*/*Fusarium*, même si, le fait de rajouter la gamme 400-1000 nm améliore la validation du modèle.

Enfin, les mesures réalisées avec la caméra hyperspectrale peuvent également permettre d'obtenir une bonne discrimination *Fusarium*/*Microdochium* puisque des pourcentages d'erreur de 21,9% ont été obtenus dans le cas des épis fortement contaminés.

► 3.3 Validation de la caméra multispectrale au champ

3.3.1 Segmentation des épis au champ par deep learning

La performance de 3 modèles a été évaluée par l'Université d'Angers en utilisant U-net pour segmenter les épis de la 1^{ère} ligne, par comparaison avec la segmentation manuelle (Photo 9).



Pour bénéficier des avantages du premier modèle de segmentation basé sur les images RGB, les poids finaux de ce modèle ont été transférés comme poids d'entrée pour le nouveau modèle pour les images pseudo-RGB de la caméra multispectrale. Enfin, un autre modèle a été développé en utilisant directement les images pseudo-RGB. Le **tableau 7** illustre les performances de ces modèles par comparaison de l'indice de Dice, montrant de meilleures performances pour le modèle avec Fine tuning.

	Training	Validation	Test
RGB	0.83 ± 0.03	0.79 ± 0.02	0.75 ± 0.02
Pseudo-RGB	0.78 ± 0.01	0.75 ± 0.02	0.71 ± 0.02
Fine tuning	0.88 ± 0.03	0.84 ± 0.02	0.79 ± 0.03

Tableau 7 : Comparaison du coefficient de Dice des 3 modèles de segmentation des épis de blé sur les images acquises en plein champ.

Afin d'étudier l'impact du nombre d'images utilisées sur l'apprentissage par transfert, plusieurs modèles ont été testés en utilisant un nombre différent d'images pour l'entraînement et en traçant la courbe du coefficient de Dice en fonction du nombre d'images utilisées (**Figure 14**). La figure 13 nous indique une stabilité de l'indice de Dice à partir de 100 images multispectrales pour l'entraînement.

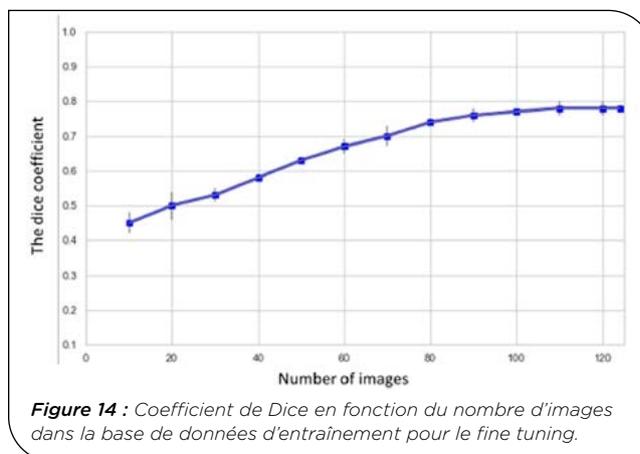


Figure 14 : Coefficient de Dice en fonction du nombre d'images dans la base de données d'entraînement pour le fine tuning.

En 2022, 210 images ont été segmentées manuellement, avec 30 images par lieu, dont 10 images par espèce (BTH, BDH, Triticale) ou en ajoutant plus d'images BTH en cas d'absence BDH ou Triticale.

6 modèles ont été testés :

- 4 modèles avec données 2021
- 2 modèles avec données 2021-2022

Les résultats des meilleurs modèles selon l'indice de Dice sont le modèle 1 pour le blé tendre et le modèle 6 pour le blé dur et le triticale. Mais l'indice de Dice minimum étant parfois à 0 indique la nécessité de revoir les images par site et espèce pour expliquer ces variations (**Tableau 8**). Il est important que le protocole d'acquisition soit bien respecté.

Espèces	Sites	Données entraînement 2021												Données entraînement 2021-22					
		Modèle 1			Modèle 2			Modèle 3			Modèle 4			Modèle 5			Modèle 6		
		Moy.	Min	Max	Moy.	Min	Max	Moy.	Min	Max	Moy.	Min	Max	Moy.	Min	Max	Moy.	Min	Max
BDH	Allonnes	0.46	0.25	0.69	0.36	0.14	0.54	0.34	0.14	0.59	0.39	0.18	0.59	0.34	0.22	0.45	0.44	0.28	0.57
	Chartres	0.25	0.00	0.46	0.20	0.02	0.37	0.09	0.03	0.17	0.16	0.03	0.36	0.44	0.11	0.65	0.53	0.10	0.68
	Lectoure	0.82	0.29	0.94	0.73	0.40	0.82	0.72	0.37	0.82	0.69	0.20	0.82	0.56	0.38	0.72	0.67	0.37	0.80
	Maule	0.59	0.15	0.88	0.41	0.25	0.67	0.38	0.12	0.53	0.43	0.32	0.66	0.44	0.26	0.58	0.58	0.43	0.71
	Terminiers	0.86	0.37	0.98	0.63	0.40	0.79	0.65	0.42	0.82	0.66	0.48	0.85	0.45	0.36	0.65	0.52	0.42	0.72
	Moy	0.54	0.19	0.74	0.44	0.22	0.61	0.39	0.18	0.54	0.44	0.21	0.63	0.48	0.31	0.63	0.57	0.36	0.70
BTH	Allonnes	0.27	0.10	0.48	0.32	0.14	0.49	0.16	0.03	0.31	0.30	0.06	0.48	0.64	0.54	0.71	0.66	0.57	0.72
	Chartres	0.87	0.83	0.91	0.75	0.69	0.80	0.72	0.64	0.77	0.76	0.70	0.81	0.53	0.41	0.64	0.58	0.50	0.70
	Froissy	0.35	0.02	0.82	0.25	0.01	0.58	0.22	0.00	0.62	0.30	0.01	0.66	0.47	0.29	0.69	0.53	0.33	0.72
	Lectoure	0.85	0.71	0.93	0.70	0.35	0.82	0.73	0.63	0.80	0.75	0.69	0.78	0.60	0.51	0.70	0.71	0.64	0.76
	Louville	0.48	0.00	0.88	0.38	0.01	0.75	0.39	0.02	0.71	0.40	0.00	0.76	0.39	0.01	0.55	0.49	0.01	0.62
	Maule	0.82	0.63	0.95	0.68	0.42	0.81	0.69	0.43	0.82	0.68	0.47	0.81	0.47	0.31	0.57	0.56	0.36	0.68
	Moy	0.54	0.22	0.85	0.41	0.04	0.71	0.34	0.07	0.68	0.49	0.24	0.74	0.45	0.38	0.53	0.50	0.44	0.55
Triti	Allonnes	0.76	0.67	0.85	0.60	0.53	0.69	0.63	0.55	0.73	0.65	0.59	0.74	0.61	0.50	0.68	0.65	0.58	0.70
	Chartres	0.24	0.01	0.65	0.22	0.02	0.49	0.14	0.00	0.34	0.18	0.01	0.50	0.54	0.48	0.63	0.60	0.54	0.66
	Froissy	0.07	0.01	0.18	0.08	0.02	0.20	0.07	0.01	0.17	0.09	0.03	0.20	0.43	0.26	0.61	0.51	0.30	0.69
	Lectoure	0.71	0.71	0.93	0.63	0.35	0.85	0.63	0.63	0.84	0.67	0.69	0.85	0.66	0.58	0.76	0.73	0.65	0.80
	Terminiers	0.70	0.04	0.92	0.47	0.05	0.64	0.51	0.04	0.70	0.53	0.04	0.67	0.39	0.33	0.47	0.48	0.40	0.54
		Moy	0.51	0.30	0.73	0.41	0.20	0.59	0.41	0.25	0.58	0.44	0.28	0.61	0.52	0.42	0.63	0.59	0.48

Tableau 8 : Comparaison des modèles de segmentation des épis, selon l'indice de Dice.

Une interface utilisateur a été réalisée en 2022 pour la partie segmentation automatique réalisée sur Python, ce qui rend donc le lancement de la segmentation plus facile pour un expérimentateur.

3.3.2 Identification de la fusariose au champ par machine learning

• sur un panel réduit en 2021

Parmi 6 modèles élaborés en 2021 (combinant date et site), le plus performant est celui prenant en compte les 2 sites Louville et Anjouère à 2 dates de notation (D1 et D2), aussi bien pour le blé tendre qu'en blé dur (Tableau 9 et 10).

Méthodes	Test	Précision	Rappel	Justesse	R ²
Bagged_Trees	Anjouère D1	24.22%	63.51%	88.30%	0.59
	Louville D2	52.85%	85.70%	66.18%	0.85
Coarse_KNN	Anjouère D1	30.18%	59.68%	91.13%	0.69
	Louville D2	54.04%	87.78%	67.63%	0.86
Fine_Gaussian_SVM	Anjouère D1	31.77%	58.62%	91.68%	0.73
	Louville D2	54.59%	87.28%	68.21%	0.86

Tableau 9 : Pour le modèle D1 D2 Louville-Anjouère sélectionné pour le blé tendre : comparaison de 3 méthodes de machine learning.

Modèles	Méthodes	Test	Précision	Rappel	Justesse	R ²
Modèle 6 : D1 et D2 Anjouère	Fine_Gaussian_SVM	Anjouère D1	25.0%	49.1%	91.1%	0.60
		Anjouère D2	44.6%	92.5%	70.0%	0.93
		Anjouère D3	70.6%	88.4%	73.4%	0.90
Modèle D1-D2-Louville-Anjouère	Fine_Gaussian_SVM	Anjouère D1	25.9%	36.0%	92.5%	0.62
		Anjouère D2	45.1%	91.4%	70.5%	0.91
		Anjouère D3	73.6%	83.1%	74.3%	0.94
Modèle BDH D1-D2-D3	Bagged_Trees	Anjouère D1	20.9%	86.0%	84.7%	0.53
		Anjouère D2	57.8%	90.3%	81.4%	0.99
		Anjouère D3	70.6%	85.9%	72.6%	0.94
	Coarse_KNN	Anjouère D1	19.8%	65.1%	86.5%	0.43
		Anjouère D2	55.1%	86.0%	79.3%	0.97
		Anjouère D3	69.6%	89.1%	72.6%	0.89
	Fine_Gaussian_SVM	Anjouère D1	21.1%	60.9%	88.0%	0.48
		Anjouère D2	55.7%	85.3%	79.7%	0.97
		Anjouère D3	70.6%	88.5%	73.4%	0.89

Tableau 10 : Comparaison des meilleurs modèles pour le blé dur, d'après les indicateurs de performance².

Pour les variétés de blé tendre d'hiver de Louville, Le modèle D1D2 Louville Anjouère avec la méthode de Fine Gaussian permet une très bonne prédiction de la fusariose à Louville en se basant sur les annotations sur images, avec R=0.93 (Figure 15). La corrélation s'avère logiquement moins élevée avec les notations visuelles (R=0.73) avec la note de 1 à 9, et encore plus faible avec le taux d'épillets fusariés (R=0.54). AU GEVES Anjouère, la prédiction de la fusariose selon les annotations est aussi acceptable avec R²=0.73 (Tableau 11).

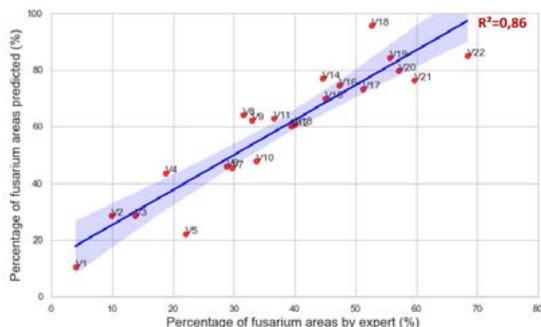


Figure 15 : Corrélation entre la prédiction des surfaces d'épis fusariés et les données annotées sur images à Louville à la date 2 pour le blé tendre.

Matrice de corrélation (Pearson) :

Variables	% fusa annotées sur	% épillets fusariés visuellement	Note visuelle (1 à 9)	% fusa prédit
% fusa annotées sur images	1	0.459	0.671	0.929
% épillets fusariés visuellement	0.459	1	0.867	0.549
Note visuelle (1 à 9)	0.671	0.867	1	0.737
% fusa prédit	0.929	0.549	0.737	1

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification alpha=0,05

Tableau 11 : Matrice de corrélation de Pearson entre prédiction de la fusariose par imagerie multispectrale et données de référence à Louville à la date 2 (>45°C J après inoc) pour le blé tendre.

En blé dur, une bonne prédiction de la fusariose (R²=0.93) a également été trouvée au GEVES de l'Anjouère, en utilisant le même modèle que pour le blé tendre, notamment à une date tardive de notation >550°C jour (Figure 16).

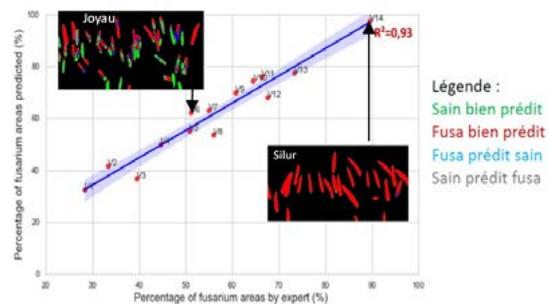


Figure 16 : Corrélation entre la prédiction des surfaces d'épis fusariés et les données annotées sur images à l'Anjouère à la date 3 pour le blé dur, avec la méthode Fine Gaussian.

En triticales, le modèle D1D2 Louville Anjouère utilisé en blé ne donne pas de bons résultats sur les 30 variétés testées au GEVES de l'Anjouère. Un modèle triticales devra être prévu.

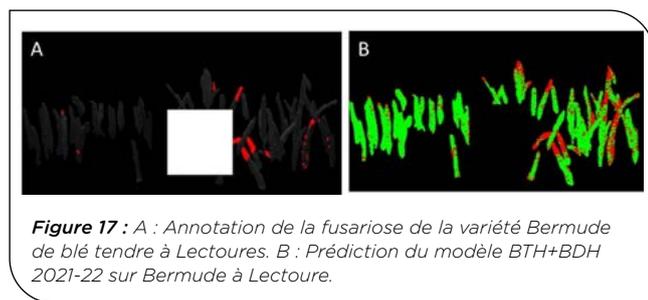
• Validation sur un large panel

Les performances de 3 modèles de prédiction de la fusariose ont été comparées en blé tendre et en blé dur à partir des images annotées sur des épis segmentés manuellement. Le 1^{er} modèle reprend celui de 2021 de D1D2 Louville-Anjouère, avec la méthode Fine Gaussian, le 2^{ème} modèle combine des données d'apprentissage de 2021 et 2022 en blé tendre, et le 3^{ème} modèle combine des données d'apprentissage de 2021-2022 en blé tendre et blé dur. Le tableau 12 montre un faible gain sur la précision et la justesse avec l'ajout de données de 2022 et un gain de 7 % en rappel pour les données BTH 2022, en passant de 63% avec le modèle BTH-BDH ou juste BTH 2022. En blé dur, le modèle BTH BDH 2021-22

Modèles	Données	VP	FN	FP	VN	Précision	Rappel	Justesse
Fine_Gaussian_SVM BTH 2021-2022	BTH 2021-2022 Entraînement	263755	122138	110024	274869	70.49%	68.27%	69.84%
	BTH 2022 Test	80153	33346	36736	76763	68.57%	70.62%	69.13%
	BDH 2022 Test	20108	10358	13010	17456	60.72%	66.00%	61.65%
Fine Gaussian SVM BTH-BDH 2021-2022	BTH-BDH 2021-2022 Entraînement	228735	95646	96624	227757	70.30%	70.51%	70.90%
	BTH 2022 Test	80055	33444	39057	74442	67.21%	70.53%	68.06%
	BDH 2022 Test	21333	9133	13880	16586	60.58%	70.02%	62.23%
Fine_Gaussian_SVM BTH 2021	BTH 2022 Test	71751	41748	35067	78432	67.17%	63.22%	66.16%
	BDH 2022 Test	20876	9590	13382	17084	61%	69%	62%

Tableau 12 : Comparaison des 3 modèles de prédiction de la fusariose en blé dur et en blé tendre sur les données d'entraînement et de test 2022.

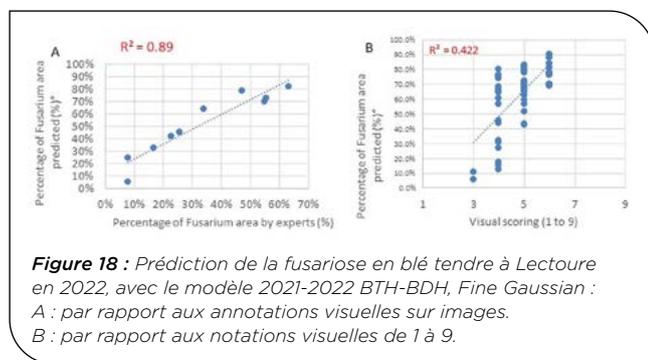
s'avère légèrement meilleur en rappel que le modèle BTH. En conclusion, nous avons retenu le modèle BTH BDH 2021-22 pour la prédiction de la fusariose sites 2022 en blé tendre et blé dur (**Figure 17**).



La synthèse des matrices de confusion (**Tableau 13**) pour la prédiction de la fusariose pour les 7 lieux indique une justesse assez bonne, mais souvent biaisée par le % important de bonne détection des épis sains. La précision et le rappel sont souvent faibles hormis à Lectoure qui a présenté une belle pression fusariose ; ce qui a permis une annotation plus fiable et une meilleure prédiction de la fusariose (**Figure 18**).

Espèces	Sites	VP en %	FN en %	FP en %	VN en %	Precision	Rappel	Justesse	R ² (annotations)
BDH	Allonnes (28)	3%	2%	8%	87%	16%	43%	90%	0.97
	Chartres	2%	5%	6%	87%	18%	21%	87%	0.90
	Lectoure (32)	38%	9%	36%	17%	52%	82%	56%	0.34
	Maule (78)	16%	15%	27%	42%	35%	49%	58%	0.35
	Terminiers (28)	9%	6%	36%	50%	16%	63%	57%	0.54
BTH	Allonnes (28)	4%	3%	6%	87%	36%	48%	91%	0.70
	Chartres	2%	2%	10%	85%	17%	47%	87%	0.85
	Froissy (60)	2%	4%	9%	84%	18%	38%	85%	0.18
	Lectoure (32)	28%	7%	24%	42%	46%	72%	69%	0.89
	Louville (28)	17%	10%	23%	50%	40%	60%	68%	0.49
Maule (78)	18%	10%	29%	42%	37%	63%	60%	0.16	
Terminiers (28)	7%	5%	31%	58%	18%	58%	63%	0.31	

Tableau 13 : Matrice de confusion et indicateurs de performance pour les 7 sites par espèce.



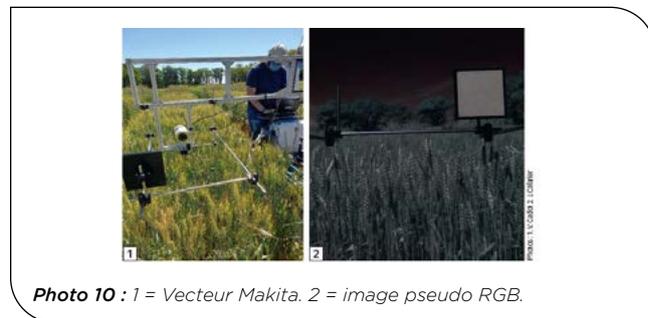
Concernant la corrélation entre prédiction fusariose et annotations, elle est variable d'un lieu à l'autre, en étant correcte à Chartres, Allonnes et Lectoure BTH, moyenne à Maule BDH, Terminiers et Lectoure BDH, et faible à Maule BTH et Froissy BTH (pression fusariose très faible). Les corrélations avec les notes visuelles s'avèrent plus faible qu'avec les annotations sur image, comme en 2021, du fait que l'image prédite ne représente qu'un sous-ensemble de la parcelle notée visuellement.

► 3.4 Construction de vecteurs kit piéton support des caméras multispectrales et RGB au champ

1^{er} type de vecteur : brouette motorisée Makita

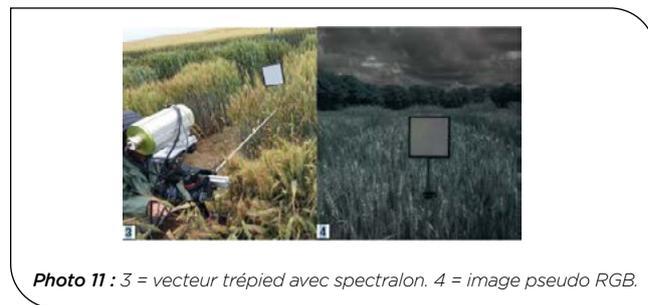
Ce vecteur a été fabriqué à partir d'une brouette électrique Makita tout terrain à 3 roues, avec un bras latéral portant les caméras multispectrales et RGB ainsi que le

spectralon, tout en tenant compte du poids des batteries pour alimenter les logiciels des caméras multispectrales consommatrices en énergie et en commande (**Photo 10**). Ce 1^{er} vecteur a été utilisé au GEVES de l'Anjouère pour les acquisitions au champ de 2020 et 2021. Sa stabilité et son encombrement ne permettant pas un transport aisé, un 2^{ème} vecteur plus léger a été conçu pour les acquisitions sur d'autres sites.



2^{ème} type de vecteur : trépied avec spectralon

Ce 2^{ème} vecteur plus léger a été élaboré pour être facilement déplaçable pour effectuer les acquisitions d'images multispectrales et RGB chez les semenciers (**Photo 11**). Il comporte un trépied, et une barre fixe avec au bout des 75 cm le spectralon. Ce 2^{ème} vecteur a été utilisé pour les acquisitions en 2021 et en 2022 chez les semenciers. En 2022, le boîtier de la caméra CMS4 a été allégé par Silios, avec superposition des caméras RGB et CMS4 pour être mises sur trépied.



4 Discussion

Le projet FSOV Fus'eye a permis d'avancer sur la mise à disposition d'un nouvel outil de phénotypage, en utilisant l'imagerie multispectrale sur un vecteur piéton pour évaluer le comportement de la résistance variétale à la fusariose du blé tendre, blé dur et triticale, en remplacement des notations visuelles. Des analyses chimiométriques basées sur des méthodes mathématiques de discrimination supervisée des images hyperspectrales (400 nm-1000 nm), initiées dans le projet CASDAR Irigam (2015-17), se sont poursuivies dans ce projet, identifiant quatre longueurs d'ondes dans le visible et le proche -infrarouge permettant de discriminer les pixels sains des pixels fusariés. Ces longueurs d'onde ont été transférées dans la caméra multispectrale CMS4, conçue sur mesure, dans le but de développer des algorithmes d'intelligence artificielle discriminant les zones fusariées sur des épis segmentés. Sur le panel de variétés 2021, des corrélations élevées ont été obtenues entre annotations sur images et prédictions de la fusariose, en utilisant le modèle de machine learning Fine Gaussian SVM, mais les résultats s'avèrent variables

selon le site sur le panel élargi de 2022. Différentes hypothèses peuvent expliquer cette variabilité de résultats : la qualité des annotations manuelles de la fusariose et de segmentation des épis est cruciale pour disposer d'un modèle de prédiction fiable. Cette étape d'annotation est très lourde en temps et concentration et exige une bonne expertise, ce qui n'est pas toujours facile sur une image. C'est pourquoi, certaines annotations fusariose de 2022 ont été refaites dans un autre projet européen en 2023 et un logiciel d'annotation semi-automatique a été initié pour gagner en rapidité et fiabilité. Après réannotations de certaines images, un gain de 10% a été obtenu sur la précision et le rappel ; et un gain de 36% sur la justesse.

La performance semble liée à la pression fusariose, plus la pression est forte (Louville et Anjouère 2021, Lecture 2022), plus les annotations ont été faciles, et meilleure a été la performance des modèles.

D'où l'importance d'avoir recours à des analyses sanitaires pour confirmer des confusions possibles avec d'autres pathogènes et de prévoir aussi dans le futur des logiciels d'aide aux annotations semi automatiques par I.A. L'étude en labo de la spécificité des modèles développés pour les images multispectrales issues de la caméra CMS4 pour discriminer *Fusarium* de *Microdochium* semble encourageante mais cette étude demande une confirmation sur un plus grand nombre d'épis. En complément de cette étude en labo, une étude au champ au GEVES issue d'un essai inoculé par *Microdochium nivale* et *majus* sur 22 variétés de blé tendre, dans le cadre du projet FSOV Resistamicro, a montré que l'algorithme de la fusariose ne détecte pas correctement le *Microdochium* comme de la fusariose, avec un $R^2=0$; ce qui est encourageant sur la spécificité d'identification de la fusariose et non du

Microdochium, mais ne prouve pas que l'algorithme est vraiment spécifique de la fusariose, au vu d'un seul essai contaminé par un complexe *Fusarium-Microdochium*. Il serait intéressant de poursuivre ces analyses de prédiction avec d'autres essais ayant exclusivement du *Microdochium* pour disposer de données de référence plus fiables.

Concernant la performance de la segmentation des épis, elle est variable selon les sites. Pour obtenir de bonnes performances, il est important de bien respecter le protocole d'acquisition, avec des images standardisées et en évitant de prendre des prises de vue trop surplombantes. Si le vecteur brouette est opérationnel et permet un bon cadrage pour obtenir des images standardisées, il n'est pas facilement déplaçable entre sites et une amélioration de sa stabilité serait utile. Ce 1^{er} vecteur a été utilisé uniquement sur le site du GEVES, et c'est le vecteur trépied, plus léger et maniable qui a été utilisé pour l'acquisition des images multispectrales et RGB sur les autres sites. Ce 2^{ème} vecteur a pour inconvénient de rentrer dans les parcelles, ce qui les abîme et ne permet pas toujours de belles images standardisées, avec des variations d'angle du spectal, et de hauteur. Une amélioration serait d'utiliser un kit piéton depuis l'allée. L'idéal serait de réaliser des acquisitions sur des parcelles et non des pépinières lignes pour éviter les problèmes de perspectives depuis l'allée, mais ce dispositif en parcelle prend trop de place, et n'est pas actuellement utilisé par les sélectionneurs ou le GEVES.

Cette étude se poursuit via de nouveaux projets européens, en développant des annotations semi automatiques, et en testant d'autres méthodes d'intelligence artificielle et d'autres capteurs.

Ce travail a été valorisé dans Phytoma (Cadot & al., 2022).

Références bibliographiques

Bauriegel E., A. Giebel, W.B. Herppich (2011). Hyperspectral and chlorophyll fluorescence imaging to analyse the impact of *Fusarium culmorum* on the photosynthetic integrity of infected wheat ears, *Sens*. 11 3765-3779.

Cadot V. and Maigniel J.-P. (2013). Testing varieties at GEVES for resistance to *Fusarium* head blight on cereals: A way to improve genetic progress in the French Catalogue and to reduce the use of pesticides. In *Book of abstracts of 12th European Fusarium Seminar*, 12-16 May, Bordeaux (France), p.99.

Cadot V., Vadaine R., Demilly D., Maigniel J.-P. (2015). Multi-spectral camera and imaging: a new tool for assessment of wheat resistance to *Fusarium graminearum* and preliminary study for assessment of DON content. In *Book of abstracts of 13th European Fusarium Seminar*, 10-14 may, Martina Franca (Italy), p. 160.

Cadot V. 2022. L'imagerie, au service de la sélection variétale. *Phytoma* n° 751, Février 2022. 32-35

Garbougé H. 2022 Deep learning applied to multi-component imagery for variety testing problems, Thèse de doctorat soutenue le 9/11/2022, p81-106

Dammer K.H., Möller B., Rodemann B., Heppner D. (2011). Detection of head blight (*Fusarium ssp.*) in winter wheat by color and multispectral image analyses. *Crop Protection*, Volume 30, Issue 4, April 2011, 420-428.

Delwiche S.R., Kim M.S., Dong Y. (2011). *Fusarium* damage assessment in wheat kernels by Vis/NIR hyperspectral

imaging. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, Volume 5, Issue 2, June 2011, 63-71.

Faure M., Serre F., Lasserre-Zuber P., Roche S., Maigniel J.P., Sautenac C., Cadot V. (2018). Two approaches for the detection and quantification of *Fusarium* Head Blight on common wheat: hyperspectral imaging on ears and multispectral imaging on kernels. 14th European Fusarium Seminar. Austria, Tulln. 8-11 April, 2018.

Jaillais B., Roumet P., Pinson-Gadais L., Bertrand D. (2015). Detection of *Fusarium* head blight contamination in wheat kernels by multivariate imaging. *Food Control* 54:250-258

Oldenburg E., Ellner F., Kraft M. (2015). Detecting and quantifying fusarium ear rot symptoms in maize by spectral imaging technology. In *Book of abstracts of 13th European Fusarium Seminar*, 10-14 may, Martina Franca (Italy), p.204

Serre F., Faure M., Abadi M., Desray P., Roche S., Joannin M., Vinot M., Petit S., Tourvieille de Labrouhe D. (2015). Phénotypage au champ des céréales pour la fusariose de l'épi (FHB) par analyse automatique d'image. 11e Conf. Int. sur les maladies des plantes. Tours (7-9 décembre).

Tekle S., Måge I., Segtnan V.H. Åsmund Bjørnstad (2015). Near-Infrared Hyperspectral Imaging of *Fusarium*-Damaged Oats (*Avena sativa* L.), January 2015, Volume 92, Number 1- 73 - 80.

Williams P.J., P. Geladi, T.J. Britz, and M. Manley (2012). Investigation of fungal development in maize kernels using NIR hyperspectral imaging and multivariate data analysis. *J. Cereal Sci.* 55 272-278.

Fus'eye : Nouvel outil de phénotypage spectral au champ pour quantifier la Fusariose de l'épi sur céréales

Valérie CADOT^{1*}, Hadhami GARBOUGE^{1&14}, Nicolas MASCHER¹, Jorick CELARIER¹, Julien GARNIER¹, Frederic SERRE², Martin ECARNOT³, Pierre ROUMET³, Sylvie ROCHE², Jean Philippe MAIGNIEL¹, Hugo LAMMENS¹, Isabelle SERANDAT¹, Lama AL BASSIT², Gabriel BEUDIN⁴, Frederic MINARD⁴, Camille WABINSKI-DAUCHY⁵, Michael COCHARD⁵, Patrice SENELLART⁶, Sébastien CUVELLIER⁷, Pascal GIRAUDEAU⁸, Carine ANDRE⁹, Auberi AVALLE¹⁰, Philippe LEREBOUR¹⁰, Sylvie DUTRIEZ¹¹, Jérôme AUZANNEAU¹², Stéphane PORREZ¹³, Christelle SABLAYROLLES¹³, David ROUSSEAU¹⁴

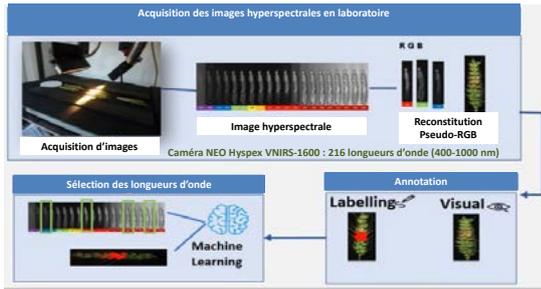
La fusariose de l'épi causée par un complexe d'espèces dont la principale est *Fusarium graminearum*, est une maladie qui affecte de nombreuses céréales à paille en Europe. Elle entraîne une réduction du rendement de l'ordre de 0.2t/ha mais aussi la contamination des grains en fusarotoxines, se révélant nocive pour la santé humaine et animale. Pour limiter cette maladie et l'accumulation de ces toxines au champ, la réglementation CTPS encourage le développement de variétés résistantes à la fusariose de l'épi, en leur octroyant un bonus afin de faciliter leur inscription au Catalogue français et défavoriser les variétés sensibles en délivrant un malus.

Afin d'estimer le niveau de résistance à la fusariose des variétés de blé tendre, blé dur et triticale, lors du processus d'inscription, des estimations visuelles du taux d'épillet fusariés sont actuellement réalisées par les expérimentateurs du réseau CTPS piloté par le GEVES, avec des essais inoculés au champ. Mais ces notations visuelles requièrent des experts qualifiés pour identifier et quantifier leurs symptômes, et présentent des risques de confusion avec *Microdochium* spp. L'objectif du projet FSOV Fus'eye est de développer une nouvelle méthode de phénotypage basé sur l'imagerie multispectrale pour quantifier spécifiquement la fusariose sur épis des céréales à paille, dans le cadre de l'évaluation de la résistance variétale au champ.

MATERIEL ET METHODES

RESULTATS

1. Identification des longueurs d'onde discriminantes de la fusariose des épis

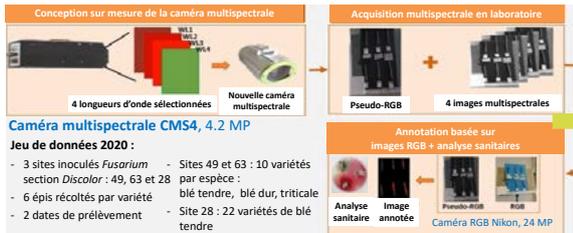


Chaque point représente les longueurs d'onde sélectionnées suivant les méthodes de sélection supervisées : ADPP non séquentielle, CovSel et ADPP séquentielle, et à partir des bases d'apprentissage 2016 à 2019.

4 longueurs d'onde discriminantes de la fusariose ont été validées, allant du visible au proche infra-rouge pour les 3 espèces



2. Transfert des longueurs d'onde vers une camera multispectrale en labo



1. Différenciation des pixels «Fusa/Sains»

Prediction de la fusariose de variétés de blé tendre en test, selon le taux de données d'entraînement

taux de données d'entraînement	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%
Précision	64%	67%	73%	63%	70%	66%	70%
Rappel	± 4%	± 4%	± 4%	± 4%	± 4%	± 4%	± 4%
Justesse	65%	72%	71%	60%	71%	67%	72%
Justesse	65%	69%	69%	66%	70%	68%	70%
Justesse	± 2%	± 2%	± 2%	± 2%	± 2%	± 2%	± 2%

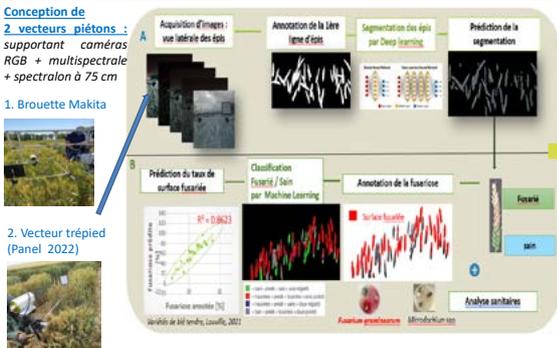
- Meilleur modèle de machine learning : Fine Gaussian SVM.
- Meilleure prédiction de la fusariose en test : pour le jeu d'entraînement représentant 60% des données

2. Différenciation des pixels «Fusa/Microdochium»

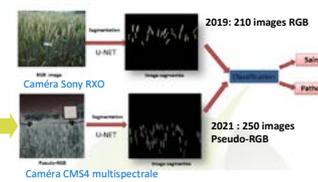
Modèle	Précision	Rappel	Justesse
Modèle Weighted SVM	83%	96%	88%
Modèle Fine gaussian SVM	74%	85%	78%

2 meilleurs modèles de machine learning pour discriminer Fusarium /Microdochium sont : Weighted KNN et Fine Gaussian SVM (données du site 28, sur 14 variétés & 22 épis)

3. Algorithmes pour la segmentation des épis et l'identification & quantification de la fusariose au champ de blé tendre et blé dur



1. Modèle de segmentation des épis



Modèles de segmentation des épis de blé au champ, évalués selon l'indice de Dice

	Training	Validation	Test
HCGB	0.83 ± 0.03	0.79 ± 0.02	0.71 ± 0.02
Pseudo-HCGB	0.75 ± 0.01	0.75 ± 0.02	0.71 ± 0.02
Fine-tuning	0.88 ± 0.03	0.84 ± 0.02	0.79 ± 0.03

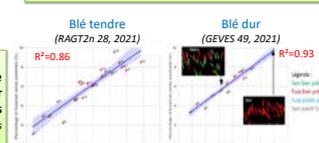
- Utilisation du réseau de neurones convolutionnel U-Net pour segmenter les épis.
- Meilleur modèle de segmentation par Fine Tuning (utilisant le poids des images RGB pour segmenter les épis des images multispectrales)

2. Modèle fusariose

2021 : Panel restreint à 2 sites
- Comparaison de différents modèles de machine learning pour discriminer la fusariose - Meilleur modèle : Fine Gaussian SVM pour classifier pixels fusariés/sains, à partir de 105 images acquises sur 2 sites (GEVES 49 et RAGT2n 28) sur blé tendre, blé dur et triticale

2022 : Panel élargi à 7 sites
- Comparaison de nouveaux modèles avec les données 2021-2022. Sélection du modèle Fine Gaussian SVM 2021 pour le blé tendre, et du modèle Fine Gaussian SVM 2021-2022 pour le triticale et blé dur.

- Variabilité des performances avec les annotations selon les lieux. Meilleure corrélation dans les sites à plus forte pression fusariose (Lecture, Chartes, Allaines)



Epis	Site	VF en %	PF en %	VF en %	VF en %	Précision	Rappel	Justesse	R ²
Blé dur	Chartes 28	31	28	45	27	100	100	100	0.87
	Chartes 28	25	25	45	27	100	100	100	0.86
	Chartes 28	38	35	25	25	100	100	100	0.86
	Chartes 28	35	35	25	25	100	100	100	0.86
	Chartes 28	35	35	25	25	100	100	100	0.86
	Chartes 28	35	35	25	25	100	100	100	0.86
	Chartes 28	35	35	25	25	100	100	100	0.86
Blé tendre	Chartes 28	25	45	25	25	100	100	100	0.86
	Chartes 28	25	45	25	25	100	100	100	0.86
	Chartes 28	25	45	25	25	100	100	100	0.86
	Chartes 28	25	45	25	25	100	100	100	0.86
	Chartes 28	25	45	25	25	100	100	100	0.86
	Chartes 28	25	45	25	25	100	100	100	0.86
	Chartes 28	25	45	25	25	100	100	100	0.86

Evaluation des algorithmes sur un grand panel en 2022

Nb d'images multispectrales et RGB acquises dans 7 sites en 2022	Site	Blé dur	Blé tendre	Triticale	Total
INRAE	Chartes 28	18	22	18	58
Syngenta	Chartes 28	18	22	18	58
Unilever	Chartes 28	18	22	18	58
Florimond Desprez	Chartes 28	18	22	18	58
Agap	Chartes 28	18	22	18	58
Arvalis	Chartes 28	18	22	18	58
DSV	Chartes 28	18	22	18	58
Nb images/épillet		432	504	324	1260

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

- Le projet FSOV Fus'eye a permis d'avancer sur la mise à disposition d'un nouvel outil de phénotypage, en utilisant l'imagerie multispectrale sur un vecteur piéton pour évaluer le comportement de la résistance variétale à la fusariose du blé tendre, blé dur et triticale.
- Des analyses chimiométriques basées sur des méthodes de discrimination supervisée des images hyperspectrales ont permis d'identifier quatre longueurs d'ondes dans le visible et le proche - infra-rouge, permettant de discriminer les pixels sains des pixels fusariés.
- Ces longueurs d'onde ont été transférées dans une caméra multispectrale conçue sur mesure, CMSA, dans le but de développer des algorithmes d'intelligence artificielle discriminant les zones fusariées sur épis segmentés. L'étude en labo pour discriminer Fusarium de Microdochium semble encourageante mais demande une confirmation sur un plus grand nombre d'épis.

- Sur le panel de variétés 2021, des corrélations élevées ont été obtenues entre annotations sur images et prédictions de la fusariose avec le modèle de machine learning Fine Gaussian SVM pour le blé tendre et le blé dur.
- Sur le panel élargi de 2022, les performances des modèles de segmentation des épis et de discrimination de la fusariose sont variables selon les sites, pouvant s'expliquer par une pression fusariose trop faible dans certains sites, rendant les annotations sur images moins fiables et, une moins bonne standardisation des images pour le vecteur trépiéd, avec des images trop surplombantes. Pour obtenir de meilleures performances, il sera important de bien respecter le protocole d'acquisition.
- Cette étude se poursuit au niveau européen, en développant des annotations semi-automatiques, et en testant d'autres méthodes d'intelligence artificielle et d'autres capteurs.



PolyBléd :

Quelles nouvelles polyploïdisations réaliser pour une meilleure adaptation du blé tendre aux contraintes à venir ?

Annaig BOUGUENNEC*, Rémi PERRONNE², Bernard ROLLAND², Alison BENTLEY³, Keith GARDNER³, Tally WRIGTH³, Dario FOSSATI⁴, Laure DUCHALAIS⁵, Sylvain CHOMBART⁶, Constance LAVERGNE⁷, Gabriel BEUDIN⁸, Alexis OGER⁹, Auberi AVALLE¹⁰, Meriem BANOUH¹, Peter CIVAN¹, Jérôme SALSE¹

1 - INRAE, UCA, GDEC, 63000, Clermont-Ferrand, FRANCE

2 - INRAE, Institut Agro, Univ. Rennes, IGEPP, 35653 Le Rheu, FRANCE

3 - NIAB, CB3 Cambridge OLE, ROYAUME-UNI

4 - Agroscope, 1260 Nyon 1, SUISSE

5 - Agri-Obtentions, 78660 Orsonville, FRANCE

6 - Florimond-Desprez, 59242 Cappelle-en-Pévèle, FRANCE

7 - Limagrain Europe, 77390 Verneuil L'Etang, FRANCE

8 - RAGT, 28150 Louville-La-Chenard, FRANCE

9 - Syngenta, 28000 Chartre, FRANCE

10 - Unisigma, 60480 Froissy, FRANCE

*Coordinateur : Annaig BOUGUENNEC, annaig.bouguennec@inrae.fr

1 Introduction

Alors que les besoins sont croissants pour cette céréale de première importance économique, nous assistons, depuis deux décennies, à la stagnation des rendements du blé tendre dans plusieurs pays européens : le progrès génétique peine à contrecarrer les effets négatifs des changements climatiques (Brisson *et al.* 2010). Ceux-ci induisent en effet des stress thermiques et/ou hydriques, des phénomènes de précipitations et vents plus violents, à des stades variés et parfois inhabituels du développement de la plante. Les changements climatiques s'accompagnent aussi d'évolutions des populations de pathogènes entraînant l'émergence de nouvelles maladies (par exemple, *Microdochium* en 2016). Tout ceci a de fortes répercussions sur les plantes. Depuis l'après-guerre, les pratiques agricoles ont beaucoup évolué pour permettre l'augmentation de la production alimentaire. Les techniques mises en œuvre ont permis de pallier de nombreux aléas biotiques et abiotiques par une artificialisation croissante du milieu. Cependant, il ne sera pas possible de faire face aux nouvelles contraintes par les mêmes méthodes qui ont aussi montré leur impact très négatif sur l'environnement et la santé (pollutions, gaz à effet de serre). S'ajoute donc la nécessité de modifier profondément les pratiques agricoles pour limiter la dégradation de l'environnement. Ceci implique une diminution drastique de l'ensemble des produits phytosanitaires, raccourcisseurs, fertilisants chimiques et un tournant vers l'agro-écologie. Enfin, les habitudes alimentaires de nos sociétés et les sensibilités individuelles évoluent aussi beaucoup, entraînant des exigences de qualités différentes et très variées. En réponse à tous ces changements, les sélectionneurs doivent faire appel à une nouvelle diversité génétique, au-delà de celle habituellement utilisée en sélection variétale.

Cependant, chez le blé tendre, plusieurs événements ont contribué à une certaine diminution de la diversité au fil du temps. En sont responsables : la sélection (Roussel *et al.* 2004) ou du moins jusque dans les années 1990 (Reif *et al.* 2005), la domestication (Haudry

et al. 2007) et surtout l'origine allopolyploïde de cette espèce hexaploïde. Le blé est issu, dans son histoire ancienne, de deux polyploïdisations successives. Or la dernière, dans le croissant fertile aux débuts de l'agriculture, a probablement impliqué peu d'événements de polyploïdisation initiaux (Dvorak *et al.* 1998, Pont *et al.* 2011) entre des blés tétraploïdes (génomes A et B) et des *Aegilops tauschii* (Ae.t) (génome D). Ce goulot d'étranglement est particulièrement sensible pour le génome D qui demeure le moins polymorphe dans le blé tendre (Jordan *et al.* 2015). Cependant, les *Aegilops tauschii* sauvages actuels s'étendent sur une large zone géographique (de la Turquie à la Chine) ayant des conditions pédoclimatiques extrêmement variées. Ils possèdent une très grande diversité génétique et des caractères intéressants pour des stress biotiques et abiotiques (van Slageren 1994, Naghavi *et al.* 2010, cités par Sohail *et al.* 2011). Cette diversité n'est pas encore suffisamment exploitée et disponible au sein des blés modernes. C'est donc très logiquement que l'idée est venue de repartir aux sources pour pallier la faible diversité initiale du génome D du blé tendre. Des programmes de croisements entre blés tétraploïdes et Ae.t ont été réalisés, notamment par le CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento del Maize Y Trigo), principalement pour les blés de printemps, depuis 1980 (Mujeeb-Kazi *et al.* 1996), permettant l'obtention de blés dits « blés synthétiques ». Ces travaux connaissent un regain d'intérêt depuis 2006 et la tenue du 1^{er} Synthetic Wheat Symposium en Australie. De plus, les connaissances et les outils disponibles sur les différentes espèces d'*Aegilops*, et en particulier Ae.t, progressent rapidement. De nouvelles études de diversités ont été publiées (Sohail *et al.* 2012, Jones *et al.* 2013), le génome d'*Aegilops* A178/8 a été séquencé (Luo *et al.* 2017) et dans le cadre d'un consortium international (Open Wild Wheat Consortium <http://www.openwildwheat.org>), 46 *Aegilops* choisis sont en cours de séquençage par « Whole Genome shotgun » (WGS) avec une couverture de 7,5 à 10, afin de définir le pangénome de l'espèce. Cependant, l'intégration de la diversité génétique des Ae.t dans du matériel blé tendre actuel élite se heurte à de nombreuses difficultés.

Premièrement, il est difficile de faire un choix pertinent des Ae.t à croiser. En effet, la plupart des caractères d'intérêt recherchés pour le blé tendre, et notamment les caractères complexes comme le rendement et la qualité du grain, ne sont pas directement évaluables dans les Ae.t (Tsujiimoto *et al.* 2015), ni même facilement dans les blés synthétiques qui conservent des caractéristiques marquées de l'ancêtre sauvage (Okamoto *et al.* 2012). Il convient donc d'utiliser d'autres approches (géographiques et moléculaires notamment), comme l'ont fait Gosman *et al.* (2012), Jones *et al.* (2013) pour choisir les Ae.t intéressants, ou du moins les plus diversifiés possibles, et différents de ceux déjà exploités ou proches de la diversité génétique du sous-génome D des blés modernes. Les études sur les Ae.t distinguent 4 groupes correspondant à 2 sous-espèces *Aegilops tauschii ssp. tauschii* (elle-même divisée en 3 formes : *anathera*, *meyeri* et *typica*) et *Aegilops tauschii ssp. strangulata*. C'est cette dernière qui serait à l'origine du blé tendre (Feldman and Levy, 2012). Diverses collections d'Ae.t sont conservées et utilisées dans le monde (par les organismes suivants AXIOM™: AAFC, CIMMYT, CSIRO, JIC, KSU, NIAB, USDA, ...). Les marqueurs utilisés pour les décrire sont en général des microsatellites (ou SSR Simple Repeat Sequence) (Naghavi *et al.* 2008), des DArTseq (Elbashir *et al.* 2017), des SNP (Single Nucleotide Polymorphism) spécifiques du génome D (Winfield *et al.* 2016) ou séquençage (Whole Genome shotgun) (Gaurav *et al.* 2021).

De plus, le blé tétraploïde choisi pour la création de blés synthétiques a aussi son importance. Dans l'étude de Mestiri *et al.* (2010), deux types de tétraploïdes (un blé dur, Joyau et un tétraploïde dérivé du blé tendre, Courtot) ont été croisés avec 33 Ae.t pour obtenir des blés synthétiques. L'observation et l'utilisation de ce matériel montre un intérêt accru des synthétiques issus du tétraploïde dérivé du blé tendre, plus stables et plus fertiles du fait d'un meilleur appariement chromosomique en méiose. Ceci semble en accord avec des travaux plus anciens de Kerber (Sisodia and McGinnis, 1970). Il faudrait cependant confirmer ceci dans d'autres contextes génétiques. Cet intérêt pourrait venir du cytoplasme (hypothèse de Sisodia and McGinnis 1970) et/ou de l'origine des génomes A et B. Une autre façon d'introduire une part de diversité du génome D dans un fond génétique blé tendre consiste à croiser directement l'Ae.t au blé tendre (Mujeeb-Kazi *et al.* 1996).

Deuxièmement, un caractère phénotypique mesuré chez un Ae.t (ou le parent tétraploïde) ne se retrouve pas forcément exprimé dans le blé synthétique qui en découle (Sohail *et al.* 2011). En effet, la polyploïdisation peut engendrer des réarrangements structuraux (Feldman *et al.* 1997, Yu *et al.* 2017). La taille des différents génomes parentaux mis en présence lors de la polyploïdisation pourrait jouer un rôle, via des différences de temps de divisions cellulaires notamment (Bento *et al.* 2011). Cependant, ces réarrangements ne sont pas toujours mis en évidence (Mestiri *et al.* 2010, citant aussi He *et al.* 2003). Mais la polyploïdisation est surtout susceptible d'engendrer des réarrangements fonctionnels. La redondance d'information génétique résultant de la polyploïdisation va évoluer au fil du temps vers une diploïdisation par sous/sur-expression, voire une perte ou une néo-fonctionnalisation des

gènes homéologues. Même si la part d'additivité peut être importante dans certains cas (Chagué *et al.* 2010), la polyploïdisation induit une reprogrammation génétique de telle sorte qu'il n'y a pas additivité stricte des potentiels génétiques des parents au sein du polyploïde synthétique néoformé (Li *et al.* 2015). Il a ainsi été démontré que par cette reprogrammation génétique, les polyploïdes synthétiques peuvent se développer dans des environnements contraints pour lesquels le développement des parents diploïdes et tétraploïdes apparaît plus limité (Yang *et al.* 2014). Les polyploïdes synthétiques développent ainsi des capacités génétiques et phénotypiques nouvelles non héritées des parents diploïdes et tétraploïdes mais générées par le processus de polyploïdisation, qui peut ainsi être considéré comme un choc génomique. Ces nouvelles potentialités génétiques ne viennent donc pas uniquement de la séquence génomique. Il a récemment été montré que l'expression des gènes jouait un rôle majeur dans les potentialités génétiques nouvelles des polyploïdes synthétiques. En effet, de nouveaux gènes peuvent être exprimés dans les polyploïdes synthétiques par rapports aux parents diploïdes et tétraploïdes (Li *et al.* 2014). Cela constitue un autre niveau de variabilité à exploiter. Cette reprogrammation semble dépendre des relations entre sous génomes et notamment de l'appartenance à un sous-génome dit dominant ou à un sous-génome dit sensible (Pont and Salse, 2017). Des modifications de méthylations semblent impliquées (Qiu *et al.* 2017).

Troisièmement, la plupart des travaux réalisés utilisent des croisements, suivis de rétrocroisements incluant un nombre assez limité de blés synthétiques initiaux, du fait de la lourdeur du suivi de ce matériel en schéma généalogique (Populations 'Advanced Back-Cross') (Huang *et al.* 2003, Duchalais *et al.* 2017 FSOV-2012P). Bien qu'efficace, ceci limite l'utilisation rapide de toute la diversité des nombreux blés synthétiques disponibles et les combinaisons génétiques. Une possibilité de pallier ces difficultés consiste à introduire une diversité très large en mélange et à reporter l'évaluation du caractère recherché le plus tard possible dans le schéma de pre-breeding. Chez le blé tendre, Tsujiimoto *et al.* (2015) ont développé une population dérivée de multiples blés synthétiques (43 synthétiques provenant de Langdon x 43 Ae.t, croisés et rétro-croisés avec Norin 61). Cette population permet de révéler la variabilité de l'espèce sauvage dans contexte génétique cultivable. En l'utilisant, Elbashir *et al.* (2017) ont montré que la mise en condition de stress de cette population est efficace pour identifier des dérivés tolérants au stress thermique. Leur étude moléculaire par DArT-seq a ensuite permis de remonter aux *Aegilops* parents et de préciser les zones chromosomiques potentiellement impliquées. Ce matériel a aussi été utilisé ultérieurement par Gorafi *et al.* (2018) sur d'autres caractères pour rechercher des QTL (Quantitative Trait Loci) par génétique d'association (GWAS Genome-Wide Association Study).

Les blés synthétiques semblent particulièrement intéressants pour : la résistance à la sécheresse (Sohail *et al.* 2011), la résistance à certaines maladies (Ogbonnaya *et al.* 2008, Das *et al.* 2016), à la germination sur pied (Ginkel *et al.* 2007) et potentiellement aussi des caractères tels que les carences azotées.

Au-delà des difficultés de choix de géniteurs évoquées s'ajoutent les difficultés liées aux croisements interspécifiques et notamment le problème crucial des nécroses qui peuvent s'exprimer aux différentes étapes. Au stade tétraploïde x *Aegilops*, interagissent les gènes *Net1* (génome du tétraploïde AB) et *Net2* (2DS) (Sakaguchi *et al.* 2016). Lors des croisements « exotiques » intra-blé tendre, dont font partie les croisements blé adapté x blé synthétique, ce sont les gènes *Ne1* (chromosome 5BL) et *Ne2* (2BS, lié au gène *Lr13* de résistance à la rouille brune Zhang *et al.* 2016) qui interviennent (Tsunewaki 1960, Chu *et al.* 2006).

Sur la base des connaissances et hypothèses précédentes, ce projet, décliné en 3 volets, vise à (i) caractériser la collection d'Ae.t dont nous disposons et notamment de la situer par rapport à d'autres collections et à la diversité blé tendre afin d'identifier les Ae.t les plus intéressants à croiser, (ii) étudier l'effet des parents blés tétraploïdes et Ae.t sur le blé synthétique résultant, (iii) intégrer cette diversité dans du matériel élite, via des populations soumises à contraintes biotiques et abiotiques. Les études sont menées à chaque fois aux niveaux phénotypique et génotypique (figure 1).

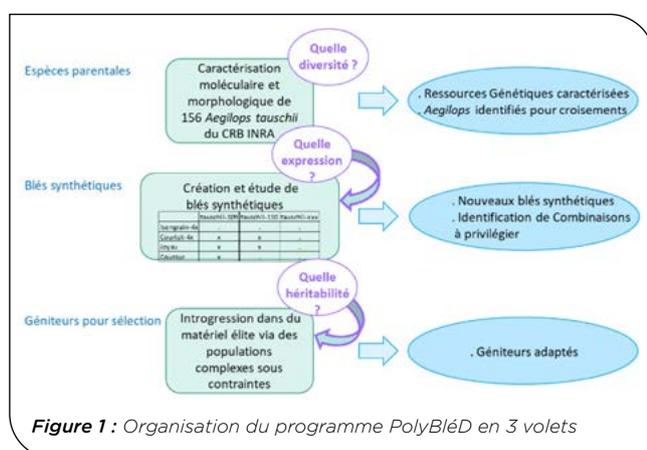


Figure 1 : Organisation du programme PolyBléD en 3 volets

2 Matériel et méthode

► Volet 1 - Collection d'*Aegilops tauschii*

Le CRB INRAE (Centre de Ressources Biologiques de Clermont-Ferrand) dispose d'une collection de 154 Ae.t des sous-espèces *tauschii* et *strangulata*, dont certains ont déjà été utilisés par l'INRAE UMR IGEPP à Rennes (Mestiri *et al.* 2010) et inclus dans le programme de sélection blé tendre INRAE. Quatre autres Ae.t ont aussi été fournis par Agroscope.

Cette collection a été multipliée (par autofécondations) et observée en serre en 2019 (Plasse, 2019). Chaque génotype était représenté par deux plantes. Les caractères mesurés sont des caractères morphologiques et/ou agronomiques de base, en s'inspirant de la liste des descripteurs de l'IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) : forme d'épi, coloration, pilosité, hauteur, tallage, port, précocité à épiaison et floraison, et quelques caractères marquants (par exemple, sensibilité à l'oïdium). L'extraction d'ADN a été réalisée à partir de feuilles coupées et congelées de ces plantes.

Pour le génotypage, nous avons utilisé un jeu de 192 marqueurs SNP, spécifiques du génome D

d'*Aegilops*, développé par le NIAB à partir de SNP identifiés chez *Aegilops* (Winfield *et al.* 2016, Jones *et al.* 2013 et Wang *et al.* 2014). Le marquage a été réalisé par la plateforme INRAE Gentyane sur une puce Standard Biotoools (anciennement Fluidigm) « 96*96 IFCs » (BMK_M.96.96). Afin de comparer la diversité des Ae.t à celle des blés, 32 blés tendres très diversifiés ont été ajoutés à la collection de 158 Ae.t. Ces blés sont des génotypes représentatifs de la diversité mondiale (un représentant de chacun des 11 groupes identifiés dans la diversité mondiale par Balfourier *et al.* (2019) et 5 représentants des 8 groupes de variétés locales, réduits à ceux de la zone géographique des Ae.t), des variétés de blés actuels marquantes de la sélection française, des lignées séquencées ou en cours, des géniteurs issus de blés synthétiques. Des Analyses en Coordonnées Principales ont été conduites par le NIAB en comparaison avec d'autres collections d'Ae.t.

► Volet 2 - Blés synthétiques

Afin d'identifier l'impact des parents blés tétraploïdes et Ae.t sur le blé synthétique résultant, nous avons essayé d'obtenir toutes les combinaisons de croisements entre 3 Ae.t et 5 blés tétraploïdes. Les 3 Ae.t sont 2 Ae.t *ssp. tauschii* (Tauschii-87 Tauschii-110) et 1 Ae.t *ssp. strangulata* (Tauschii-109). Les 5 blés tétraploïdes sont d'une part 3 *Triticum durum* : Coussur (CUR), Joyau (JOY) et Langdon (LAN) et d'autre part 2 blés tétraploïdes issus de blé tendre, obtenus par l'INRAE IGEPP (Courtot-4x : SYN et Isengrain-4x : ISE). Les croisements ont été réalisés dans les 2 sens (Ae.t utilisés en femelle ou en mâle).

Nous avons aussi croisé des blés tétraploïdes avec des Ae.t identifiés comme intéressants du volet 1. Les critères pour retenir les Ae.t étaient les suivants : ne pas avoir déjà été croisés par INRAE IGEPP, être plutôt classés dans le lignage 1, être originaux d'un point de vue moléculaire et/ou morphologique. Côté blé tétraploïdes, nous avons utilisés des variétés témoins CTPS actuelles et aussi des blés issus de croisements blé tendre x blé dur (et réciproques), partant de l'hypothèse que des sous-génomes A et B, voire le cytoplasme, de *T. aestivum* sont peut-être plus favorables que du A et B de *T. durum*.

Les croisements ont été réalisés en serre, avec des décalages de semis afin de faire coïncider les floraisons. Environ 3 semaines après anthèse, nous avons procédé à du sauvetage d'embryon sur milieu MS (Murashige et Skoog, 1962). Les plantules obtenues ont été traitées à la colchicine (solution à 2g/l pendant 4h à 22°C) à l'apparition de leur 2^e talle. Les plantes obtenues sont ensuite autofécondées.

Les blés synthétiques obtenus ont été observés et multipliés en pépinière par INRAE GDEC au fil des années du projet. En 2023, 43 blés synthétiques ont aussi pu être observés en commun chez tous les partenaires.

Au-delà de l'aspect phénotypique, nous avons aussi étudié quelques cas pour l'expression du transcriptome. Ceci a fait l'objet de la publication de Banouh *et al.* (2023). L'étude comparative de l'expression transcriptomique a été réalisée sur cinq blés synthétiques issus de quatre schémas de croisements distincts. Ces croisements (femelle indiquée en premier) comprennent deux générations du croisement Tauschii-109/Langdon (109xL), désignées C2 et C4 pour les grains, et C1 et C3 pour les feuilles, le croisement réciproque Langdon/

Tauschii-109 (Lx109) à la première génération C2 et C1 pour les grains et les feuilles respectivement, ainsi que les croisements Joyau/Tauschii-109 (Jx109) et Joyau/Tauschii-87 (Jx87) uniquement analysés sur grains.

► Volet 3 - Lignées dérivées

En 2008, une population hétérogène a été initiée par l'IGEPP à partir de 31 des blés synthétiques décrits par Mestiri *et al.* (2010) (33 *Aegilops* croisés avec le blé dur Joyau et le tétraploïde issu du blé tendre Courtot). Ces blés synthétiques ont pollinisé la variété de blé tendre Isengrain, largement cultivée, dans laquelle un gène de stérilité mâle avait été introduit (Isengrain-ms). Cette population a été cultivée à Rennes et Clermont-Ferrand et en 2011, de même, 700 plantes ont été choisies dans cette population pour polliniser la variété Charger avec gène de stérilité mâle (Charger-ms). La figure 2 illustre ces premières étapes.

En 2018, une fraction représentative de cette population nommée CIS (Charger Isengrain Synthétiques) a été distribuée à chaque partenaire du programme PolyBléd. Chacun a appliqué une contrainte abiotique et/ou biotique sur cette population en 2019, 2020 et 2021 (tableau 1).

Partenaire	Code	Contrainte appliquée	Adaptation visée
INRAE GDEC	CF	Déficit hydrique (Plateforme Phéno3C de l'UE PHACC)	Tolérance à la sécheresse
Agroscope	AG	Sous aspersion	Résistance à la germination sur pied (GSP)
Agri-Obtentions	AO	Faibles intrants (FI) (faible densité, azote et pesticides)	Rusticité
Limagrain	LG	Carences azotées	Valorisation de l'azote et efficacité de la plante
Florimond-Desprez	FD	Contamination septoriose	Résistance à la septoriose
Syngenta	SY	Contamination septoriose	Résistance à la septoriose
Unisigma	UN	Contamination rouille jaune	Résistance à la rouille jaune
RAGT 2n	RA	Multi-maladies (rouilles et septorioses)	Résistance aux maladies
IGEPP (Rennes)	IG	Pression naturelle de maladies	Résistance aux maladies

Tableau 1 : Contrainte(s) appliquée(s) par chaque partenaire sur sa sous-population CIS.

En 2021, chaque partenaire a choisi dans sa sous-population : une vingtaine de lignées ayant un bon comportement sous stress et une dizaine ayant au contraire un mauvais comportement pour contraste. Ceci a permis de constituer plusieurs panels spécifiques des différentes contraintes appliquées. De plus, un panel « agronomique » de 196 lignées intéressantes d'un point de vue agronomique global a aussi été extrait de ses sous-populations. Ces panels, multipliés et observés en 2022, ont été étudiés en 2023, soit en pépinières dans tous les lieux des partenaires (panel « agro »), soit selon leur spécificité dans les conditions adaptées. Certaines lignées figurent dans plusieurs panels. Le tableau 2 récapitule les différents panels et leur lieu d'observation en 2023.

Panel	Effectif	Lieux d'expérimentation
«agro»	196	AG+AO+CF+FD+IG+LG+RA+SY+UN
septo	159	FD+SY+RA+IG+AO
rouille jaune	120	UN+RA+IG+AO
rouille brune	90	RA+IG+AO
azote	60	LG+AO
germination sur pied	30	AG
sécheresse	30	CF

Tableau 2 : Constitution et observation des différents panels.

L'ensemble des 288 lignées ainsi obtenues a été génotypé par la plateforme INRAE Gentyane, d'une part avec la puce Axiom Affymetrix TaBW35K de 34 746 SNP (en même temps que les 31 blés synthétiques parents) et d'autre part avec les 192 marqueurs SNP utilisés sur la collection d'Ae.t (Volet 1). L'objectif est d'étudier la diversité des lignées issues de la population CIS et son éventuelle structuration, de faire une recherche de QTL par génétique d'association (GWAS Genome Wide Association Study) et d'identifier les fragments de génome D d'Ae.t intégrés dans ces lignées.

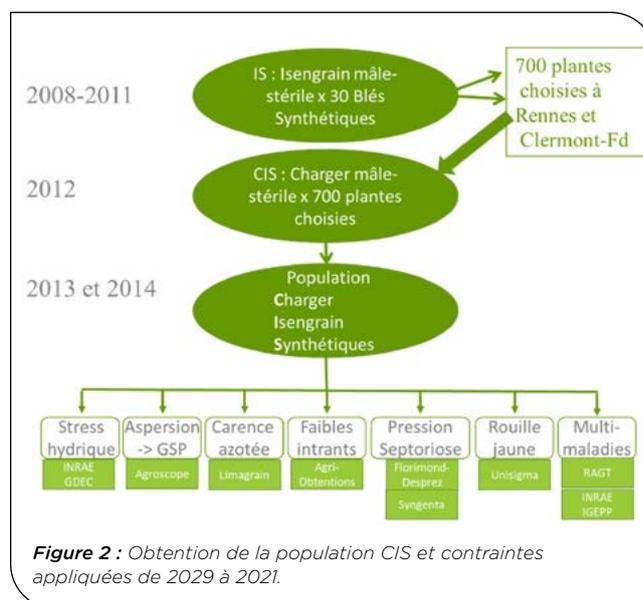


Figure 2 : Obtention de la population CIS et contraintes appliquées de 2019 à 2021.

3 Résultats

► Volet 1 - Collection d'*Aegilops tauschii*

La compilation de divers documents (anciens cahiers INRA de Versailles et Rennes) ont permis de compléter les informations disponibles sur cette collection. L'origine géographique (pays) est disponible pour 98 Ae.t. Les plus gros effectifs viennent d'Azerbaïdjan (32), d'Iran (21) et d'Afghanistan (19). Dans quelques cas, on dispose même de latitude et longitude. La sous-espèce, *ssp. strangulata* ou *ssp. tauschii*, n'était disponible que pour 47% des Ae.t.

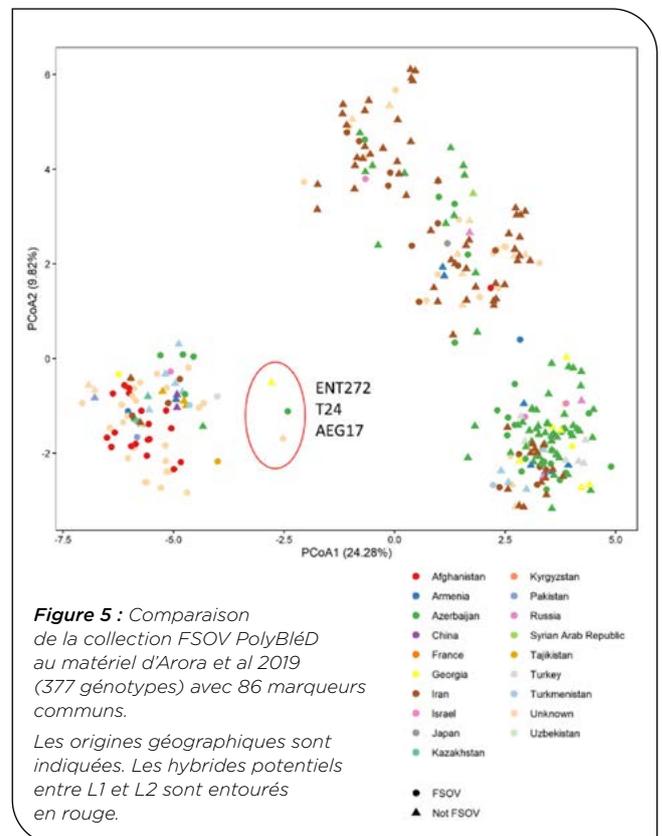
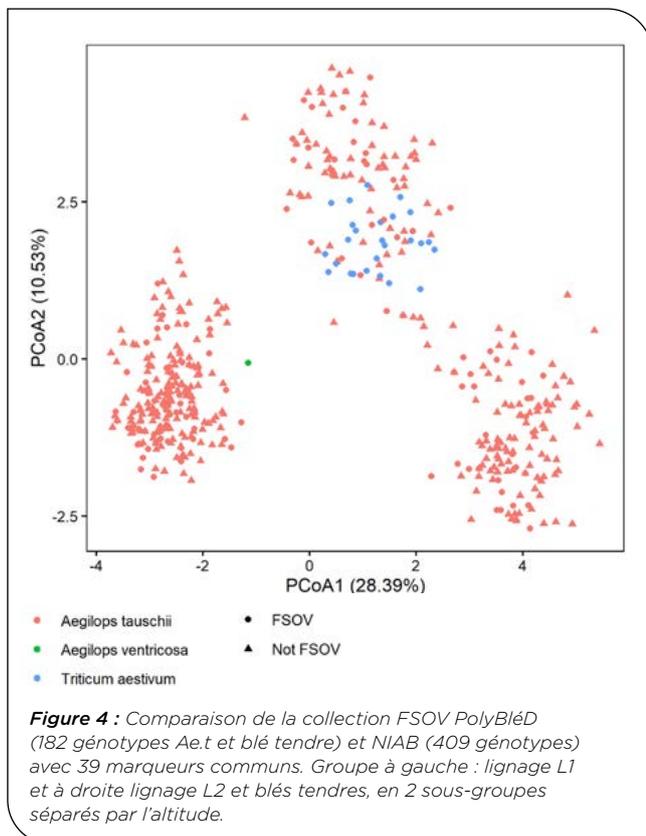
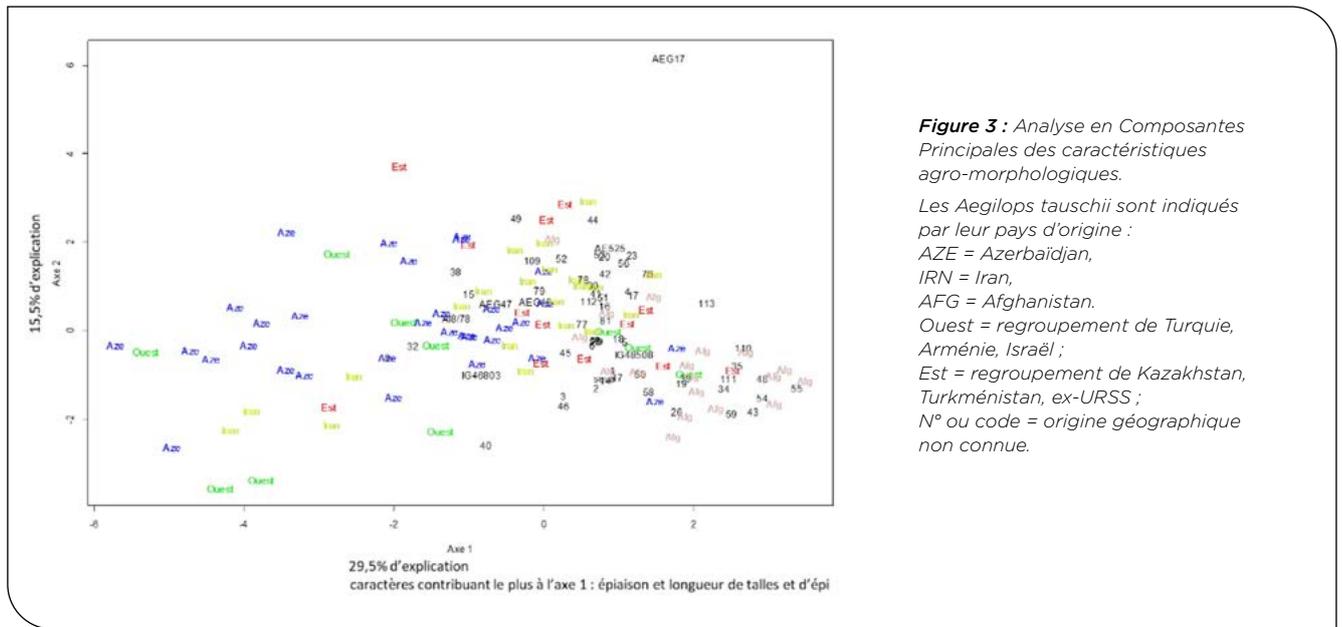
Sur les 158 accessions, deux n'ont pas germé : Tauschii-151 et AEG52. Les observations morphologiques ont permis d'émettre des hypothèses quant à leur sous-espèces (*ssp. strangulata*, *ssp. tauschii*), voire forme (*anathera*, *typica*, *meyeri*). De plus, 2 génotypes de morphologies suspectes ont été soumis à comptage chromosomique

ultérieur et se révèlent être tétraploïdes : AEG17 (très forte pilosité des glumes, espèce à déterminer) et *Aegilops tauschii* d'Arménie (dénomination erronée) qui serait en fait un *Aegilops cylindrica* (génomés D et C).

Une Analyse en Composantes Principale a été réalisée sur les caractéristiques agro-morphologiques (figure 3). Un gradient Ouest-Est apparaît sur le premier axe (qui explique 29,5% de la diversité) et auquel contribuent principalement la précocité, la longueur des talles et des épis ainsi que le nombre d'épilletts.

Notre collection a été comparée par le NIAB aux Ae.t de diverses collections (Agriculture and AgriFood

Canada (AAFC), Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO Australie), John Innes Center (JIC, Royaume-Uni), Kansas State University (KSU Etats-Unis d'Amérique et National Institut of Agricultural Botany (NIAB, Royaume-Uni), dont celle utilisée par Arora *et al.* 2019. Notre collection est assez représentative de la diversité globale des Ae.t avec des représentants dans tous les groupes décrits dans la littérature (Wang *et al.* 2013, Singh *et al.* 2019) : les marqueurs permettent de bien distinguer les lignages 1 et 2 (L1 sur une zone étendue de la Turquie à la Chine et L2 Caucase-Iran), ainsi que 2 génotypes potentiellement hybrides entre L1 et L2 ou appartenant



au lignage 3 décrit par Gaurav *et al.* (2021) et Mahjoob *et al.* (2021). L2 est considéré comme le groupe donneur du génome D du blé tendre et est séparé en 2 sous-groupes selon l'altitude. Ceci est illustré par les 2 figures 4 et 5 ci-contre.

De plus, nous avons identifié certains marqueurs polymorphes chez les Ae.t alors qu'ils sont totalement monomorphes sur les blés tendres présents, qui représentent pourtant une très large diversité.

► Volet 2 - Blés synthétiques

Le tableau 3 présente les blés synthétiques que nous avons réussi à obtenir dans le tableau de combinaisons. Tauschii-110 est le parent avec lequel nous avons eu le plus d'échecs : seul 4 combinaisons sont disponibles sur les 10 et elles ne concernent que 3 des 5 blés tétraploïdes. Le sens de croisement impliquant l'Ae.t en femelle est aussi le plus difficile : sur les 11 combinaisons manquantes 9 le sont avec Ae.t en femelle. Au final, 19 combinaisons sont obtenues sur les 30 espérées. Cependant, nous avons obtenu suffisamment de matériel végétal pour pouvoir faire de multiples

comparaisons : sens de croisements (6 cas possibles, impliquant les 3 Ae.t et les 5 blés tétraploïdes), comparaison d'un même Ae.t avec 5 blés différents (possible pour 2 Ae.t *ssp. tauschii* et *ssp. strangulata* : Tauschii-87 et Tauschii-109) et comparaison d'un blé avec 3 Ae.t différents (possible pour 3 blés, *T. durum* ou issus de *T.aestivum* : Isengrain-4x, Courtot-4x et Joyau). Pour obtenir de nouveaux blés synthétiques originaux, nous avons retenu les Ae.t et les blés présentés dans les tableaux 4 et 5.

Les 5 premiers Ae.t du tableau 4 ont été croisés uniquement avec Isengrain-4x en 2020. En l'absence de sauvetage d'embryons possible une partie de l'année (crise sanitaire covid), seuls les croisements Isengrain-4x/Tauschii-42 et AEG17/Isengrains-4x ont été fructueux (1 et 5 blés synthétiques obtenus respectivement). En 2022, les blés synthétiques suivants ont été obtenus, mais seront à confirmer : (F5 Soissons/Orlu)/Tauschii-66, (F5 Sculptur/Soissons)/Tauschii-24 et Tauschii-28/(F5 Soissons/Orlu). Suite aux croisements de 2023, Miradoux/Tauschii-28 est encore en cours de croissance.

	Tauschii-87 (<i>ssp. tauschii</i>)		Tauschii-109 (<i>ssp. strangulata</i>)		Tauschii-110 (<i>ssp. tauschii</i>)	
	Code	État d'obtention	Code	État d'obtention	Code	État d'obtention
Isengrain_4x	ISE87	Obtenu 2020 : 20DA1 x2	ISE109 (ISE)109	Obtenu 2019: 19DA5 x4 19DA5 x2	ISE110 (ISE) 110	Obtenu 2020: 20DA2 19DA6
	87ISE	Obtenu 2021: 21AD1 x1	109ISE	Obtenu 2021: 21AD5 x1	110ISE	MANQUANT
Courtot_4x	SYN87 (SYN)87	Obtenu 2019: 19DA1 19DA1	SYN109	Obtenu RE	SYN110	Obtenu RE
	87SYN	MANQUANT	109SYN 109(SYN)	MANQUANT 19AD6 x2	110SYN	Obtenu 2021: 21AD9 x1
Joyau	JOY87	Obtenu RE	JOY109	Obtenu RE	JOY110	Obtenu RE
	87JOY	MANQUANT	109JOY	Obtenu 2019 : 19AD9 x4	110JOY	MANQUANT
Coussur	CUR87	Obtenu 2021 : 21DA1 x5	CUR109	Obtenu CF : 11DA3	CUR110	MANQUANT
	87CUR	Obtenu 2019: 19AD2	109CUR	MANQUANT	110CUR	MANQUANT
Langdon	LAN87	Obtenu 2021 : 21DA3 x6	LAN109	Obtenu CF: 15DA1 x3 Obtenu 2019: 19DA5	LAN110	MANQUANT
	87LAN	MANQUANT	109LAN	Obtenu CF : 06AD1 x2 Obtenu 2019: 19AD10 x2	110LAN	MANQUANT

Fond jaune : sens de croisement Aegilops x Blé 4x
Fond gris : sens de croisement Blé 4x x Aegilops

en noir : Disponibles initialement (obtenus par INRA-IGEPP Rennes)
en violet : Disponibles initialement (obtenus par INRAE-GDEC Clermont-Ferrand)
en vert : Obtenus par PolyBléD 2019-2022 (en gris : à partir de SYN et ISE issus de FL)
en rouge : Manquants

Tableau 3 : Blés synthétiques disponibles.

Aegilops tauschii		
Géotype	Pays	Lignage
AEG17	-	L3 ou hybride
Tauschii-7	Iran	L2 haut
Tauschii-42	-	L2 bas
Tauschii-82	-	L2 haut
Tauschii-101	Iran	L2 bas
Tauschii-24	Azerbaïdjan	L3 ou hybride
Tauschii-28	-	L1
Tauschii-66	Afghanistan	L1

Tableau 4 : Aegilops tauschii utilisés pour de nouveaux croisements.

Blé tétraploïdes	
Géotype	Type
Anvergur	variété
Miradoux	variété
RGT Voilur	variété
Isengrain-4x	tétraploïde issu de blé tendre
F5 Soissons/Orlu	blé tendre x blé dur
F5 Sculptur/Soissons	blé dur x blé tendre

Tableau 5 : Blés tétraploïdes utilisés pour de nouveaux croisements.

Les blés synthétiques (tableau 6) présentant suffisamment de semences ont été observés en pépinière dans les différents sites.

	AEG17	Tauschii 42	Tauschii 87	Tauschii 109	Tauschii 110	
ISE femelle		1	2	4	1	8
ISE mâle	5		1	1		7
SYN femelle			1	1	1	3
SYN mâle					1	1
JOY femelle			1	1	1	3
JOY mâle				1		1
CUR femelle			5	1		6
CUR mâle			1			1
LAN femelle			6	3		9
LAN mâle				4		4
	43	5	1	17	16	4
			15	10	3	29
			2	6	1	14

Tableau 6 : Effectifs et origine généalogique des blés synthétiques observés en pépinière en 2023 (sommés en bout de lignes et colonnes).

Les blés synthétiques issus d'un même croisement ne montrent pas de différences phénotypiques marquantes. De même, le sens du croisement ne semble pas avoir d'influence sur le phénotype des blés synthétiques dans les 6 cas observés. En revanche, les croisements se distinguent nettement les uns des autres par leur aspect et colorations de feuillage et d'épi. Certains parents impriment fortement leurs caractéristiques sur les blés synthétiques. Notamment,

le blé Langdon, en mâle ou femelle, avec Tauschii-109 ou Tauschii-87, apporte sa hauteur, sa sensibilité à la verse et sa sensibilité à la rouille jaune. De même, le Ae.t Tauschii-87 apporte sa précocité lorsqu'il est croisé à Coussur, indépendamment du sens du croisement.

L'analyse transcriptomique des blés synthétiques révèle une faible proportion de modifications d'expression des gènes, soit environ 1% des gènes ayant modifié leur expression par rapport à celle de leurs parents. Le sous-génome D est particulièrement touché par ces modifications, comparativement aux deux sous-génomes A et B (figure 6). L'ontologie des gènes d'expression significativement modifiée par rapport à leurs parents, révèle cependant des caractères importants tels que des résistances à des stress biotiques et abiotiques.

Les résultats suggèrent que certaines modifications d'expression des gènes peuvent être héréditaires et reproductibles après la polyploïdisation, que ce soit dans des génotypes génétiquement similaires ou non (figure 7). Cependant, le sens de ces changements (sous-exprimés ou sur-exprimés) ne montre pas de cohérence lorsque l'on considère des génotypes génétiquement distincts (figure 7) ; certains gènes différenciellement exprimés (DEGs) sont sur-exprimés dans un génotype et sous-exprimés dans un autre, et vice versa. De plus, ces modifications d'expression sont spécifiques aux tissus, indiquant que les gènes affectés dans les feuilles diffèrent de ceux affectés dans les grains.

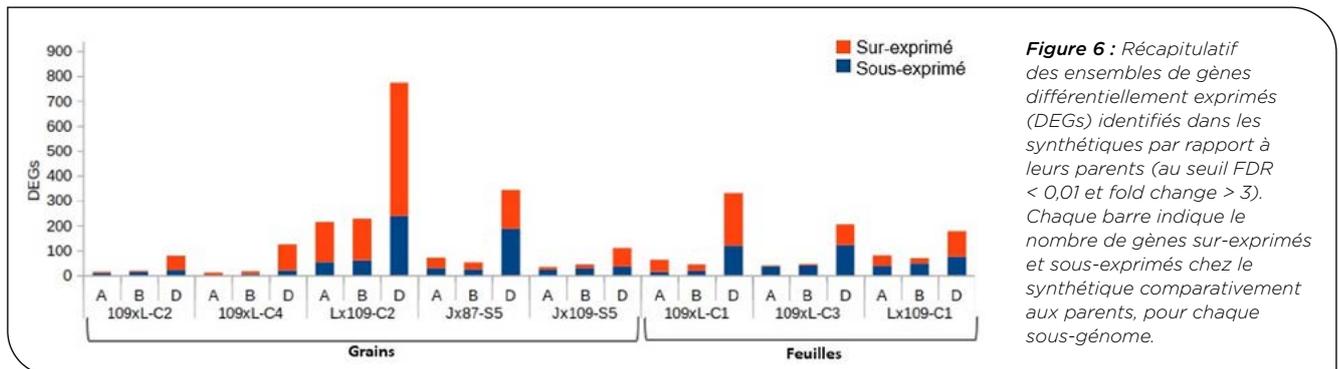


Figure 6 : Récapitulatif des ensembles de gènes différenciellement exprimés (DEGs) identifiés dans les synthétiques par rapport à leurs parents (au seuil FDR < 0,01 et fold change > 3). Chaque barre indique le nombre de gènes sur-exprimés et sous-exprimés chez le synthétique comparativement aux parents, pour chaque sous-génome.

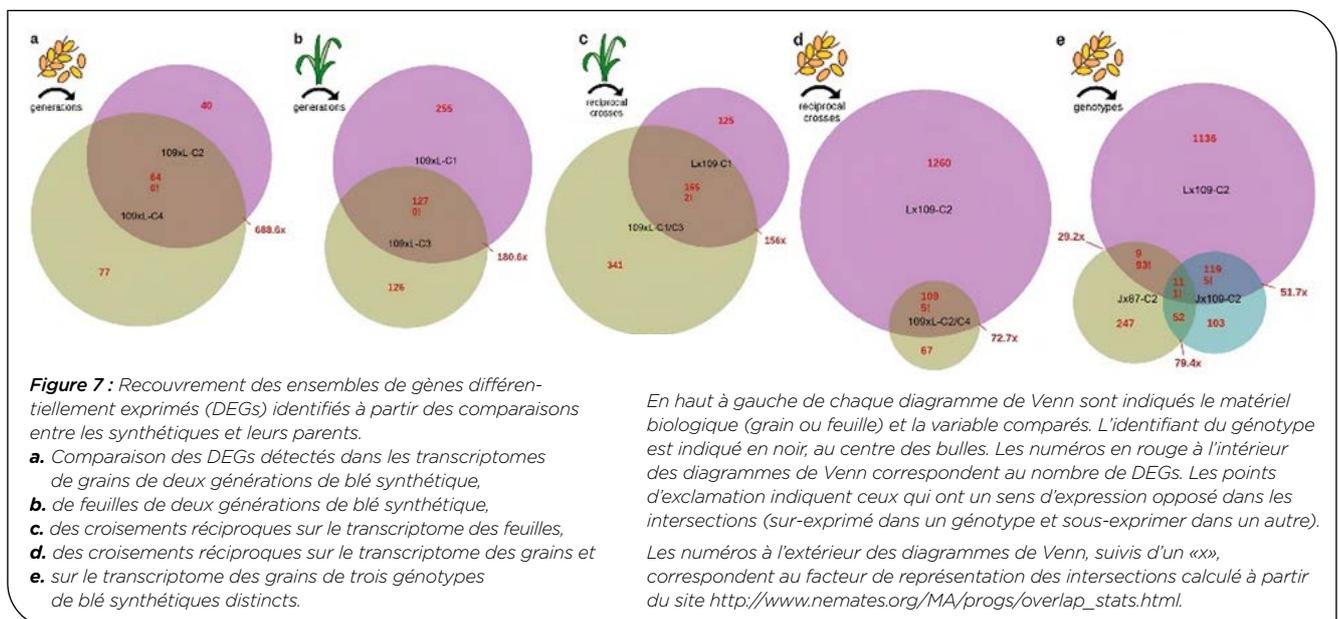


Figure 7 : Recouvrement des ensembles de gènes différenciellement exprimés (DEGs) identifiés à partir des comparaisons entre les synthétiques et leurs parents.

- a. Comparaison des DEGs détectés dans les transcriptomes de grains de deux générations de blé synthétique,
- b. de feuilles de deux générations de blé synthétique,
- c. des croisements réciproques sur le transcriptome des feuilles,
- d. des croisements réciproques sur le transcriptome des grains et
- e. sur le transcriptome des grains de trois génotypes de blé synthétiques distincts.

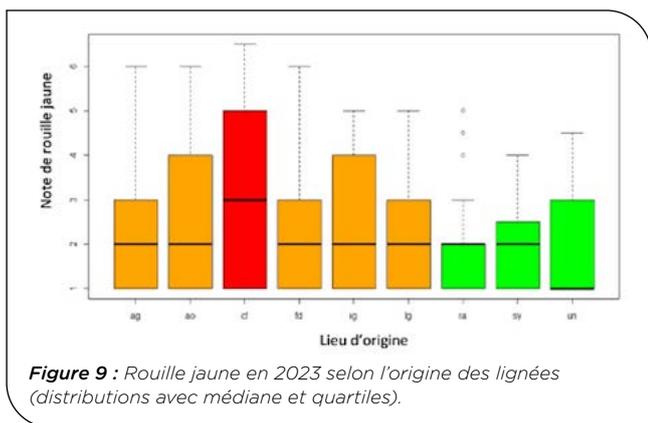
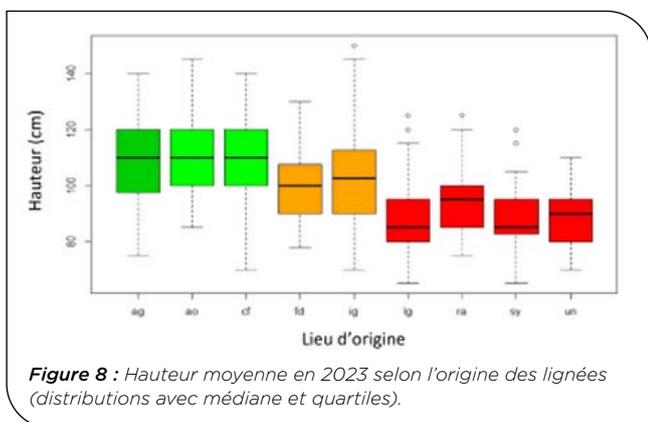
En haut à gauche de chaque diagramme de Venn sont indiqués le matériel biologique (grain ou feuille) et la variable comparés. L'identifiant du génotype est indiqué en noir, au centre des bulles. Les numéros en rouge à l'intérieur des diagrammes de Venn correspondent au nombre de DEGs. Les points d'exclamation indiquent ceux qui ont un sens d'expression opposé dans les intersections (sur-exprimé dans un génotype et sous-exprimer dans un autre).

Les numéros à l'extérieur des diagrammes de Venn, suivis d'un «xx», correspondent au facteur de représentation des intersections calculé à partir du site http://www.nemates.org/MA/progs/overlap_stats.html.

► Volet 3 - lignées dérivées

Le panel « agro », observé dans plusieurs lieux en 2023, a permis de caractériser et d'identifier des géniteurs potentiels (résistances aux maladies, précocité et hauteurs contrastées) (Albert, 2023). Ce dispositif nous a aussi permis d'étudier l'impact éventuel de la contrainte appliquée sur les groupes de lignées originaires de ces lieux. On ne distingue pas d'effet origine sur la précocité moyenne des lignées. Par contre, la figure 8 illustre les différences de hauteurs selon l'origine des lignées. Les lignées venant d'AG (aspersion pour GSP), AO (Faibles Intrants) et CF (sécheresse) sont plus hautes que celles venant de IG, RA, SY et UN (maladies). On constate pour la rouille jaune (figure 9), que ce sont les lignées venant de UN (pression rouille jaune) qui se révèlent en effet être les plus résistantes. Par contre, cela ne se retrouve pas pour la septoriose (lignées de IG et SY assez touchées). En revanche, les lignées de IG (pression naturelle de maladies) sont les plus résistantes à la rouille brune.

Au niveau moléculaire par contre, l'Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) réalisée avec les 192 marqueurs du génome D ne met pas en évidence de structuration de la population.



Pour les panels « sécheresse », « GSP » et « azote », le faible effectif et une évaluation limitée à un lieu ne permet pas d'envisager de la GWAS. En effet, pour le panel « azote », l'expérimentation LG carencée a échoué et de même pour la conduite ordinaire de Phéno3c sur le panel « sécheresse ». Nous ne disposons donc que des conduites « non carencée » et « déficit hydrique ». Ceci ne permet plus les comparaisons espérées. Nous pouvons cependant repérer des lignées se comportant correctement en déficit hydrique et l'expérimentation

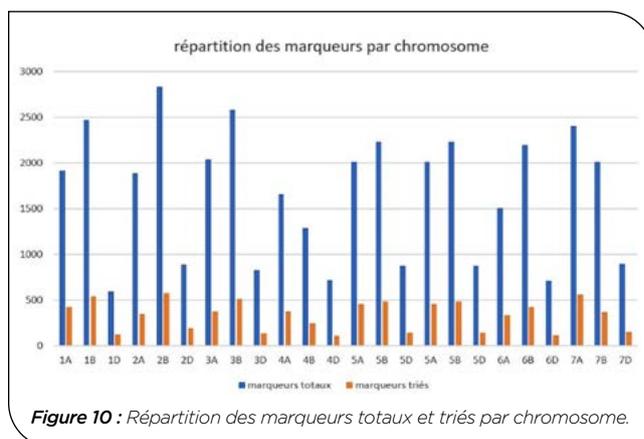
sous Phéno3C sera reconduite en 2024. Pour le panel GSP, la mesure des temps de chute de Hagberg entre les conditions stressées (aspersion) et non stressées indique que les bonnes lignées ont bien été identifiées en 2022 mais ces meilleures lignées issues de la population CIS n'atteignent pas des valeurs supérieures au-delà des bons témoins blés.

Par contre, pour les 3 panels et le panel « agro », la GWAS est en cours avec les données de 2023.

Le tri des marqueurs de la puce TaBW35k a conduit à une réduction drastique du nombre de marqueurs selon le tableau 7. Les OTV (Off-Target Variants) ont été assimilés à des données manquantes. La cause principale de cette perte de marqueurs est le monomorphisme. Au final, nous ne conserverons que 7055 marqueurs pour la GWAS. La répartition de ces marqueurs entre les 3 sous-génomes n'a pas été modifiée par cette réduction (figure 10). Comme attendu, le sous-génome D est celui pour lequel nous avons le moins de marqueurs (13,8% du total seulement) et le B le plus (45,1%). Pour cela, le complément des 192 marqueurs spécifiques du génome D d'Ae.t sera intéressant.

Cause	Nombre de marqueurs éliminés	Nombre de marqueurs restant	Pourcentage d'élimination
Nombre de SNP de TaBW35K		34 746	
Marqueurs non reproductibles (sur puce TaBW420K, en commun)	3 913	30 833	11,3
Marqueurs présentant plus de 10% de données manquantes ou OTV	710	30 123	2,3
Marqueurs présentant plus de 5% d'hétérozygotes	815	29 308	2,7
Marqueurs monomorphes	20 898	8 410	71,3
Marqueurs dont la fréquence de l'allèle minoritaire est inférieure à 1%	1 355	7 055	16,1
Au total	27 691	7 055	79,7

Tableau 7 : Effectif de marqueurs de la puce TaBW35k éliminés successivement et raison de leur retrait.



En ce qui concerne les 288 lignées, une (CIS21lg05) a dû être éliminée en raison d'un très fort nombre de données manquantes (probablement dû à un problème d'extraction d'ADN) et 12 autres lignées sont éliminées en raison d'une fréquence de données manquantes supérieure à 10% et/ou hétérozygotie supérieure à 5%.

On peut noter que les OTV sont présents en plus grand nombre sur les blés synthétiques ayant le blé dur JOY pour parent.

4 Discussion

► Volet 1 - Collection d'*Aegilops tauschii*

Cette collection INRAE d'Ae.t, complétée par Agroscope, avait déjà été partiellement utilisée par INRAE-IGEPP (Mestiri *et al.*, 2010). Cependant, dans l'objectif de poursuivre son utilisation, elle manquait de documentation précise et notamment de comparaison avec la diversité mondiale (Ae.t, blés synthétiques et blés tendres). Le programme FSOV PolyBléD a permis de la caractériser de façon plus approfondie par collecte d'informations, caractérisation agro-morphologique et marquage moléculaire.

Afin de rechercher de la diversité moléculaire complémentaire du blé tendre dans les Ae.t, il faut veiller à utiliser des techniques adaptées à la question posée car par exemple les SNP développés pour le blé tendre à partir du polymorphisme présent à l'intérieur de l'espèce sont logiquement moins nombreux sur le génome D et passent probablement à côté de la nouvelle diversité qui nous intéresse (Winfield *et al.* 2016). Nous nous sommes pour cela appuyés sur les SNP mis au point par le NIAB spécialement sur *Aegilops*. Les génotypes ont ainsi pu être situés par rapport aux différents lignages (L1, L2 et même L3 ou hybride L1xL2, ce point sera à confirmer) et à certains Ae.t de 5 collections (AAFC, CSIRO, JIC, KSU et NIAB). Il en ressort que cette collection présente des génotypes très diversifiés et bien répartis dans tous les lignages. Nous avons pu identifier des synonymes et repérer quelques doublons et aussi repérer des Ae.t intéressants à croiser dans le volet 2. Quelques Ae.t qui semblent originaux pourraient être intéressants à proposer pour le projet européen Pro-Wild, voire dans le consortium Open Wild Wheat (OWWC).

La comparaison directe avec la diversité blé tendre reste limitée car nous n'avons génotypé simultanément que 32 blés tendres avec ces 192 SNP du génome D. Ces blés représentaient cependant une très grande diversité et peuvent ainsi donner des indications sur des zones chromosomiques qui pourraient être enrichies en diversité par ces Ae.t. De plus, via la puce TaBW35k, nous avons maintenant accès à la diversité de plus de 6500 blés tendres, dont la diversité sur le sous-génome D pourra être comparée à 31 de nos Ae.t grâce aux 31 blés synthétiques correspondants génotypés sur cette même puce. Des études bio-informatiques sur les zones enrichies en diversité par les Ae.t pourraient indiquer les caractères potentiellement touchés.

Le gradient agro-morphologique Est-Ouest constaté est probablement lié à la répartition géographique des lignages L1 et L2. La caractérisation agro-morphologique,

bien que succincte car réalisée seulement sur deux plantes en serre, permet néanmoins un choix plus aisé des génotypes Ae.t à croiser avec des blés tétraploïdes. Ce travail a d'ailleurs été commencé dans le volet 2.

► Volet 2- Blés synthétiques

Le choix des Ae.t à croiser en 2020 s'est fait essentiellement sur des caractéristiques morphologiques car nous ne disposions pas encore des données de génotypage. En revanche pour 2022 et 2023, nous avons choisi des Ae.t apportant semble-t-il un nouveau polymorphisme moléculaire a priori. Yvonnet (2022) a tenté par bio-informatique d'identifier les gènes présents dans ces zones et en a identifié 11 dont 7 pour lesquels le SNP est directement dans la séquence. Les effets de ces modifications restent cependant largement hypothétiques.

En ce qui concerne l'obtention des blés synthétiques, on constate, de même que le NIAB nous l'avait signalé, qu'il est bien plus difficile d'obtenir des blés synthétiques avec le lignage L1 que le L2, alors qu'il apporterait potentiellement le plus de diversité, étant plus éloigné des blés tendres (figure 4). Avec le lignage L1, dans le sens de croisement Ae.t/blé, nous obtenons suffisamment de grains mais peu d'embryons dans les grains formés alors que dans le sens opposé (Ae.t en mâle), nous obtenons très peu de grains mais avec plus souvent des embryons. L'étape qui nous pose le plus de difficulté reste la régénération de plantules à partir des embryons mis en culture, malgré des tests avec des milieux légèrement différents. Ce point serait à améliorer dans nos conditions de laboratoire.

Des travaux de la littérature suggèrent une plasticité génomique (forte modification de l'expression des gènes) du sous-génome D (issu d'*Aegilops*) chez le synthétique issu du croisement entre l'Ae.t (D) et le blé dur (AB) par rapport aux parents respectifs. En d'autres termes, le génome D chez le synthétique serait clairement remobilisé avec de fortes expressions de gènes par rapport au parent Ae.t. Nos résultats publiés en 2023 dans la revue scientifique BMC genomics, montrent que la plupart de ces différences sont probablement dues à des biais d'analyse des séquences produites dans le cadre d'études précédentes. La mise en œuvre d'une méthode précise et complexe d'analyse des données de séquence démontre que peu de gènes ont une expression différente chez les polyploïdes synthétiques par rapport à leurs parents. Néanmoins, malgré le faible effet de reprogrammation génomique post-polyploïdie, les gènes dont l'expression est modifiée chez le synthétique néoformé, sont principalement sur le sous-génome D, sont héréditaires (c'est-à-dire maintenu dans leur expression entre générations) et peuvent être reproduits dans différentes combinaisons parentales. Il est également important de noter que cette reprogrammation de l'expression des gènes peut se comporter de manière différente dans des synthétiques génétiquement différents (certains gènes sont sur-exprimés dans un génotype et sous-exprimés dans un autre). Cette observation est pertinente lorsqu'on considère la possibilité d'une variation de la reprogrammation génomique en fonction des caractéristiques génétiques des différents génotypes, offrant ainsi des opportunités pour exploiter une nouvelle diversité génétique pour l'amélioration du blé.

Cependant, L'observation de variations substantielles dans le changement d'expression des gènes entre différents tissus souligne la nature dynamique et non permanente de ces modifications, même au sein d'un même génotype, dépendant du type de tissu.

► Volet 3 - lignées dérivées

L'implantation de la population CIS, dérivée de 31 blés synthétiques croisés avec Isengrain-ms puis Charger-ms, sous diverses contraintes biotiques et abiotiques nous a permis d'extraire, de caractériser et d'identifier des lignées améliorées pour des caractéristiques ciblées.

L'impact de l'origine des lignées, selon la contrainte appliquée, est visible sur certains caractères (la hauteur, la rouille jaune) mais pas sur d'autres (épiaison, septoriose). Ils touchent des caractères visés ou non. La durée d'application du stress (3 ans) était relativement brève et ceci peut expliquer que l'impact ne soit pas visible sur la PcoA réalisé sur les 192 marqueurs du génome D. Le marquage par la puce TaBW35k, incluant aussi les sous-génomes A et B sera peut-être plus révélateur.

En vue de l'étude de génétique d'association (GWAS), un tri des marqueurs de la puce TaBW35K a été réalisé. Il révèle que le nombre de marqueurs monomorphes sur ce matériel est très important. Les sous-génomes A et B de cette population ne proviennent que de 4 génotypes : Charger-ms, Isengrain-ms, Courtot-4x et Joyau (blé dur). La présence d'OTV plus importante sur les lignées venant de Joyau pourrait s'expliquer par le fait que ces marqueurs ont été mis au point sur blé tendre et non blé dur. De même, sur cette puce, contrairement aux 192 SNP spécifiques d'*Aegilops*, les

marqueurs du sous-génome D blé tendre peuvent être moins adaptés à celui d'*Ae.t.*

La GWAS est encore en cours et devrait permettre d'identifier de nouveaux QTL sur le génome D, en particulier pour les maladies.

Les résultats de génotypage SNP des lignées intéressantes pour les contraintes abiotiques seront aussi étudiés de près, pour identifier l'apport éventuel de ce génome D diversifié.

Plusieurs lignées, dérivées de cette population et potentiellement intéressantes, ont déjà été intégrées notamment dans le programme de sélection blé tendre INRAE (en essais en 2024) ou seront utilisées en croisements dans ce programme et ceux des partenaires, attestant de l'intérêt agronomique des livrables du programme PolyBléD.

Remerciements

Merci au personnel de Gentyane pour les données fournies et de Végépole et l'UE PHACC pour leur aide.

Toutes les personnes (stagiaires, CDD, post-doctorants et techniciens) qui sont intervenues ponctuellement ou plus longuement dans ce programme depuis 2018 sont ici chaleureusement remerciées pour leur travail :

INRAE GDEC : ALBERT Amandine, BAS Honorine, DUCHEMIN Wandrille, EXBRAYAT-VINSON Florence, GATEAU Isabelle, PLASSE Pauline, PUREUR Emma, TÉNART Axelle, YVONNET Célestine ;

AGROSCOPE : BERNARD Pauline, BROQUET Camille.

Références bibliographiques

Albert A. (2023) Le potentiel agronomique de lignées issues de blés synthétiques face aux enjeux actuels. Rapport BUT2 Génie biologique option Agronomie Univ. Lyon-1. 20 p.

Arora S., Steuernagel B., Gaurav K., Chandramohan S., Long Y., Matny O., Johnson R., Enk J., Periyannan S., Singh N., Asyraf Md Hatta M., Athiyannan N., Cheema J., Yu G., Kangara N., Ghosh S., Szabo L.J., Poland J., Bariana H., Jones J.D.G., Bentley A.R., Ayliffe M., Olson E., Xu S.S., Steffenson B.J. (2019) Resistance gene cloning from a wild crop relative by sequence capture and association genetics. *Nature Biotechnology* www.nature.com/naturebiotechnology

Balfourier F., Bouchet S., Robert S., de Oliveira R., Rimbart H., Kitt J., Choulet F., International Wheat Genome Sequencing Consortium, BreedWheat Consortium, Paux E. (2019) Worldwide phylogeography and history of wheat genetic diversity. *Sci. Adv.* 5: eaav0536

Banouh M., Armisen D., Bouguennec A., Huneau C., Dia Sow M., Pont C., Salse J. et Civián P. (2023) Low impact of polyploidization on the transcriptome of synthetic allohexaploid wheat. *BMC Genomics* 24, 255. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09324-2>

Bento M., Gustafson J.P., Viegas V.W., Silva, M. (2011) Size matters in Triticeae polyploids: larger genomes have higher remodeling. *Genome* 54(3): 175-183

Brisson N., Gate P., Gouache D., Charmet G., Oury F.X., Huard F. (2010) Why are wheat yields stagnating in Europe? A comprehensive data analysis for France. *Field Crops Res.* 119: 201-212.

Chagué V., Just J., Mestiri I., Balzergue S., Tanguy A.M., Huneau C., Huteau V., Belcram H., Coriton O., Jahier J., Chalhou B. (2010) Genome-wide gene expression changes in genetically stable synthetic and natural wheat allohexaploids *New Phytologist* 187: 1181-1194. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03339.x

Chu C.G., Faris J.D., Friesen T.L., Xu S.S. (2006) Molecular mapping of hybrid necrosis genes Ne1 and Ne2 in hexaploid wheat using microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 112:1374-1381

Das M., Bai K., Mujeeb-Kazi G., Sanjaya A.R. (2016) Genetic diversity among synthetic hexaploid wheat accessions (*Triticum aestivum*) with resistance to several fungal diseases. *Genetic Resources and crop evolution* 63(8): 1285-1296 DOI: 10.1007/s10722-015-0312-9

Duchalais L., Caiveau S., Beghin D., Duperrier B., Auzanneau J., Debiton C., Bouguennec A., Jahier J., Rolland B. (2017) Valorisation de nouveaux gènes de résistance et de qualité issus d'*Aegilops tauschii*. Colloque FSOV du 23 mars 2017 Synthèses des programmes de recherche FSOV 2012, 79-92.

- Dvorak J., Luo M. C., Yang Z.L., Zhang H.B.** (1998) The structure of the *Aegilops tauschii* genepool and the evolution of hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 97: 657-670.
- Elbashir A.A.E., Gorafi Y.S.A., Tahir I.S.A., Kim J.S., Tsujimoto H.** (2017) Wheat multiple synthetic derivatives: a new source for heat stress tolerance adaptive traits. *Breeding Science Preview* doi:10.1270/jsbbs.16204
- Feldman M., Liu B., Segal G., Abbo S., Levy A.A., Vega J.M.** (1997) Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics* 147: 1381-1387.
- Feldman M. and Levy A.A.** (2012) Genome evolution due to allopolyploidization in wheat. *Genetics* 192(3): 763-774
- Gaurav et al.** (2021) Population genomic analysis of *Aegilops tauschii* identifies targets for bread wheat improvement. *Nature Biotechnology* 40, 422-431
- Ginkel M. van, Ogonnaya F., Imtiaz M., Ramage C., Borgognone M. G., Dreccer F., Eder J., Emmerling M., Hearnden P., Lagudah E., Pellegrineschi A., Trethowan R., Wilson J., Spangenberg G.** (2007) Molecular breeding for salt tolerance, pre-harvest sprouting resistance and disease resistance using synthetic hexaploid wheats, genetic transformation, and associated molecular markers. Wheat production in stressed environments. Proceedings of the 7th International Wheat Conference, Mar del Plata, Argentina, 27 November - 2 December 2005 Pages: 383-385 Editors: Buck H. T., Nisi J. E., Salomon N.
- Gorafi Y.S.A., Kim J.S., Elbashir A.A.E., Tsujimoto H.** (2018) A population of wheat multiple synthetic derivatives: an effective platform to explore, harness and utilize genetic diversity of *Aegilops tauschii* for wheat improvement. *Theoretical and Applied Genetics* (2018) 131:1615-1626 - <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3102-x>
- Gosman N., Jones H., Hornsnell R., Kowalski A., Rose G., Everest L., Bentley A., Tha S., Uauy C. Novoselovic D., Simek R., Kobiljski B., Kondic-Spika A., Mitrofanova O., Chesnokov Y., Greenland A.** (2012) Exploitation of novel functional D-genome diversity in synthetic hexaploid wheat. 19th Eucarpia general congress. Plant breeding for future generation, p73-76. Budapest, Hungary. Ed Zoltan Bedö and Laszlo Lang.
- Haudry A., Cenci A., Ravel C., Bataillon T., Brunel D., Poncet C., Hochu I., Poirier S., Santoni S., Glemin S., David J.** (2007) Grinding up wheat: A mass loss of nucleotide diversity since domestication. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1506-1517.
- He P., Friebe B.R., Gill B.S., Zhou J.M.** (2003). Allopolyploidy alters gene expression in the highly stable hexaploid wheat. *Plant Molecular Biology* 52: 401-414. Huang X.Q., Cöster H., Ganai M.W., Röder M.S. (2003) Advanced backcross QTL analysis for the identification of quantitative trait loci alleles from wild relatives of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* (2003) 106(8): 1379-1389. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1179-7>
- Jones H., Gosman N., Hornsnell R., Rose G. A., Everest L. A., Bentley A. R., Tha, S. Uauy C., Kowalski A., Novoselovic D., Simek R., Kobiljski B., Kondic-Spika A., BrBaklic L., Mitrofanova O., Chesnokov Y., Bonnett D., Greenland A.** (2013) Strategy for exploiting exotic germplasm using genetic, morphological, and environmental diversity: the *Aegilops tauschii* Coss. Example. *Theor. Appl. Genet.* 126(7): 1793-1808.
- Jordan K.W., Wang S., Lun Y., Gardiner L.J., MacLachlan R., Hucl P., Wiebe K., Wong D., Forrest K.L., IWGS Consortium, Sharpe A.G., Sidebottom C.H., Hall N., Toomajian C., Close T., Dubcovsky J., Akhunova A., Talbert L., Bansal U.K., Bariana H.S., Hayden M.J., Pozniak C., Jeddelloh J.A., Hall A., Akhunov E.** (2015) A haplotype map of allohexaploid wheat reveals distinct patterns of selection on homoeologous genomes. *Genome Biol.* 2015 Feb 26;16:48. doi: 10.1186/s13059-015-0606-4.
- Kabbaj H., Sall A.T., Al-Abdallat A., Geleta M., Amri A., Filali-Maltouf A., Belkadi B., Ortiz R., Bassi F.M.** (2017) Genetic diversity within a global panel of durum wheat (*Triticum durum*) landraces and modern germplasm reveals the history of alleles exchange. *Front Plant Sci.* 2017 Jul 18;8:1277. doi: 10.3389/fpls.2017.01277. eCollection 2017.
- Li A., Liu D., Wu J., Zhao X., Hao M., Geng S., Yan J., Jiang X., Zhang L., Wu J., Yin L., Zhang R., Wu L., Zheng Y., Mao L.** (2014) mRNA and small RNA transcriptomes reveal insights into dynamic homoeolog regulation of allopolyploid heterosis in nascent hexaploid wheat. *Plant Cell.* 26(5): 1878-1900.
- Li A.L., Geng S.F., Zhang L.Q., Liu D.C., Mao L.** (2015) Making the bread: insights from newly synthesized allohexaploid wheat. *Mol Plant.* 8(6): 847-59.
- Luo M.C., Gu Y.Q., Puiu D., Wang H., Twardziok S.O., Deal K.R., Huo N.X., Zhu T.T., Wang L., Wang Y., (...), Leroy P., (...), Dvorak J.** (2017) Genome sequence of the progenitor of the wheat D genome *Aegilops tauschii*. *Nature* 551(7681): 498-+ DOI: 10.1038/nature24486
- Mahjoob et al.** (2021) Traits to differentiate lineages and subspecies of *Aegilops tauschii*, the D genome progenitor species of bread wheat. *Diversity* 2021, 13, 217. <https://doi.org/10.3390/d13050217>
- Mestiri, I., Chague V., Tanguy A. M., Huneau C., Huteau V., Belcram H., Coriton O., Chalhoub B., Jahier J.** (2010) Newly synthesized wheat allohexaploids display progenitor-dependent meiotic stability and aneuploidy but structural genomic additivity. *New Phytol* 186: 86-101.
- Mujeeb-Kazi A., Rosas V., Roldan S.** (1996) Conservation of the genetic variation of *Triticum tauschii* (Coss.) Schmalh. (*Aegilops squarrosa* auct. Non L.) in synthetic hexaploid wheats (*T. turgidum* L. s.lat. x *T. tauschii*; 2n = 6x = 42, AABBDD) and its potential utilization for wheat improvement. *Genetic Resources and crop evolution* 43: 129-134.
- Murashige T. and Skoog F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiologia plantarum* 15 (3), 473-497
- Naghavi, M. R., Mardi, M., Pirseyedi, S. M., et al.** (2008) Evaluation of genetic diversity in the subspecies of *Aegilops tauschii* using microsatellite markers *Cereal Research Communications* 36(1): 21-31.
- Ogonnaya F. C., Imtiaz M., Bariana H. S., McLean M., Shankar M. M., Holloway G. J., Trethowan R. M., Lagudah E. S., Ginkel M. van** (2008) Mining synthetic hexaploids for multiple disease resistance to improve bread wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* 59(5): 421-431 DOI: 10.1071/AR07227
- Okamoto Y., Kajimura T., Ikeda T.M., Takumi S.** (2012) Evidence from principal component analysis for improvement of grain shape- and spikelet morphology-related traits after hexaploid wheat speciation *Genes & Genetic systems* 87(5): 299-310.

Plasse P. (2019) Suivi et description d'une collection d'*Aegilops tauschii* en vue de l'élargissement de la diversité génétique du blé tendre. Rapport DUT Génie biologique option Agronomie Univ. Clermont Auvergne. 20 p.

Pont C., Murat F., Confolent C., Balzergue S., Salse J. (2011) RNA-seq in grain unveils fate of neo- and paleopolyploidization events in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) *Genome Biology* 2011, 12: R119

Pont C., Salse J. (2017) Wheat paleohistory created asymmetrical genomic evolution. *Curr Opin Plant Biol.* 2017 Apr., 36: 29-37.

Qiu T., Dong Y.Z., Yu X.M., Zhao N., Yang Y.F. (2017) Analysis of allopolyploidy-induced rapid genetic and epigenetic changes and their relationship in wheat. *Genet Mol Res.* 2017 Apr 5;16(2). doi: 10.4238/gmr16029303.

Reif J.C., Zhang P., Dreisigacker S. et al. (2005) Wheat genetic diversity trends during domestication and breeding. *Theor. Appl. Genet.* 110(5): 859-864.

Roussel V., Koenig J., Beckert M., Balfourier F. (2004) Molecular diversity in French bread wheat accessions related to temporal trends and breeding programmes. *Theor Appl Genet* 108: 920-930.

Sakaguchi K., Nishijima R., Iehisa J. C. M., Takumi S. (2016) Fine mapping and genetic association analysis of *Net2*, the causative D-genome locus of low temperature-induced hybrid necrosis in interspecific crosses between tetraploid wheat and *Aegilops tauschii* *Genetica* 144(5): 523-533.

Singh N., Wu S., Tiwari V., Sehgal S., Raupp J., Wilson D., Abbasov M., Gill B., Poland J. (2019) Genomic analysis confirms population structure and identifies inter-lineage hybrids in *Aegilops tauschii*. *Front. Plant Sci.* 10:9. doi: 10.3389/fpls.2019.00009

Sisodia N.S. and McGinnis R.C. (1970) Importance of Hexaploid Wheat Germ Plasm in Hexaploid Triticale Breeding. *Crop Science* 10 :161-162

Sohail Q., Inoue T., Tanaka H., Eltayeb A.E., Matsuoka Y., Tsujimoto, H. (2011) Applicability of *Aegilops tauschii* drought tolerance traits to breeding of hexaploid wheat. *Breeding Science* 61(4): 347-357. DOI: 10.1270/jsbbs.61.347.

Sohail Q., Shehzad T., Kilian A., Eltayeb A.E., Tanaka H., Tsujimoto H. (2012) Development of diversity array technology (DArT) markers for assessment of population structure and diversity in *Aegilops tauschii*. *Breeding Science* 62(1): 38-45. DOI: 10.1270/jsbbs.62.38

Tsujimoto H., Sohail Q., Matusoka Y. (2015) Broadening the genetic diversity of common and durum wheat for abiotic stress tolerance breeding. In: Oginara Y., Takumi S. and Handa H. (eds.) *Advances in Wheat Genetics: From genome to field.* Proceedings of the 12th International Wheat Genetics Symposium. Springer, Yokohama, Japan, pp. 233-238.

Tsunewaki K. (1960) Monosomic and conventional gene analysis in common wheat. III. Lethality. *Jpn J Genet* 35: 594-601.

van Slageren M.W. (1994) Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. et Spach) Eig (Poaceae). ICARDA and Wageningen Agric. Univ. 94 p. 512.

Wang S. et al. (2014) Characterization of polyploidy wheat genomic diversity using a high-density 90 000 single nucleotide polymorphism array *Plant Biotechnology Journal* 12, 787-796

Winfield M.O., Allen A.M., Burrige A.J., Barker G.L.A., Benbow H.R., Wilkinson P.A., Coghill J., Waterfall C., Davassi A., Scopes G., Pirani A., Webster T., Brew F. C., Bloor C., King J., West C., Griffiths S., King I., Bentley A.R., Edwards K.J. (2016) High-density SNP genotyping array for hexaploid wheat and its secondary and tertiary gene pool *Plant Biotechnology Journal* 14: 1195-1206.

Yang C., Zhao L., Zhang H., Yang Z., Wang H., Wen S., Zhang C., Rustgi S., von Wettstein D., Liu B. (2014) Evolution of physiological responses to salt stress in hexaploid wheat. *PNAS USA.* 111(32): 11882-7.

Yu M., Guan L.L., Chen G.Y., Pu Z.E., Hou D.B. (2017) Allopolyploidy-induced rapid genomic changes in newly generated synthetic hexaploid wheat. *Biotechnology & Biotechnological equipment* 31(2): 236-242. <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2016.1273797>

Yvonnet C. (2022) Analyse et exploitation du génome D d'*Aegilops tauschii* pour la production de blés tendres adaptés aux changements à venir. Master 1 Biologie des plantes pour l'agroenvironnement, Université de Montpellier

Zhang P., Hiebert C.W., McIntosh R.A., McCallum B.D., Thomas J.B., Hoxha S., Singh D., Bansal U. (2016) The relationship of leaf rust resistance gene *Lr13* and hybrid necrosis gene *Ne2m* on wheat chromosome 2BS. *Theor Appl Genet* 129: 485-493.

PolyBléD : Quelles nouvelles polyploïdisations réaliser pour une meilleure adaptation du blé tendre aux contraintes à venir ?

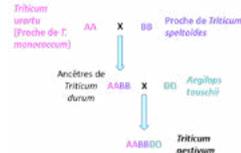
Annaig BOUGUENNEC¹, Rémi PERRONNE², Bernard ROLLAND³, Alison BENTLEY³, Keith GARDNER³, Tally WRIGTH³, Dario FOSSATI⁴, Laure DUCHALAIS⁵, Sylvain CHOMBART⁶, Constance LAVERGNE⁷, Gabriel BEUDIN⁸, Alexis OGER⁹, Auberi AVALLE¹⁰, Meriem BANOUH¹, Peter CIVÁŇ¹, Jérôme SALSE¹

1 - INRAE, UCA, GDEC, 63000 Clermont-Ferrand, FRANCE
 2 - INRAE, Institut Agro, Univ. Rennes, IGEPP, 35653 Le Rheu, FRANCE
 3 - NIAB, CB3 Cambridge OLE, ROYAUME-UNI
 4 - Agroscope, 1200 Nyon 1, SUISSE
 5 - Agri-Obtentions, 78660 Orsonville, FRANCE
 6 - Florimond-Desprez, 59242 Cappelle-en-Pèville, FRANCE

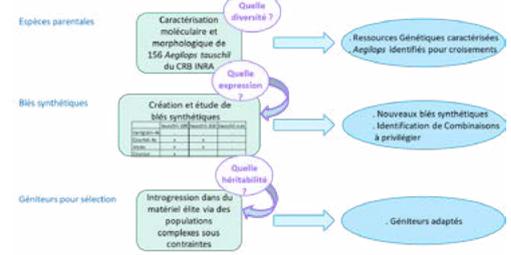
7 - Limagrain Europe, 77390 Verneuil L'Étang, FRANCE
 8 - RAGT, 28150 Louville-La-Chenard, FRANCE
 9 - Syngenta 28000 Chartre, FRANCE
 10 - Unisigma, 60480 Froissy, FRANCE

Contexte :

- nécessité d'élargir la diversité du blé tendre pour faire face aux enjeux à venir
 - en particulier sur le génome D
 ⇒ à partir d'*Aegilops tauschii*
 compte tenu de l'origine polyploïde du blé tendre



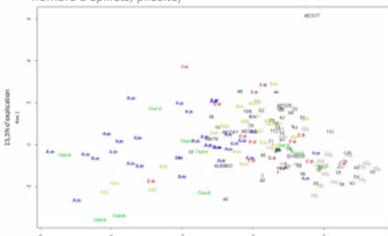
Programme en 3 parties :



1. Une collection de 156 *Aegilops tauschii* bien diversifiée et caractérisée

✓ Caractérisation agro-morphologique :

(épiation, nombre et longueur de talles, d'entre-nœuds, d'épi, nombre d'épillets, pilosité)

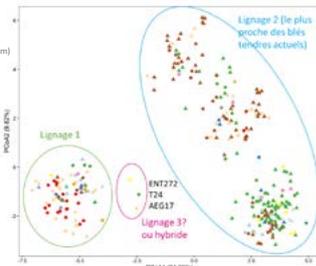


Analyse en Composantes Principales réalisée sur des mesures agro-morphologiques en serre

⇒ Gradient d'ouest en est selon l'origine des *Ae. tauschii* :
 Précocité croissante, Hauteur décroissante, Longueur d'épi décroissante
 Nombre d'épillets décroissant

✓ Caractérisation moléculaire : 192 marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism) du NIAB :

86 marqueurs communs avec d'autres collections d'*Ae. tauschii* de : AAFC, CSIRO, JIC, KSU et NIAB (348 *Ae. tauschii*)



Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) réalisée sur SNP
 ⇒ Collection FSOV bien répartie entre les lignages 1 et 2, et même quelques lignages 3 ou hybrides
 ⇒ Identification de doublons intra et inter-collections
 ⇒ Choix d'*Ae. tauschii* originaux à croiser

2. De nouveaux blés synthétiques obtenus et étudiés

Nouveaux blés synthétiques originaux ou faisant partie d'un tableau d'étude :

- ⇒ Obtention de : Isengrain-4x/Tauschii-42 AEG17/Isengrain-4x
- ⇒ Obtention à confirmer de : Tauschii-28/(F5 Soissons/Orlu) (F5 Sculptur/Soissons)/Tauschii-24 (F5 Soissons/Orlu)/Tauschii-66
- ⇒ Tableau d'étude complété
- ✓ Observations agronomiques : influence des parents marqués sur certains caractères
- ✓ Étude transcriptomique : peu de modifications d'expression chez les blés synthétiques par rapport à leurs parents (~1% des gènes) mais :
 - génome D plus touché
 - reproductibles et héréditaires pour certaines, mais sens variable (sur ou sous-expression)

5 blés 4x
T. Durum
 ou issus de
T. aestivum

3 *Ae. tauschii* de différents lignages

	Tauschii 87 (Esp. France)		Tauschii 139 (Esp. Allemagne)		Tauschii 140 (Esp. Espagne)	
	code	État d'obtention	code	État d'obtention	code	État d'obtention
Isengrain_4x	ISE81	Obtenu 2020 / 2024/43	ISE100	Obtenu 2021 / 2024/45	ISE110	Obtenu 2020 / 2024/42
	ISE82	Obtenu 2021 / 21420/41	ISE101	Obtenu 2021 / 21420/41	ISE111	MANQUANT
Chartre_4x	CH81	Obtenu 2021 / 21420/41	CH100	Obtenu 2021 / 21420/41	CH110	Obtenu 2021 / 21420/41
	CH82	MANQUANT	CH101	MANQUANT	CH111	Obtenu 2021 / 21420/41
Lyon	LY81	Obtenu 2021 / 21420/41	LY100	Obtenu 2021 / 21420/41	LY110	MANQUANT
	LY82	MANQUANT	LY101	Obtenu 2021 / 21420/41	LY111	MANQUANT
Clermont	CL81	Obtenu 2021 / 21420/41	CL100	Obtenu 2021 / 21420/41	CL110	MANQUANT
	CL82	Obtenu 2020 / 19422	CL101	MANQUANT	CL111	MANQUANT
Langres	LAN81	Obtenu 2021 / 21420/41	LAN100	Obtenu 2021 / 21420/41	LAN110	MANQUANT
	LAN82	MANQUANT	LAN101	Obtenu 2021 / 21420/41	LAN111	MANQUANT

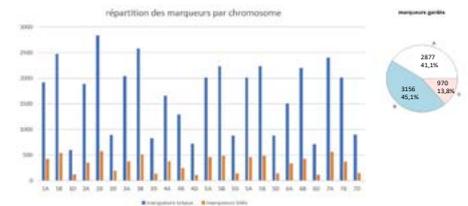
État jaune : sens de croisement Argenteo x Blé de sens noir - Disponible uniquement (obtenu par RNA-seq) France
 État gris : sens de croisement Blé de sens noir x Argenteo - Disponible uniquement (obtenu par RNA-seq) France
 État rouge : état de sens - Disponible uniquement (obtenu par RNA-seq) France

3. Des lignées dérivées de populations sous contraintes caractérisées pour être utilisées en géniteurs

Une population constituée à partir de 31 blés synthétiques pollinisateurs de Isengrain-ms (mâle stérile) et Charger-ms a été soumise à des contraintes biotiques ou abiotiques chez chaque partenaire pendant 3 ans : Sécheresse (« Phéno3C »), Germination sur pied (aspersion), Carence azotée, Bas Niveau d'intrants, Rouille jaune (contamination), septoriose (contamination), pression multi-maladies

288 lignées en ont été dérivées :
 ✓ phénotypées en 2023 sur plusieurs sites
 ✓ génotypées sur une puce Axiom 35k

⇒ Génétique d'association (Genome Wide Association Study) en cours avec 7 055 marqueurs triés
 ⇒ Géniteurs potentiels identifiés



Conclusions et perspectives

- ✓ Matériel végétal original obtenu et caractérisé, en cours de valorisation
- ✓ Meilleure compréhension des mécanismes en jeu
- ✓ Plusieurs stages d'étudiants réalisés (P. Plasse, H. Bas, C. Yvonne, A. Albert, A. Ténart)
- ✓ Publication : Banouh M., Armisen D., Bouguennec A., Huneau C., Dia Sow M., Pont C., Salse J. et Civaň P. (2023) Low impact of polyploidization on the transcriptome of synthetic allohexaploid wheat. BMC Genomics 24, 255. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09324-2>
- ✓ Nombreuses analyses encore à réaliser à partir des données collectées et autres publications envisageables



RESISTAMICRO : Comprendre et Maîtriser les infections de *Microdochium* pour améliorer la résistance du blé à la « Microdochiose ».

Romain VALADE^{1*}, Christophe GIGOT¹, Cindy VITRY¹, Stéphanie Le PRIEUR¹, Marie-Anne GARCIA², Philippe MOMONT³, Anne-Charlotte LOMBART³, Romain LAMERAND³, Edouard PENEZ³, Julien RATET³, Sylvie DUTRIEZ³, Sylvain CHOMBART⁴, Constance LAVERGNE⁵, Laure DUCHALAIS⁶, Auberi AVALLE⁷, Gabriel BEUDIN⁸, Hugo MUSSET⁹, Valérie CADOT¹⁰, Jean-Philippe MAIGNIEL¹⁰, Ludovic BONHOMME¹¹, Cyrille SAINTENAC¹¹, Marie FOULONGNE-ORIOLE²

1 - ARVALIS - Station expérimentale, 91720 Boigneville

2 - INRAE - UR MYCSA, 33882 Villenave d'Ornon

3 - CETAC - 7, rue du Coq Heron, 75030 Paris

4 - FLORIMOND DESPREZ Veuve & Fils - 59242 Cappelle-en-pevele

5 - LIMAGRAIN Europe - 77390 Verneuil l'Étang

6 - AGRI-OBTENTIONS - 78660 Orsonville

7 - UNISIGMA - 60480 Froissy

8 - RAGT 2n - 28150 Louville-la-Chenard

9 - SYGENTA - 31790 Saint Sauveur

10 - GEVES - La Pouéze, 49370 Erdre-en-Anjou

11 - INRAE - UMR GDEC - Université Clermont Auvergne 63000 Clermont-Ferrand

*Coordinateur : Romain VALADE, r.valade@ARVALIS.fr

1 Introduction

La fusariose de l'épi est une maladie qui affecte de nombreuses céréales à paille dans le monde pouvant provoquer des pertes de rendements directes supérieures à 20 q/ha. Cette maladie est causée par un complexe d'espèces fongiques toxigène (*Fusarium spp.*) et non toxigène (*Microdochium spp.*). Ces 2 genres regroupent environ 19 espèces capables d'induire la fusariose de l'épi sur céréales. Les espèces les plus fréquentes en Europe sont *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *M. nivale* et *M. majus* (Xu *et al.*, 2005 ; Xu & Nicholson, 2009), avec une fréquence plus faible de *F. culmorum* et plus forte de *F. poae* depuis 2000 en France (Ioos *et al.*, 2004). Les champignons pathogènes du genre *Microdochium* sont capables d'attaquer tous les organes de la plante (des racines aux épis) et à différents stades de développement de la plante (du semis à la récolte). Les attaques précoces sur plantules, nommées « moisissure rose des neiges » sont majoritairement citées dans des régions où le couvert neigeux est persistant avec un printemps très froid, telles que l'Europe centrale, la Scandinavie, la Russie, mais également le Canada et certaines régions des États-Unis. Ce symptôme est rarement décrit en France où il ne survient que très ponctuellement, lors d'épisodes neigeux exceptionnels. Les symptômes sur feuilles sont fréquents en Europe de l'Ouest mais difficiles à identifier et souvent confondus avec la septoriose ou la rhynchosporiose. Peu décrits dans la littérature, ils sont observés assez couramment en Allemagne (Joshi & Miedaner, 2003) et en France (Toussaint-Ferreyrolle, 2012). Le projet « FSOV *Microdochium* 2014 » a permis de former tous les partenaires à la reconnaissance des symptômes foliaires. La tache apparaît tout d'abord vert-bouteille, d'aspect huileux, puis évolue en une nécrose présentant souvent un aspect concentrique. À la face supérieure de la feuille, on peut observer une abondante sporulation du champignon dans le cas d'une

nécrose avancée, ce qui laisse supposer que les attaques sur feuilles pourraient servir de relai à une infection ultérieure des épis. La présence de *Microdochium spp.* sur les épis est généralement décrite comme associée à des températures fraîches et à un climat humide à la floraison (Snider *et al.*, 2000 ; Rossi *et al.*, 2001 ; Nielsen *et al.*, 2011 ; Xu *et al.*, 2008). Ces agents pathogènes ont été identifiés sur les grains dans les pays du Nord-Ouest de l'Europe, comme le Danemark (Nielsen *et al.*, 2013), la Belgique (Isebaert *et al.*, 2004), l'Angleterre (Parry *et al.*, 2008) ou la France (Ioos *et al.*, 2004 ; Gourdain *et al.*, 2015). Néanmoins, le taxon est également présent dans des pays du bassin Méditerranéen, tels que l'Italie (Shah *et al.*, 2005 ; Pancaldi *et al.*, 2010) ou la Tunisie (Kammoun *et al.*, 2009). Dans ces études, *Microdochium* est systématiquement présenté comme participant au complexe fusarien de l'épi, en association avec des espèces du genre *Fusarium*.

Depuis 1997, Bayer Crop Science par l'intermédiaire du dispositif « CARTOFUSA », mène une enquête à l'échelle nationale portant sur l'identification des populations fongiques sur les grains de blé. Cette étude montre une augmentation de l'occurrence des *Microdochium spp.* en France. Lors d'années à risque élevé, comme en 2007, 2012 et 2016, la proportion de *Microdochium* dans la population fongique des grains à la récolte peut atteindre 50%. Néanmoins, ces études microbiologiques ne permettent pas de différencier les espèces de *Microdochium*. Les études menées notamment par ARVALIS et INRAE Mycsa dans le cadre des projets « Casdar Ecofusa », « ANR Don&Co » et « FSOV *Microdochium* 2014 » ont également permis de mettre en évidence que les espèces de *Microdochium* sont les espèces les plus fréquemment rencontrées après *F. graminearum* (Taillieu *et al.*, 2019 ; Valade *et al.*, 2020). Plusieurs études reportent une prédominance de *M. majus* lors d'infection par *Microdochium spp.* en Europe (Parry *et al.*, 1995 ; Lees *et al.*, 1995, Nirenberg *et al.*, 1994 ; Nielsen *et al.*, 2013), ou au Japon (Hayashi *et al.*, 2014). En France, il semblerait

que cette prédominance soit moins marquée. En effet, dans les enquêtes réalisées par PCR quantitative (qPCR), *M. majus* n'est pas forcément l'espèce prédominante de *Microdochium* et la proportion entre les deux espèces semble être dépendante de l'année (« FSOV *Microdochium* 2014 »). Aucun modèle de prédiction du risque *Microdochium* n'est actuellement disponible. Les analyses des projets précédents ont permis de mettre en évidence que les variables climatiques seraient plus explicatives que les variables agronomiques dans la présence de *Microdochium* (Valade *et al.*, 2018). Néanmoins, le jeu de données n'est pas assez complet pour permettre de proposer une grille de risque comme pour *F. graminearum* ou un modèle de gestion du risque (Gourdain *et al.*, 2009).

Très peu de données sont également disponibles sur la diversité intraspécifique de chaque espèce de *Microdochium* ou sur la structuration génétique des populations selon l'hôte. Une plus grande variabilité génétique a été décrite au sein de l'espèce *M. nivale* par rapport à l'espèce *M. majus* (Lees *et al.*, 1995). Une diversité plus importante à l'intérieur de populations qu'entre populations de *M. majus* semble également indiquer une faible différenciation génétique (Hayashi *et al.*, 2014). Une analyse spatio-temporelle de populations de *M. nivale* montre une grande diversité inter-parcelles et inter-années (Jewell, 2013), issue potentiellement de la reproduction sexuée ou de flux de gènes extérieurs. Alors que *Microdochium spp.* est capable d'infecter toutes les espèces de céréales en France et même des gazons (pour *M. nivale*), aucune donnée n'est disponible sur les populations issues de ces différents hôtes. Est-ce que ce sont les mêmes populations sur toutes les céréales ? Existe-t-il des souches spécialisées ? Ren *et al.* (2015) ont montré des interactions significatives entre génotypes hôtes et espèces de *Microdochium* pour des données de phénotypage en conditions contrôlées suggérant que les mécanismes de tolérance dans la plante et les gènes de pathogénicité pourraient être différents selon l'espèce de *Microdochium*. Enfin, aucune étude ne s'est intéressée à la variabilité potentiellement existante au sein d'une même plante entre les isolats présents sur les inflorescences ou ceux présents sur les feuilles.

La connaissance de la structuration génétique des populations de *Microdochium* est capitale pour orienter les stratégies de sélection. Dans ce projet, nous avons donc étudié ces différents aspects liés à la diversité génétique, ainsi qu'à la spécialisation à l'hôte et l'organe.

Peu d'études se sont intéressées à la résistance des céréales à paille face à *Microdochium spp.* Plusieurs travaux publiés se rapportent aux symptômes sur plantules de « moisissure rose des neiges » au cours de la période hivernale. La résistance du blé tendre face aux attaques précoces de *Microdochium spp.* augmente suite à l'acclimatation au froid (Nakajima & Abe 1996). Des protéines, liées aux mécanismes de défense de la plante, sont connues pour s'accumuler pendant l'acclimatation au froid des céréales, telles que les protéines PR (protéines impliquées dans les réactions de défense des plantes) reliées à la pathogénèse (Christova *et al.*, 2006). Quelques études ont tenté d'appréhender la résistance du blé aux attaques de *Microdochium spp.* à travers la mise au point de tests d'inoculation sur feuilles détachées (à partir de feuilles issues de plantules) et sur épis (Brennan *et al.*,

2005 ; Maurin *et al.*, 1995 ; Ren *et al.*, 2016). Si les tests sur feuilles détachées semblent être pertinents pour évaluer le comportement des variétés face à la « moisissure rose des neiges » et la fonte des semis, ce protocole n'a cependant pas permis d'établir une corrélation avec les symptômes sur épis en conditions contrôlées pour les mêmes variétés (Brennan *et al.*, 2005 ; Browne *et al.*, 2006). Ces données suggèrent que la réaction de la plante face à une attaque de *Microdochium spp.*, sur feuilles détachées et épis, met probablement en jeu des mécanismes de résistance différents. A l'heure actuelle, aucune connaissance sur le déterminisme moléculaire de ces mécanismes n'est disponible. Une seule étude s'est intéressée au déterminisme génétique de la résistance du blé à la fonte des semis et au FHB (Fusarium Head Blight) causés par *Microdochium spp.* (Ren *et al.*, 2016), à partir de l'analyse d'une population d'haploïdes doublés issus du croisement entre Rialto et LSP2. Les auteurs ont mis en évidence trois QTL de résistance à *M. majus* (4A, 5B et 7D) et un QTL de résistance à *M. nivale* (différent de *M. majus*) à partir des tests sur feuilles détachées et trois QTL de résistance sur épis à *M. majus* (1D, 4B et 5A) et un QTL majeur de résistance sur épis à *M. nivale* qui explique 20.7% de la variabilité phénotypique. Cette étude montre qu'il existe une spécificité des résistances vis-à-vis des espèces *M. nivale* et *M. majus* mais également vis-à-vis des organes (feuilles et épis). Les résultats issus d'une seule population ne peuvent cependant pas être généralisés et d'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre les résistances à *Microdochium*. De plus, suite à une analyse de co-localisation, Ren *et al.* (2016) suggèrent que les QTLs identifiés avec *Microdochium spp.* seraient différents de ceux identifiés avec *F. graminearum* et donc que les mécanismes moléculaires expliquant les maladies pourraient être spécifiques de l'espèce fongique.

Aucune étude du comportement des variétés de blé tendre face à des attaques de *Microdochium* sur feuilles (au stade adulte) et épis n'a été publiée. Le projet « FSOV *Microdochium* 2014 » a permis de mettre en évidence de probables sensibilités différentes au sein des variétés françaises suggérant que du progrès génétique est possible. Toutefois, les protocoles et connaissances actuelles ne permettent pas de réaliser des essais au champ qui soient suffisamment robustes, répétables et facilement interprétables à cause d'une pression trop dépendante de l'année ou de la présence d'autres espèces comme *F. graminearum* complexifiant les notations et leurs interprétations.

Au regard de l'agent pathogène, il existe très peu de données dans la littérature décrivant les mécanismes d'infection. Kang *et al.* (2004) ont étudié la progression de *M. nivale* dans l'épi suite à une infection artificielle. Ils ont observé une altération des cellules de la plante lors de la colonisation du champignon qui démontre indirectement que, à l'instar des espèces fusariennes, *M. nivale* dispose de tout l'arsenal enzymatique indispensable à la pénétration et à la progression du champignon dans les tissus hôtes. Mais alors que les mycotoxines ont été démontrées comme étant des facteurs d'agressivité lors de l'interaction *F. graminearum*/blé (Bai *et al.*, 2002), qu'en est-il pour les espèces de *Microdochium* non toxigène ? Rien n'est aujourd'hui connu sur les mécanismes moléculaires et biochimiques potentiellement mis en œuvre par ces espèces lors de l'interaction plante/pathogène.

Ainsi, Le projet « RESISTAMICRO » a été structuré en 3 axes. Le premier, centré sur la biologie et l'épidémiologie du champignon a consisté à caractériser génétiquement les populations de *Microdochium spp.*, isolées principalement sur blé tendre mais également sur blé dur et gazon, afin de regarder s'il existe une structuration des populations selon l'hôte, les organes ou les régions. Parallèlement, un travail a été mené sur les facteurs agro-climatiques à risque dans le développement de la maladie. Le second volet avait pour objectif de mettre au point des protocoles d'évaluation de la sensibilité variétale (blé tendre) à *Microdochium spp.* robustes, reproductibles et transférables à tous les acteurs de la sélection française, aux champs et en conditions contrôlées. Le troisième volet était axé sur l'étude, en conditions contrôlées, de la variabilité du pouvoir pathogène des deux espèces de *Microdochium* par la caractérisation du mode d'infection sur blé tendre, des mesures d'agressivité selon les organes de la plante (feuilles, épis) ou encore la recherche de gènes impliqués dans l'interaction blé/*Microdochium spp.*

2 Matériel et méthode

► 2.1. Caractérisation génétique

L'objectif de cette étude est de caractériser la diversité génétique des populations de *Microdochium spp.* à l'échelle du paysage français, de la plante hôte et de l'organe de la plante infectée.

Échantillonnage des populations de *Microdochium spp.*

Afin de répondre à cet objectif, un échantillonnage conséquent a été réalisé. Dès la campagne 2018, des prélèvements ont été effectués dans le réseau d'essais d'ARVALIS puis poursuivis en 2019 et 2020. Ces prélèvements ont permis d'isoler 550 isolats selon la méthode d'ARVALIS décrite dans Garcia (2021) à partir de feuilles de blé tendre, de grains de blé tendre et de grains de blé dur (Tableau 1, Figure 1). En complément,

	M. majus	M. nivale	Total
Blé dur - grain	59	7	66
Blé tendre - grain	116	120	236
Blé tendre - feuille	205	43	248
Gazon	0	20	20
Total	380	190	570

Tableau 1 : Populations de *Microdochium spp.* échantillonnées selon plante et organe hôte.

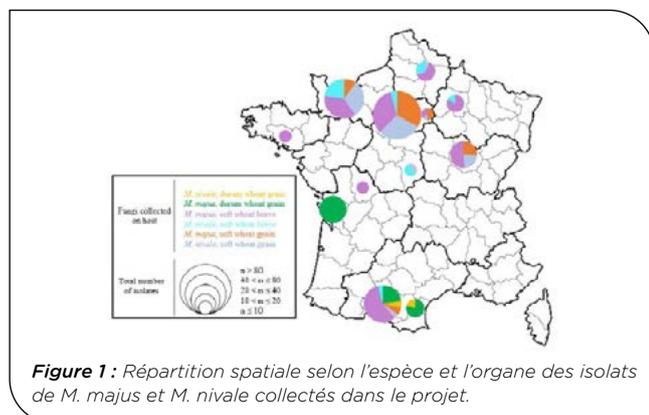


Figure 1 : Répartition spatiale selon l'espèce et l'organe des isolats de *M. majus* et *M. nivale* collectés dans le projet.

20 isolats de *M. nivale* issus de prélèvements sur gazon ont pu être récupérés grâce à une collaboration avec l'ANSES (Unité CASPER, F. Remuson).

Obtention d'un génome de référence pour *M. nivale* et *M. majus*

Les souches MI18055 et MI18056 ont été choisies comme représentantes des espèces *M. nivale* et *M. majus* respectivement. Ces souches ont été isolées de la variété Bermude en 2017 dans un essai d'ARVALIS à Boigneville (91).

De l'ADN de haut poids moléculaire a été extrait pour chacune des souches. Une approche combinant du séquençage en longues lectures (plateforme Gentyane de Clermont-Ferrand, technologie SMRT -single molecule real time technology, Sequel I, Pac. Bio.) et du séquençage Illumina (2x100 pb, HiSeq 4000, plateforme GenomEast, Strasbourg) a été utilisée pour générer les données de génomes. Afin de consolider l'annotation automatique, un séquençage RNAseq a également été réalisé pour les deux souches de référence (plateforme PGTB INRAE Cestas Pierroton). L'assemblage et les analyses des séquences ont été réalisées en collaboration avec Jérôme Gouzy et Sébastien Carrère (LIPME, INRAE Toulouse). Sept autres souches de *M. majus* et 5 de *M. nivale* ont été séquencées en Illumina.

Développement d'un outil de génotypage haut-débit

Une approche SSRseq a été développée, en collaboration avec Olivier Lepais (plateforme PGTB INRAE Cestas Pierroton). Il s'agit d'une méthode de génotypage de marqueurs microsatellites par séquençage haut débit (Lepais *et al.* 2020). A partir des données de génomes obtenues, les motifs microsatellites (SSR) ont été recherchés et des amorces ont été définies pour 48 locus, pour chacune des deux espèces, selon la procédure décrite dans Megléczy *et al.* (2014). La mise au point des marqueurs a été réalisée sur un sous échantillon de 94 souches par espèce. Le séquençage a été réalisé par la plateforme PGTB.

Analyse génétique des populations de *Microdochium spp.*

Les marqueurs microsatellites opérationnels ont été génotypés par séquençage sur l'ensemble des populations de *M. majus* et *M. nivale* (Tableau 1). A partir des séquences obtenues, une matrice de génotype a été générée et utilisée pour les analyses de génétique des populations.

► 2.2. Épidémiologie et prédiction du risque

Jeu de données

Les données utilisées ont été collectées par ARVALIS dans le cadre d'un réseau d'enquêtes pluriannuelles (ARVALIS/FAM). Chaque année, il est demandé à des agriculteurs partenaires répartis sur l'ensemble du territoire français et producteur de blé (tendre et dur) de prélever, lors de la récolte, un échantillon de grains par parcelle retenue pour l'enquête. Chaque échantillon est accompagné d'un questionnaire complété par l'agriculteur afin de préciser le contexte (localisation de la parcelle, précédent cultural, travail du sol, variété cultivée, autres aspects de l'itinéraire technique, etc.).

Les échantillons de grains ont été envoyés au laboratoire de pathologie végétale d'ARVALIS afin de réaliser (i) des analyses génétiques pour la recherche d'agents pathogènes par qPCR (*F. graminearum*, *M. majus* et *M. nivale*) selon la méthode de Elbelt *et al.* (2018), et (ii) des analyses toxicologiques pour quantifier des mycotoxines d'intérêt (notamment la déoxynivalénol produite par *F. graminearum*).

Ces enquêtes étant menées depuis de nombreuses années, une riche base de données a pu être constituée et sa mise à jour a pu être poursuivie dans le cadre du projet FSOV « RESISTAMICRO ». Les données à notre disposition s'étalaient de 2007 à 2021 pour un total de 1 640 échantillons de grains de blé (tendre et dur) analysés. En moyenne, ces dernières années, cela correspondait à 100 échantillons de blé tendre et 50 échantillons de blé dur par an.

Variables agro-météorologiques

Les données météo du réseau de stations d'ARVALIS et de Météo France ont été mobilisées (relevés journaliers de températures, pluviométrie, rayonnement, etc. sur l'ensemble du territoire). Des outils internes d'ARVALIS, valorisant l'expertise de l'Institut, ont également été utilisés pour calculer les dates de réalisation de différents stades phénologiques, comme les stades épiaison et floraison qui sont particulièrement intéressants vis-à-vis des champignons phytopathogènes étudiés. En ayant recours aux données et outils précédemment mentionnés, il nous fut possible d'estimer en tout point de l'espace (via de l'interpolation spatiale) de nombreuses variables agro-climatiques, comme la pluviométrie cumulée durant la période à plus ou moins 7 jours autour de la floraison ou le rayonnement global moyen durant cette même période. Plus de 100 variables agro-climatiques ont été définies collégialement en amont, à dire d'expert.

Variables à expliquer ou prédire

Parmi les variables à expliquer, nous avons retenu les quantités d'ADN à la récolte de *Microdochium spp.* et *F. graminearum* afin d'identifier et comparer les variables agro-climatiques explicatives ou prédictives identifiées pour ces deux groupes de champignons. Nous avons aussi testé le ratio entre la quantité d'ADN de *F. graminearum* sur la somme des quantités d'ADN de *Microdochium spp.* et *F. graminearum*, afin d'explorer la dominance de l'un ou l'autre des groupes de champignons en fonction de variables agro-climatiques.

Approches statistiques

L'apprentissage automatique via des forêts aléatoires (Breiman, 2001) a été privilégié pour identifier les variables agro-climatiques les plus explicatives ou prédictives des quantités à expliquer. D'autres approches — e.g., boosting regression trees (Friedman, 2001) — ont également été mobilisées afin de confirmer les résultats obtenus avec les forêts aléatoires (non présentées).

Les analyses ont été menées avec le logiciel R (version 3.6.3, R Core Team, 2022) en mobilisant en particulier les paquets randomForest (version 4.6-14, Liaw et Wiener, 2002) et plotmo (version 3.5.7) et gbm (version 2.1.8).

► 2.3. Mise au point de méthodes de phénotypage

Conditions contrôlées sur feuilles

L'objectif de cette tâche était de mettre au point un test de phénotypage sur feuilles au stade plantule pour évaluer rapidement la résistance des variétés de blé aux champignons du genre *Microdochium*. Nous avons réalisé sept essais de phénotypage en chambre de culture au stade plantule. Au cours de ces essais, nous avons testé quatre variétés de blé tendre identifiées dans le précédent projet FSOV comme étant sensibles à *Microdochium spp.* sur feuilles : Oregrain, Apache, Prémio et Caméléon. Ces variétés ont été inoculées suivant différentes méthodes : (i) la méthode classique en appliquant les spores du champignon à l'aide d'un pinceau à la surface de la feuille n°2 ou en appliquant des hyphes, (ii) en appliquant les spores à l'aide d'un pinceau sur une feuille où une piqure avait été réalisée (pour mimer l'entrée du champignon par les piqures d'insectes et les blessures), (iii) en coupant l'extrémité de la feuille et en la trempant dans la solution de spores (couper/tremper), et (iv) en infiltrant les spores à la seringue dans la feuille. Nous avons également fait varier les conditions climatiques des chambres : (i) la température avec une condition 21/18°C (jour nuit) et une autre à 15/10°C, (ii) l'hygrométrie relative avec différents moyens (soit en maintenant une bache pendant trois ou sept jours sur les plantes et ensuite une hygrométrie à 80% en utilisant soit un fog fin soit un fog avec de grosses gouttelettes). Pour ces expérimentations, nous avons utilisé deux souches de *M. majus* et deux souches de *M. nivale* avec deux concentrations différentes de spores. Les inoculations ont été réalisées soit avec un système dit « de feuille attachée » où la feuille inoculée est attachée sur une plaque de polycarbonate à l'horizontale pour avoir une exposition homogène à la lumière soit sur des feuilles libres.

Conditions contrôlées sur épis

Un premier essai a été réalisé sur la variété de blé tendre Récital, génotype de référence du GDEC pour l'analyse de la fusariose de l'épi. Dans ce premier test, les inocula de deux souches de *M. nivale* (12085 et 18055) et deux autres de *M. majus* (18056 et 18041) ont été préparés pour atteindre 10⁵ spores/ml. L'inoculation a été réalisée sur la base du protocole développé pour le phénotypage de *F. graminearum*. Les plantes de blé ont été cultivées en chambre de culture en condition de photopériode de 16h à 21°C avant un taux d'hygrométrie de l'air ambiant d'environ 80%. Au stade mi-anthèse (environ 45 jours après la mise en chambre de culture), deux à trois épis par plante ont été sélectionnés et inoculés par le dépôt de 1 000 spores (10µL) directement dans la cavité florale d'épillets médians d'ontogénie synchrone. Une lecture de symptômes a ensuite été réalisée chaque jour, selon la grille de notation établie pour le développement de *F. graminearum* (Fabre *et al.*, 2019).

Méthode de phénotypage aux champs

Dans le cas des fusarioses des épis, la présence d'un complexe d'espèces (*Fusarium* et *Microdochium spp.*) rend très difficile l'évaluation de la sensibilité variétale pour un seul agent pathogène par des méthodes simples et rapides aux champs. Des verrous

méthodologiques ne permettent pas, à ce jour, de caractériser efficacement la résistance variétale vis-à-vis des *Microdochium*. En effet, les différents protocoles testés ne permettent pas d'obtenir une pression de maladie homogène, garantie et sans interaction avec d'autres espèces. Dans ce projet « FSOV RESISTAMICRO », un important réseau d'expérimentations a été mis en place afin d'essayer de mettre au point un protocole de phénotypage robuste et utilisable facilement afin de pouvoir évaluer à terme la résistance variétale aux *Microdochium spp.* Ainsi, en 2018 et 2019, 13 essais ont été réalisés chaque année. Pour chaque essai, 4 variétés avec des niveaux supposés de résistance différents (résultats du projet « FSOV Microdochium 2014 ») ont été implantées (Caméléon, Sothys CS, Premio, Apache). Ces variétés ont été semées en deux répétitions de trois lignes. Dans chaque site, 8 modalités ont été testées dont 1 modalité non inoculée afin de tester l'efficacité de l'inoculation. Les modalités comprenaient une, deux ou trois applications, des cocktails de souches, des concentrations d'inoculum différentes, du bâchage après la dernière inoculation, l'ajout d'un fongicide spécifique à *F. graminearum*.

Au total, sur les deux années, une trentaine de modalités différentes ont été testées. Pour chaque site, des notations sur feuilles et épis ont été réalisées. Des analyses qPCR ont été menées pour les essais et les modalités les plus intéressantes selon les notations et l'avis des expérimentateurs.

En année 3 du projet (semis 2020), 42 variétés réparties en deux panels (6 sites pour le panel n°1, 7 sites pour le panel n°2) avec 4 témoins identiques dans chaque site soit 25 variétés par site ont été phénotypées vis-à-vis de leur sensibilité à *Microdochium spp.* selon le protocole le plus prometteur avec les résultats obtenus en 2018 et 2019. Dans chaque site, il y avait une modalité inoculée et une modalité non inoculée avec deux répétitions par modalité. Pour chaque site, des notations sur feuilles et sur épis ont été réalisées ; des analyses qPCR ont été menées pour les 4 variétés témoins de tous les essais. Les sites les plus intéressants ont été analysés entièrement.



Photo 1 : Exemple de dispositif de brumisation et d'inoculation.

► 2.4. Interactions plante-pathogène

Variabilité du pouvoir pathogène

L'absence de mise au point d'un test robuste en conditions contrôlées sur feuilles et sur épis n'a pas permis d'étudier cette variabilité entre les espèces et les souches.

Déterminisme de l'interaction *Microdochium spp.* /blé

Une expérimentation a été mise en œuvre pour l'exploration des ajustements moléculaires au cours de l'interaction. Cet essai a été réalisé sur le génotype de blé Récital en utilisant des spores récentes préparées à partir des souches *M. nivale* 12085 et *M. Majus* 18056. Compte tenu des dynamiques de développement des symptômes très proches de celles observées chez *F. graminearum*, nous avons procédé aux prélèvements des épis spécifiquement inoculés 48h et 72h après inoculation des spores dans la cavité florale. Au total, trois modalités (*M. nivale*, *M. majus* et mock), deux points de cinétique (48hpi et 72hpi) et trois réplicas biologiques ont été expérimentés. Chaque réplica biologique correspondait à l'inoculation de six épillets de trois épis par plante soit 54 épillets par plante. Ces échantillons ont ensuite été soumis à une analyse dual-protéomique comparable à la procédure développée pour *F. graminearum* (Fabre *et al.*, 2019).

3 Résultats

► 3.1. Caractérisation génétique

Obtention d'un génome de référence pour *M. nivale* et *M. majus*

Pour chacune des deux espèces, nous avons obtenu une séquence génomique de référence (Tableau 2). La complétion du génome est meilleure pour *M. majus* avec une séquence de 36.2 Mb répartie sur 13 scaffolds représentant vraisemblablement les chromosomes (séquences télomériques identifiées aux extrémités). Pour *M. nivale*, 36 scaffolds ont pu être assemblés. Un autre génome de *M. nivale* récemment publié (Tsers *et al.* 2023) présente une taille similaire (37 Mb) pour 16 scaffolds. Le nombre de modèles de gènes est par contre différent avec 11 973 gènes contre 15 012 dans notre étude.

	<i>M. nivale</i> [MI18055]	<i>M. majus</i> [MI18056]
Taille génome (bp)	36 675 401	36 252 715
GC (%)	55	56
Nb scaffolds	36	13
Nb grands scaffolds (>1Mb)	10	13
Nb modèle de gènes avec séquences codantes	15 012	13 285
Nb SSR identifiés	5685	5877
Nb SSR/Mb	154.9	162.3

Tableau 2 : Caractéristiques des deux génomes de référence.

Cette ressource génomique sera rendue disponible prochainement à la communauté scientifique (Foulongne-Oriol *et al.*, in prep). Une analyse plus approfondie exploitant les autres génomes séquencés, (analyses des polymorphismes, analyses approfondies des répertoires de gènes, identification d'effecteurs, clusters de métabolites secondaires, synténie, pan/core genome ...) est également en cours.

Développement d'un outil de génotypage haut-débit

L'analyse des éléments répétés de type microsatellites (SSR) a permis de mettre en évidence une densité suffisante en microsatellites chez les deux espèces avec

155 et 162 motifs SSR par Mb identifiés chez *M. nivale* et *M. majus* respectivement. La distribution de ces motifs semble aléatoire sur les génomes (Figure 2).

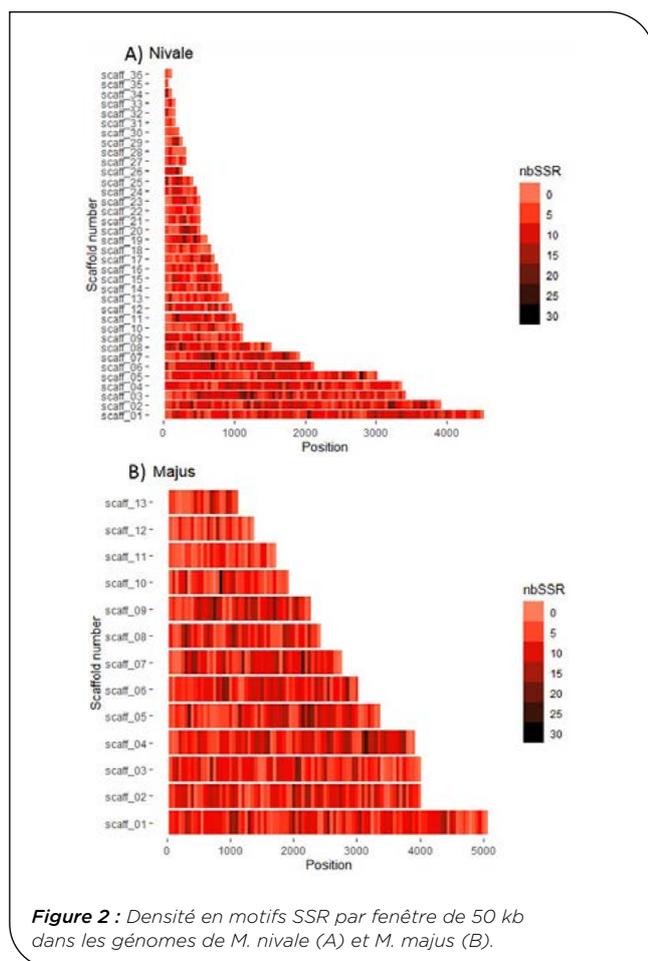


Figure 2 : Densité en motifs SSR par fenêtre de 50 kb dans les génomes de *M. nivale* (A) et *M. majus* (B).

Sur les 48 couples d'amorces définis pour les mises au point, 19 et 22 ont été sélectionnés (fiabilité, reproductibilité, polymorphisme) pour les analyses de population de *M. nivale* et *M. majus* respectivement.

Analyse génétique des populations de *Microdochium spp.*

L'analyse de clonalité a permis de mettre en évidence que la population de *M. nivale* prélevée sur gazon était entièrement clonale. Ce résultat s'explique notamment par la méthode d'échantillonnage utilisée puisque les souches ont été isolées à partir d'un seul prélèvement sur le site infecté. Pour les souches isolées sur blés, le taux de clonalité est de 24% et 12,8% chez les populations de *M. majus* et *M. nivale* respectivement. Le calcul des indices de diversité montre que la diversité génétique est plus importante chez *M. nivale* ($h=0.442$) que chez *M. majus* ($h=0.378$). Ces résultats sont concordants avec les précédentes études de génétique des populations réalisées sur ces deux espèces (Abdelhalim *et al.*, 2020 ; Matušinsky *et al.*, 2019). Quelle que soit l'espèce, aucune structuration des populations n'a pu être mise en évidence. Ni l'origine géographique, ni l'année, ni l'hôte (blé tendre/blé dur), ni l'organe (grains/feuilles) sur lequel les souches ont été isolées ne semblent structurer les populations de *Microdochium spp.* (Garcia, 2021). Ces résultats suggèrent l'existence d'une métapopulation à l'échelle du territoire français.

► 3.2. Épidémiologie et prédiction du risque

Pression en maladies des épis

Les quantités de *Microdochium spp.* et *F. graminearum* présentes dans les échantillons de grains à la récolte sont marquées par de fortes variabilités intra- et inter-annuelles (Figure 3). Cela est cohérent avec les observations réalisées par Bayer Crop Science dans le cadre du dispositif « CARTOFUSA ». 2007, 2008, 2012, 2013, 2016 et 2021 ressortent comme des années à fortes occurrences en pathogènes des épis (par rapport à la moyenne des années analysées). 2011, 2015, 2019 et 2020, quant à elles, sont des années à faibles pressions en *F. graminearum* et *Microdochium spp.*

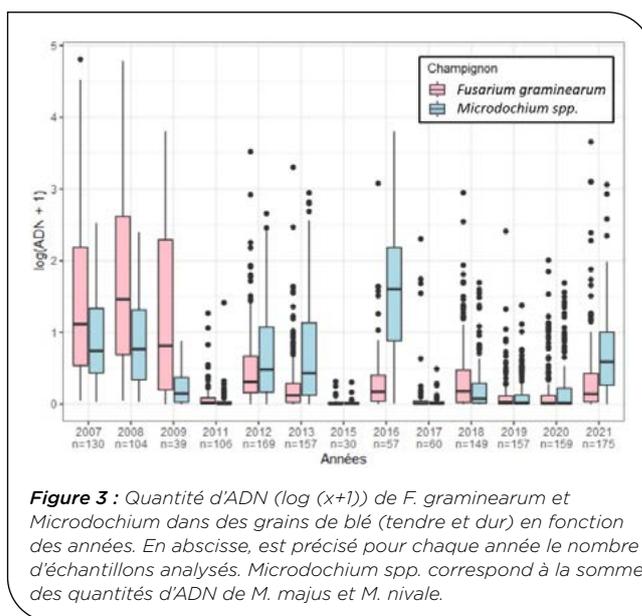


Figure 3 : Quantité d'ADN ($\log(x+1)$) de *F. graminearum* et *Microdochium* dans des grains de blé (tendre et dur) en fonction des années. En abscisse, est précisé pour chaque année le nombre d'échantillons analysés. *Microdochium spp.* correspond à la somme des quantités d'ADN de *M. majus* et *M. nivale*.

Facteurs agro-climatiques à risque pour *F. graminearum*

Parmi toutes les variables agro-climatiques testées, les deux qui ressortent en tête dans les graphiques d'importance des variables, issus des analyses par forêts aléatoires, sont : la note de la grille d'évaluation du risque d'accumulation de déoxynivalénol (DON) dans le grain de blé (ARVALIS - Institut du végétal, 2011) et le rayonnement global moyen à plus ou moins 7 jours autour de la floraison. La pluviométrie totale à plus ou moins 7 jours autour de la floraison apparaît également comme une variable explicative importante, mais légèrement moins importante que les deux précédentes. Nous retrouvons donc bien, avec cette analyse reposant sur des forêts aléatoires, les facteurs à risque connus vis-à-vis de *F. graminearum* en fin de cycle sur blé ce qui conforte l'intérêt de ce type d'analyses et la base de données utilisée pour étudier ces mêmes facteurs pour *Microdochium spp.*

Facteurs agro-climatiques à risque pour *Microdochium spp.*

Concernant *M. majus* et *M. nivale*, aucune des variables agronomiques testées (précédent cultural, travail du sol et note du risque d'accumulation de DON) ne ressort. Cependant, plusieurs variables climatiques peuvent être en partie liées à la quantité mesurée d'ADN de *Microdochium spp.*, notamment des sommes de pluies (entre 2 nœuds et épiaison par exemple). L'une d'entre elles en particulier, le rayonnement global moyen à plus ou moins 7 jours autour de la floraison, apparaît

quasiment toujours dans les toutes premières variables des graphiques d'importance (plus le rayonnement global est faible durant cette période, et plus la quantité d'ADN de *Microdochium spp.* a tendance à être élevée).

Facteurs agro-climatiques à risque pour le ratio entre *F. graminearum* et *Microdochium spp.*

Les variables agro-climatiques identifiées comme les plus importantes par les forêts aléatoires pour expliquer le ratio sont des variables intégrant en général de la température. Nous pouvons notamment citer la somme des températures moyennes à plus ou moins 7 jours autour de la floraison et le nombre de jours avec une température moyenne inférieure à 16 °C et des occurrences de pluie.

► 3.3 Mise au point de méthodes de phénotypage

Conditions contrôlées sur feuilles

Le système ayant donné le plus de symptômes est le suivant : feuilles attachées, grosses gouttelettes, méthode couper/tremper, bâches pendant sept jours, avec la variété Apache et la souche de *M. majus* 18041. La présence de bâches pendant une longue durée pourrait limiter la présence de rayonnement sur les feuilles, un facteur qui semble être important pour le développement de la maladie au champ. Finalement, dix accessions de blé ont été inoculées selon la méthode couper/tremper avec *M. majus* avec seulement trois jours de bâches. Nous avons observé des longueurs de feuilles nécrosées variables allant de 0,4 à 5 cm suggérant un contrôle génétique de la résistance à ce champignon dans ces conditions.

Pour finaliser ces expérimentations d'optimisation et valider son potentiel intérêt, il serait nécessaire de répéter le protocole avec des variétés dont le niveau de résistance au stade adulte est connu pour déterminer si ce système met en évidence des résistances pertinentes pour le contrôle de cette maladie au champ.

Conditions contrôlées sur épis

Les premiers résultats ont montré un développement de symptômes pour toutes les souches évaluées avec des symptômes légèrement plus fort pour *M. nivale* 12085 et *M. majus* 18056 en comparaison avec les souches 18055 et 18041. La dynamique de développement de ces symptômes demeurait comparable à celle observée chez *F. graminearum*, avec toutefois un décalage de 24h dans l'apparition des premiers jaunissements des épillets inoculés. Sur le reste de la dynamique, la typologie de l'évolution symptomatologique demeurait très proche de celle observée avec *F. graminearum* (léger jaunissement localisé sur la glume puis brunissement des glumes et glumelles et nécroses marquées de l'épillet dès le 7^e jour après infection). Sur la base de ces résultats, nous avons sélectionnés les souches *M. nivale* 12085 et *M. majus* 18056 pour évaluer plus finement leur impact sur des épis de blés contrastés pour leur résistance. Les deux expérimentations initiées au cours de l'année 2 du projet n'ont malheureusement pas permis d'acquérir de nouvelles données. La première utilisant les cultivars Récital (très sensible au FHB) et Renan (peu sensible) n'a pas permis d'observer de symptôme alors que la procédure était identique aux mises au point, suggérant une baisse d'agressivité/fitness des spores inoculées ou une mauvaise reproductibilité de la méthode.

Méthode de phénotypage aux champs

En 2018/2019 et 2019/2020, nous avons pu mettre en évidence une pression naturelle (hors inoculation) de *Microdochium spp.* assez faible et cohérente avec les résultats des enquêtes agriculteurs. En comparant la pression en fusariose des épis avec les notations et les données de biomasses fongiques (qPCR), la capacité de brumisation/irrigation ressort comme très importante pour obtenir des symptômes liés à *Microdochium spp.* Par exemple, en 2018/2019, sur les témoins des 13 sites, les 8 sites avec une biomasse fongique significative sont les sites qui ont pu faire plusieurs cycles d'aspersion par jour et donc apporter une humidité quasi constante sur l'épi et les feuilles (Figure 4). Ainsi, il est préférable de multiplier les cycles de brumisation/irrigation en journée plutôt que des volumes d'eau en fin de journée.

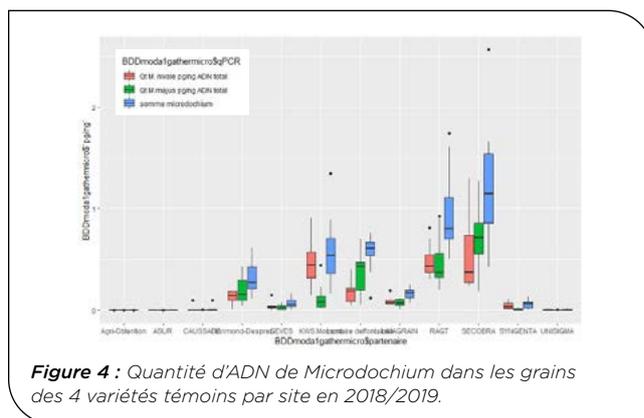


Figure 4 : Quantité d'ADN de *Microdochium* dans les grains des 4 variétés témoins par site en 2018/2019.

Nous avons également pu mettre en évidence qu'il est préférable d'éviter un précédent maïs pour diminuer la pression liée à *F. graminearum* surtout si l'objectif est d'évaluer la seule résistance à *Microdochium spp.* À cette fin, il est également préférable d'effectuer une protection fongicide au moment de la floraison avec une substance active spécifique à *F. graminearum* comme du tébuconazole. Nous avons pu démontrer une baisse significative de la biomasse de *F. graminearum* et aucun effet significatif sur *Microdochium spp.* ce qui permet de noter des symptômes plus étroitement liés à ces derniers et non à des complexes d'espèces.

Dans ces essais, le bâchage du dispositif après inoculation a permis, dans certaines situations, d'augmenter la présence de *Microdochium spp.* sur grains. L'augmentation de l'inoculum (de 10⁶ sp/ml à 10⁸ sp/ml) a également permis d'augmenter la pression de maladie sur les épis. Néanmoins, cette observation n'a pu être faite que dans un seul site et la production d'inoculum de *Microdochium spp.* à ce niveau de concentration peut être très fastidieuse voire irréalisable selon les souches et les conditions de culture. Enfin, les modalités d'inoculation encadrant la floraison (début floraison - fin floraison) semblaient, dans certains sites, les meilleurs stades d'application de l'inoculum.

Pour conclure, l'effet site notamment lié au climat et à la capacité d'aspersion sont les facteurs qui ressortent comme principaux dans la réussite des inoculations. Ces résultats sont aussi cohérents avec les principaux facteurs de risque identifiés dans la présence significative de *Microdochium* qui sont principalement liés à des variables climatiques (cf.3.2).

L'analyse de sensibilité variétale des quatre témoins dans les essais avec une pression significative a permis de confirmer les différences attendues entre les quatre variétés, soit Apache plus résistante que CAMELEON et SOTHYS eux-mêmes moins sensibles que PREMIO pour la pression sur les épis (Figure 5).

Lors de la dernière année d'essais aux champs, (2020/2021), 42 variétés au total ont été phénotypées en inoculant selon le protocole suivant : 3 applications à dernière feuille étalée (DFE), début floraison et fin floraison. Ce protocole a été défini comme le plus favorable à la réussite de l'inoculation grâce aux résultats précédents. Un traitement anti *F. graminearum*, à base de tébuconazole, a été réalisé dans les sites qui le pouvaient tout comme le bâchage après la dernière inoculation. Sur les 13 sites, 7 sites ont permis d'avoir une pression sur épis assez significative avec une note moyenne de 4.5 pour les quatre témoins. À noter une certaine pression sur feuilles dans certains sites (Figure 6).

Les quantifications de la biomasse fongique dans les grains à la récolte a permis de relier cette présence à la présence de *Microdochium* et/ou *F. graminearum*. Dans la majorité des sites, l'ensemble du complexe est présent mais avec une médiane plus élevée pour *Microdochium* par rapport à *F. graminearum*. Dans

deux sites, *F. graminearum* est significativement plus présent que les espèces de *Microdochium* (Lemaire-Deffontaines et Lidéa, Figure 7).

Dans ces deux sites, il n'y a pas pu avoir de traitements fongicides. Ainsi, quand on analyse l'ensemble du réseau, nous pouvons confirmer l'intérêt du traitement fongicide anti *F. graminearum* pour évaluer principalement l'interaction cultivar x *Microdochium*. (Figure 8).

Enfin, l'analyse des modalités inoculées et non inoculées n'a pas permis de mettre en évidence un effet de l'inoculation en 2021 (Figure 9). Cela signifie que la pression naturelle liée aux conditions climatiques de l'année et aux dispositifs d'expérimentation a été suffisante dans la majorité des sites notamment ceux qui ont pu faire des cycles réguliers d'aspersion. Ce résultat est aussi concordant avec les résultats de l'enquête en 2021 qui a montré une présence significative de *Microdochium* sur le territoire français (3.2)

Pour les 7 sites les plus informatifs selon les résultats obtenus avec les témoins, tous les grains des variétés présentes ont été analysés en qPCR. Le panel n°2 est représenté dans 4 sites et le panel n°1 dans 3 localités. Les modalités inoculées et non inoculées n'étant pas significativement différentes, chaque variété est représentée par 4 notations et 4 analyses moléculaires (2 répétitions par modalité) dans les analyses.

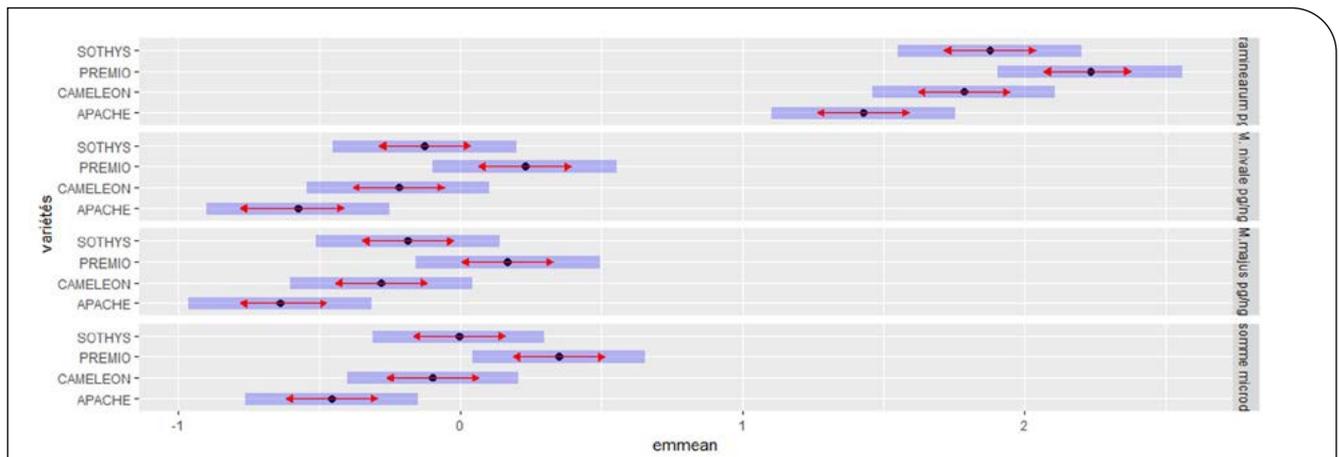


Figure 5 : Moyenne ajustée de la quantité d'ADN de *F. graminearum*, *M. majus*, *M. nivale*, *Microdochium* spp. dans les grains des 4 variétés témoins dans les 13 sites de 2018/2019. Pour chaque quantité, Apache est plus résistante que le groupe Sothys/Caméleon lui-même étant moins sensible que Premio.

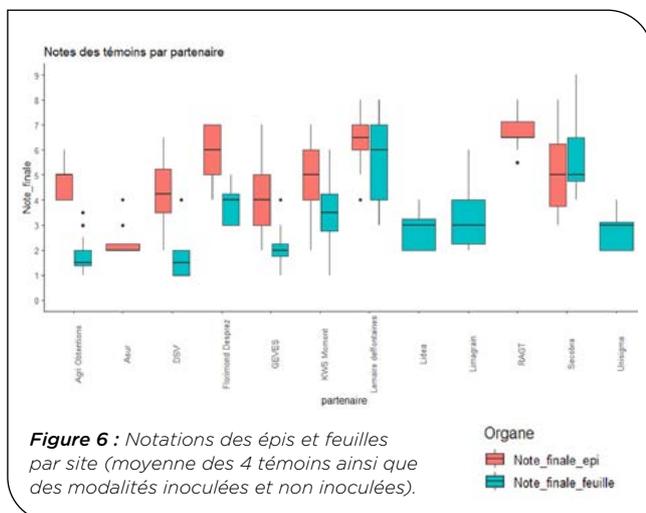


Figure 6 : Notations des épis et feuilles par site (moyenne des 4 témoins ainsi que des modalités inoculées et non inoculées).

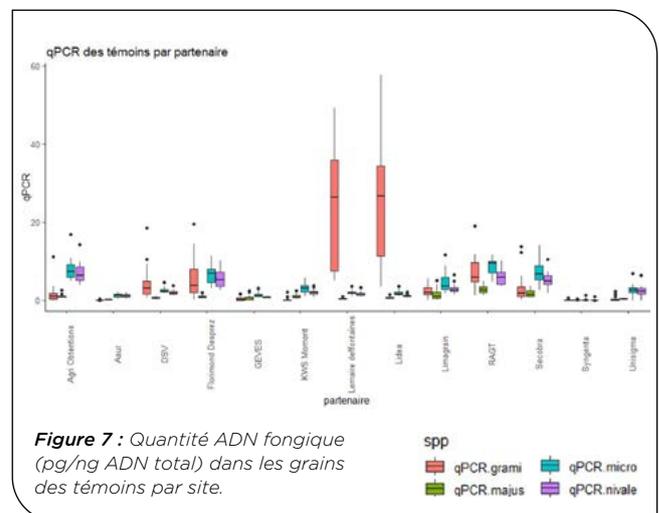
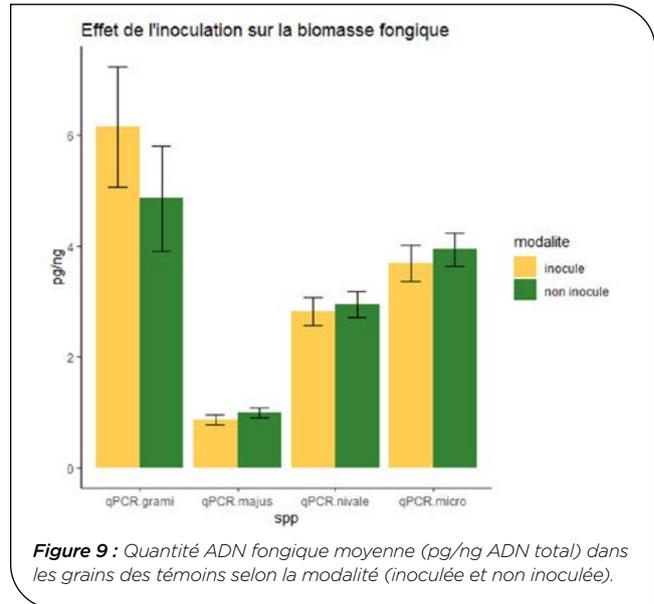
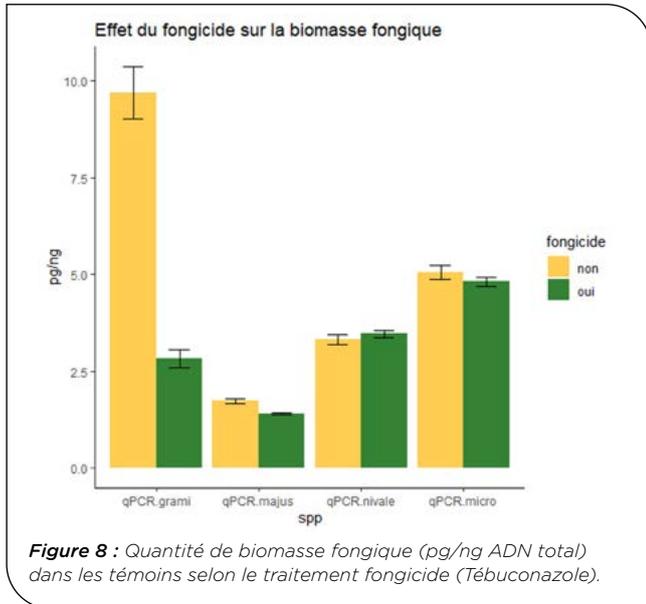


Figure 7 : Quantité ADN fongique (pg/ng ADN total) dans les grains des témoins par site.



Les principaux résultats permettent de mettre en évidence des différences de sensibilité entre les variétés en prenant en compte les notations des épis, ou la biomasse fongique pour chaque panel avec 3 groupes de significativité pour le panel n°1 et 6 groupes pour le panel n°2 (Figure 10).

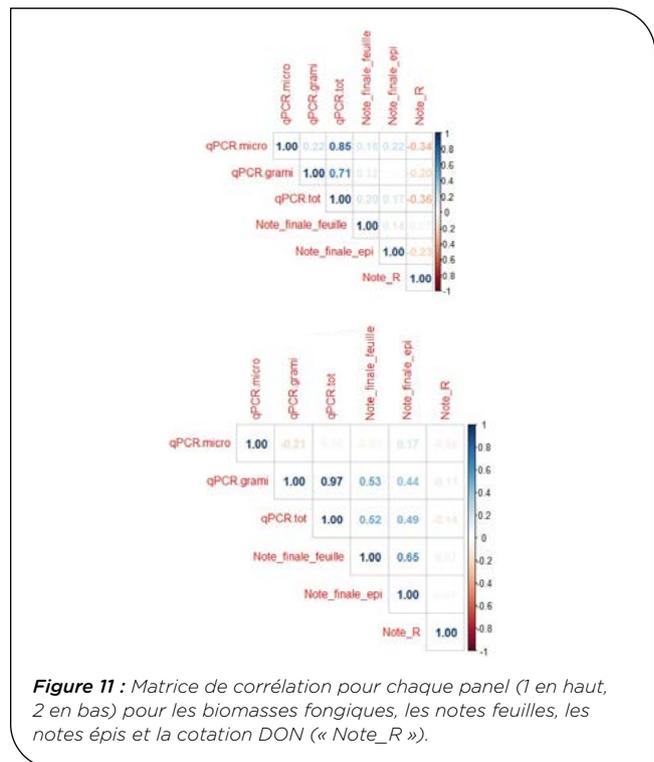
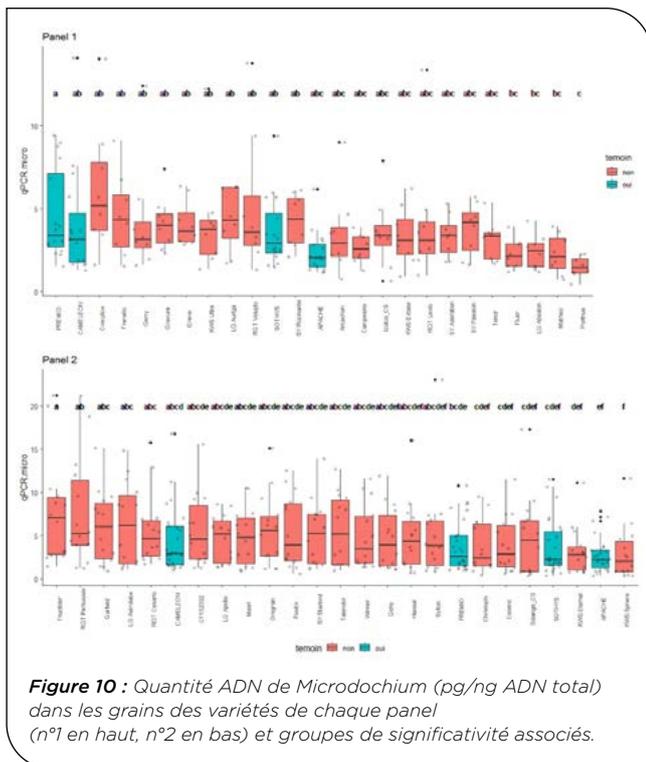
Il est intéressant de noter que les corrélations entre les notations épis, les biomasses fongiques mais aussi les cotations pour l'accumulation à la DON sont assez faibles pour chaque panel (Figure 11). Ce résultat illustre la difficulté à noter les maladies des épis et l'intérêt d'avoir plusieurs méthodes de phénotypage et d'indicateurs.

La corrélation entre les deux espèces de *Microdochium* et le classement variétal est bonne pour chaque espèce indiquant peu de différences de sensibilité selon l'espèce de *Microdochium*.

Dans le projet, nous avons aussi prévu de caractériser la sensibilité variétale au niveau foliaire avec ce type de dispositif. Néanmoins, la maladie ne s'est pas assez exprimée dans les dispositifs pour pouvoir en tirer des conclusions même si des tendances laissent suggérer des différences entre la sensibilité au niveau des épis par rapport à la sensibilité au niveau des feuilles.

► 3.4 Interactions plante-pathogène

Les analyses de dual-protéomique ont permis d'identifier 5232 protéines de blé, nombre comparable aux analyses menées avec *F. graminearum*. En revanche, moins de 300 protéines fongiques ont pu être assignées au genre *Microdochium*, dont moins de 50 disposaient de peptides protéotypiques (peptides spécifiques du champignon). Ces protéines fongiques



ont été principalement détectées dans les échantillons infectés par *M. nivale* alors que les deux souches ont produit des symptômes visibles et comparables. L'analyse quantitative a donc porté essentiellement sur le protéome du blé. Aucun impact significatif de la souche *M. majus* n'a pu être détecté sur le protéome des épillets de blé, quel que soit le point de cinétique considéré (48hpi et 72hpi). En revanche, un effet, bien que marginal, a pu être démontré sur le protéome de l'épi lorsque celui-ci subissait l'infection par la souche *M. nivale* depuis 72h. Au total, cinq protéines présentaient des augmentations d'abondance sans équivoque dans les échantillons prélevés à 72hpi. Ces protéines appartenaient à l'ensemble de protéines systématiquement sur-accumulées en réponse à *F. graminearum* indépendamment de la souche inoculée ou du cultivar expérimenté (core-responsive proteins). Deux de ces protéines sont chloroplastiques et corroborent la place centrale du chloroplaste dans les réponses aux agents pathogènes et les trois autres correspondent à des UDP-glucosyl transférases, fonctions connues pour leur rôle dans la détoxification. L'analyse comparative des génomes acquis dans le projet avec ceux de *F. graminearum* pour identifier des gènes potentiellement impliqués dans la pathogénicité et compléter cette étude protéomique est encore en cours.

4 Discussion et Conclusion

Le projet « FSOV RESISTAMICRO » a permis d'acquérir de nouvelles références et ressources pour permettre de mieux comprendre la « microdochiose » des céréales et ainsi développer des méthodes de lutte qui seront adaptées à cette maladie. Ainsi, l'importante collection de souches acquise lors du projet, les ressources génomiques (12 génomes) et génétiques (environ 20 marqueurs microsatellites/espèce) nous ont permis de mettre en évidence une probable absence de structure génétique des populations entre les deux espèces de *Microdochium* à l'échelle du territoire mais aussi des plantes hôtes et des organes testés. Les deux génomes Pacbio sont en cours de publication (Foulongne-Oriol *et al.*, in prep) afin d'en faire des génomes de référence pour la communauté internationale. De même, une étude du pangénoème de *Microdochium spp.* et de *F. graminearum* est en cours afin d'étudier les différences génétiques entre ces espèces et essayer de déchiffrer les interactions entre *Microdochium spp.* et l'épi. La mise au point des tests en conditions contrôlées a été plus compliquée que prévu à la fois sur feuilles et sur épis. Même si des résultats intéressants ont été obtenus, il reste à améliorer ces tests pour pouvoir disposer de protocoles robustes permettant d'étudier plus finement les interactions et pouvoir les utiliser comme une aide à la sélection variétale. D'ailleurs, il est intéressant de noter que cette difficulté à bien phénotyper les variétés en conditions contrôlées par la maîtrise de l'infection se retrouve également aux champs. Les nombreux tests méthodologiques réalisés dans le cadre de ce projet et du projet « FSOV Microdochium » précédent ont permis

de caler une méthodologie pour favoriser la présence de *Microdochium spp.* au détriment de *F. graminearum*. Cette méthode consiste à inoculer en trois applications (dont surtout deux applications encadrant la floraison pour avoir de la pression sur les épis), éviter un précédent maïs, utiliser un fongicide spécifique à *F. graminearum* (ex : Tébuconazole), bâcher si possible et surtout apporter une hygrométrie très importante sur les épis pendant une longue période. Néanmoins, la réussite de l'inoculation n'est pas assurée à chaque fois et sera très dépendante des conditions climatiques de l'année.

D'ailleurs, ce résultat est corroboré par les travaux sur la prédiction du risque. En effet, ils n'ont pas permis de mettre en évidence de facteur agronomique à risque (contrairement à la fusariose due à *F. graminearum* déjà bien documentée sur le sujet). Cela signifie que, pour lutter contre cette maladie, aucune mesure prophylactique ne peut être envisagée pour le moment. Le déclenchement d'interventions fongicides ciblées (en choisissant la bonne combinaison matière active x dose x stade d'application) pourrait se baser sur le suivi d'une ou plusieurs variables climatiques permettant de prévoir le risque de développement de la microdochiose. Outre la pluviométrie sur différentes périodes, le rayonnement global moyen autour de la floraison nous semble particulièrement prometteur. Cette variable présente en effet plusieurs atouts. Elle permet déjà une bonne prédiction du risque de « microdochiose », en comparaison aux autres variables explicatives testées. Elle a aussi l'avantage d'être elle-même moins entachée d'erreurs d'estimation (lors de son interpolation spatiale) et de prédiction sur les prochains jours que des variables intégrant des informations pluviométriques (les pluies sont par essence des événements localisés et difficilement prévisibles). Le recours au rayonnement global permet très probablement d'intégrer implicitement des variables influençant directement le développement de la « microdochiose » (température, humidité, pluie, etc.). Quoi qu'il en soit, cette variable semble être un critère de choix pour la prédiction du risque de cette maladie (étant donné son niveau d'importance, son niveau de précision et son accessibilité) et il est donc intéressant de poursuivre des travaux à son sujet.

En l'état actuel de nos connaissances, le seul levier agronomique préventif possible pourrait donc être offert par l'évaluation d'une sensibilité variétale vis-à-vis de *Microdochium spp.* Or, les résultats obtenus dans ce projet mettent bien en évidence des sensibilités différentes des variétés testées démontrant que du progrès génétique est possible. La difficulté réside dans les méthodes de phénotypage et la fiabilité des essais même si le projet a permis des avancées sur ce point. De plus, il ne semble pas y avoir de différences de réponse des variétés entre *M. majus* et *M. nivale* ce qui permettrait d'évaluer les deux espèces ensemble. Ainsi, des études populationnelles (croisements entre variétés sensibles et résistantes) ou de génétiques d'association pourraient être engagés pour identifier des sources de résistance, des gènes et/ou des marqueurs d'intérêts vis-à-vis de *Microdochium*.

Références bibliographiques

- Abdelhalim M., Brurberg M.B., Hofgaard I.S., Tronsmo M.**, 2020. Pathogenicity, host specificity and genetic diversity in Norwegian isolates of *Microdochium nivale* and *Microdochium majus*. *Eur J Plant Pathol* 156, 885-895
- ARVALIS - Institut du végétal.** 2011. Grille d'évaluation du risque d'accumulation du déoxynivalénol (DON) dans le grain de blé tendre et d'aide au traitement contre la fusariose sur épi (*Fusarium graminearum* et *F. culmorum*).
- Bai G.H., Desjardins A.E, Plattner R.D.** 2002. Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia*, vol 153, pp. 91-98.
- Bonhomme L., Valot B., Tardieu F., Zivy M.**, 2012. Phosphoproteome dynamics upon changes in plant water status reveal early events associated with rapid growth adjustment in maize leaves. *Molecular and Cellular Proteomics*, vol. 11, pp. 957-972.
- Breiman L.**, 2001. Random Forests. *Machine Learning*, 45 : 5-32
- Brennan J.M., Leonard G., Cooke B.M., Doohan F.M.**, 2005. Analysis of head and leaf reaction towards *Microdochium nivale*. *European Journal of Plant Pathology*, vol. 112 (1), pp. 79-83.
- Browne R.A., Mascher F., Golebiowska G., Hofgaard I.S.**, 2006. Components of partial disease resistance in wheat detected in a detached leaf assay inoculated with *Microdochium majus* using first, second and third expanding seedling leaves. *Journal of Phytopathology*, vol. 154 (4), pp. 204-208.
- Christova P.K., Christov N.K. and Imai R.**, 2006. A cold inducible multidomain cystatin from winter wheat inhibits growth of the snow mold fungus, *Microdochium nivale*. *Planta*, vol. 223, pp. 1207-1218.
- Elbelt, S., Siou, D., Gelisse, S., Cruaud, C., Lannou, C., Lebrun M-H., Laval, V.**, 2018. Optimized real time qPCR assays for detection and quantification of *Fusarium* and *Microdochium* species involved in wheat head blight as defined by MIQE guidelines. *BioRxiv* 272534
- Fabre F., Bormann J., Urbach S., Roche S., Langin T., Bonhomme L.**, 2019. Unbalanced Roles of Fungal Aggressiveness and Host Cultivars in the Establishment of the *Fusarium* Head Blight in Bread Wheat. *Front Microbiol.* 10:2857.
- Friedman J H.** 2001. Greedy function approximation: a gradient boosting machine. *The Annals of Statistics*, 29(5) : 1189-1232
- Garcia M-A.** 2021. Genetic diversity of *Microdochium* spp. populations involved in cereals *Fusarium* Head Blight disease in France. Rapport de stage de fin d'études, Université Bordeaux.
- Gourdain E., Piraux F. et Barrier-Guillot B.**, 2009. Les outils pour gérer le risque déoxynivalénol sur blé tendre et blé dur. AFPP - 9ème Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, Tours, 8 et 9 décembre 2009.
- Gourdain E, Lannou C.** 2013. Fusariose des épis de blé, le degré d'infection fonction de l'équilibre entre deux champignons. *Perspectives Agricoles*, 399 : 8-11.
- Gourdain E., Batina H., Du Cheyron P., Fourrey A., Gélisse S., Grignon G., Laval V., Maumené C., Méléard B. et Valade R.**, 2016. Lutte contre les fusarioses des épis de blés : quantification des espèces du complexe fusarien, facteurs de risque et méthodes de lutte, *Innovations agronomiques*, vol. 49, pp. 133-145.
- Hayashi Y., Kozawa T., Aicuhi D., Koike M., Akino S., Kondo N.**, 2014. Population genetic structure of *Microdochium majus* and *Microdochium nivale* associated with *Fusarium* head blight of wheat in Hokkaido, Japan. *European Journal of Plant Pathology*, vol.140, pp. 787-795.
- Ioos R., Belhadj A., Menez M.**, 2004. Occurrence and distribution of *Microdochium nivale* and *Fusarium* species isolated from barley, durum and soft wheat grains in France from 2000 to 2002. *Mycopathologia*, vol. 158 (3), pp. 351-362.
- Isebaert S., Haesaert G., Devreese R., Fremaut D., Vlaemynck G., Maene P.**, 2004. *Fusarium* spp. in winter wheat, a problem in Flanders ? *Parasitica*, vol. 60 (1-2), pp. 33-43.
- Jewell L. E.**, 2013. Genetic and pathogenic differences between *Microdochium nivale* and *Microdochium majus*. Doctor of Philosophy, University of Guelph, Ontario, Canada.
- Joshi A.K. & Miedaner T.**, 2003. Occurrence and host preference of foliar blight pathogens in different growth stages of rye and wheat in Southwest Germany. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, vol. 110 (4), pp. 350-358.
- Kammoun L. G., Gargouri S., Hajlaoui M. R. and Marrakchi M.**, 2009. Occurrence and distribution of *Microdochium* and *Fusarium* species isolated from durum wheat in northern Tunisia and detection of mycotoxins in naturally infested grain. *Journal of Phytopathology*, vol. 157, pp.546-551.
- Kang Z., Huang L., Buchenauer H.**, 2004. Ultrastructural and cytochemical studies on infection of wheat spikes by *Microdochium nivale*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, vol. 111 (4), pp. 351-361.
- Lees A.K., Nicholson P., Rezanoor H.N., Parry D.W.**, 1995. Analysis of variation within *Microdochium nivale* from wheat: evidence for a distinct sub-group. *Mycological Research*, vol. 99, pp.103-109.
- Lepais O., Chancerel E., Boury C., Salin F., Manicki A., Taillebois L., Dutech C., Aissi A., Bacles CFE., Daverat F., Launey S., Guichoux E.**; 2020. Fast sequence-based microsatellite genotyping development workflow. *PeerJ* 8:e9085
- Liaw A., Wiener M.**, 2002. Classification and Regression by randomForest. *R News*, 2(3) : 18-22.
- Maurin N., Saur L., G. Capron G.**, 1995. Stem and head reaction of winter wheat cultivars to artificial inoculation by *Microdochium nivale* under controlled environment and field conditions. *Euphytica*, vol. 92, no. 3, pp. 359-366.
- Matušinsky P., Svobodová LL., Svačinová I., Havis N., Hess M., Tvarůžek L.**, 2019. Population genetic structure of *Microdochium majus* and *Microdochium nivale* associated with foot rot of cereals in the Czech Republic and adaptation to penthiopyrad. *European Journal of Plant Pathology* 155(1): 1-12.
- Megléczy E., Pech N., Gilles A., Dubut V., Hingamp P., Trilles A., Grenier R., Martin JF.**, 2014. QDD version 3.1: a user-friendly computer program for microsatellite selection and primer design revisited: experimental validation of variables determining genotyping success rate. *Mol Ecol Resour.* 2014 Nov;14(6):1302-13.
- Nakajima T. & Abe J.**, 1996. Environmental factors affecting expression of resistance to pink snow mold caused by *Microdochium nivale* in winter wheat. *Canadian Journal of Botany*, vol. 74 (11), pp. 1783-1788.

- Nielsen L.K., Jense J.D., Nielsen G.C., Jensen J.E., Spliid N.H., Thomsen I.K., Justesen A.F., D.B. Collinge and Jørgensen L.N.**, 2011. Fusarium head blight of cereals in Denmark : Species complex and related mycotoxins. *Phytopathology*, vol. 101 (8), pp. 960-969.
- Nielsen L.K., Justesen A.F., Jensen J.D., Jørgensen L.N.**, 2013. *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* in seed samples of Danish small grain cereals. *Crop Protection*, vol. 43, pp. 192-200.
- Observatoire CartoFusa**, 2017. BayerCropScience, Communication personnelle.
- Pancaldi D., Tonti S., Prodi A., Salomoni D., Prà M.D., Nipoti P., Alberti I., Pisi A.**, 2010. Survey of the main causal agents of Fusarium head blight of durum wheat around Bologna, northern Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, vol. 49 (2), pp. 258-266.
- Parry D.W., Jenkinson P., McLeod L.**, 1995. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals—a review *Plant Pathology* 44, 207-238.
- Parry D.W., Rezanoor H.N., Pettitt T.R., Hare M.C., Nicholson P.**, 2008. Analysis of *Microdochium nivale* isolates from wheat in the UK during 1993. *Annals of Applied Biology*, vol. 126 (3), pp. 449-455
- R Core Team**. 2022. R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche. <https://www.R-project.org/>
- Ren R., Ynag X., Ray R.V.**, 2015. Comparative aggressiveness of *Microdochium nivale* and *M. majus* and evaluation of screening methods for Fusarium seedling blight resistance in wheat cultivars. *European Journal of Plant Pathology*, vol. 141, pp. 281-294.
- Ren R., Foulkes J., Mayes S., Yang X., Ray R.V.**, 2016. Identification of novel quantitative trait loci for resistance to Fusarium seedling blight caused by *Microdochium majus* and *M. nivale* in wheat. *Field crops research*, vol. 191, pp. 1-12.
- Rossi V., Ravanetti A., Patteri E., Giosuè S.**, 2001. Influence of temperature and humidity on the infection of wheat spikes by some fungi causing Fusarium head blight. *Journal of Plant Pathology* vol. 83(3), pp. 189-198.
- Shah D. A., Pucci N., Infantino A.**, 2005. Regional and varietal differences in the risk of wheat seed infection by fungal species associated with fusarium head blight in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, vol. 112 (1), pp. 13-21.
- Snider C.S., Hsiang T., Zhao G., Griffith M.**, 2000. Role of ice nucleation and antifreeze activities in pathogenesis and growth of snow molds. *Phytopathology*, vol. 90, pp. 354-361.
- Taillieu D., V. Cadot, B. Foucault, O. Robert, L. Duchalais, S. Caiveau, C. Dubiton, P. Giraudeau, S. Dutriez, T. Bouthillier, J. Auzanneau, C. Duque, C. Vitry, S. Le Prieur, F. Dauthieux, M. Faure, T. Baldwin, C. Galon, I. Serandat, JP. Maigniel, R. Valade**. 2019. *Microdochium* spp. : Vers une meilleure connaissance de l'occurrence, de l'épidémiologie du champignon et du comportement des variétés de blé tendre actuelles face à cette maladie. Synthèse FSOV 2014 MICRODOCHIUM.
- Toussaint-Ferreyrolle J.**, 2012. *Microdochium* : plusieurs types de symptômes en 2012. ARVALIS-Infos.fr.
- Valade R., C. Vitry, S. Le Prieur, E. Gourdain, G. Grignon, L. Duchalais, B. Foucault, D. Taillieu, O. Robert**. 2018. Influence of agronomic and climatic factors on the epidemiology of *Microdochium* species and assessment of wheat cultivars susceptibility to these pathogens in France. In Book of abstracts of 14th European Fusarium Seminar, 08-10 avril, Tulln (Austria).
- Valade R., Orlando B., Maumené C., Laval V., Walker A-S, Iooos R., Boutigny A-L, Cadot V., Foulongne-Oriol M., Forget F., Atanasova-Penichon V., Sainenac C., Bonhomme L., Langin T., Serre F., Taillieu D., Roumet P.**, 2020. La fusariose des épis des céréales à paille : synthèse de 10 années de recherche pour une meilleure gestion intégrée de la maladie.. Phloème 2020 : biennales de l'innovation céréalière, ARVALIS - Institut du Végétal, Jan 2020, Paris, France.
- Xu X.M., Parry D.W., Nicholson P., Thomsett M.A., Simpson D., Edwards S.G., Cooke B.M., Coohan F.M., Brennan J.M., Moretti A., Tocco G., Mule G., Hornok L., Giczey G., Tatnell J.**, 2005. Predominance and association of pathogenic fungi causing Fusarium ear blight in wheat in four European countries. *European Journal of Plant Pathology* vol. 112, pp.143-154.
- Xu X.M., Nicholson P., Thomsett M.A., Simpson D., Cooke B.M., Doohan F.M., Brennan J., Monaghan S., Moretti A., Mule G., Hornok L., Beki E., Tatnell J., Ritieni A., Edwards S.G.**, 2008. Relationship between the fungal complex causing Fusarium head blight of wheat and environmental conditions. *Phytopathology*, vol. 98 (1), pp. 69-78.
- Xu X.M., Nicholson P.**, 2009. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *Annual Review of Phytopathology*, vol. 47, pp. 83-103.

RESISTAMICRO : Comprendre et Maîtriser les infections de *Microdochium* spp. pour améliorer la résistance du blé à la « Microdochiose »

Romain VALADE^{1*}, Christophe GIGOT¹, Cindy VITRY¹, Stéphanie Le PRIEUR¹, Marie-Anne GARCIA², Philippe MOMONT³, Anne-Charlotte LOMBART³, Romain LAMERAND³, Edouard PENEZ³, Julien RATET³, Sylvie DUTRIEZ³, Sylvain CHOMBART⁴, Constance LAVERGNE⁵, Laure DUCHALAIS⁶, Aubert AVALLE⁷, Gabriel BEUDIN⁸, Hugo MUSSET⁹, Valérie CADOT¹⁰, Jean-Philippe MAIGNIÉL¹⁰, Ludovic BONHOMME¹¹, Cyrille SAINTENAC¹¹, Marie FOULONGNE-ORIOU²

1 - ARVALIS – Station expérimentale, 91720 Boigneville

2 - INRAE – UR MYCSA, 33882 VILLENAVE d'ORNON, 3 - CETAC – 7, rue du Coq Heron, 75030 Paris

4 - FLORIMOND DESPREZ Veuve & Fils - 59242 Cappelle-en-Pévèle

5 - LIMAGRAIN Europe – 77390 Verneuil l'Étang

6 - AGRI-OBTENTIONS - 78660 Orsonville

7 - UNISIGMA - 60480 Froissy

8 - RAGT 2n - 28150 Louville-la-Chenard

9 - SYGENTA - 31790 Saint Sauveur

10 - GEVES – La Pouéze, 49370 Erdre-en-Anjou

11 - INRAE - UMR GDEC - Université Clermont Auvergne 63000 Clermont-Ferrand

*Coordinateur : Romain VALADE, r.valade@ARVALIS.fr

La fusariose de l'épi est une maladie causée par un complexe d'espèces fongiques toxigènes (*Fusarium* spp.) et non toxigènes (*Microdochium* spp.). Actuellement, la sélection variétale est principalement axée contre les espèces productrices de fusariotoxines notamment *F. graminearum* afin de limiter les pertes liées à la qualité sanitaire des grains. Néanmoins, depuis plusieurs années, les occurrences de deux espèces de *Microdochium* (*M. majus* et *M. nivale*) ne cessent d'augmenter sur les céréales françaises et leurs impacts dans les pertes de rendements deviennent de plus en plus préoccupant. Le projet « FSOV RESISTAMICRO » avait pour but de (i) caractériser génétiquement les populations de *Microdochium* spp et identifier les facteurs agro-climatiques à risque dans le développement de la maladie, (ii) mettre au point des protocoles d'évaluation de la sensibilité variétale (blé tendre) à *Microdochium* spp. au champ et en conditions contrôlées, (iii) caractériser le mode d'infection sur blé tendre, et rechercher des gènes impliqués dans l'interaction blé / *Microdochium* spp (non abordé dans ce poster).

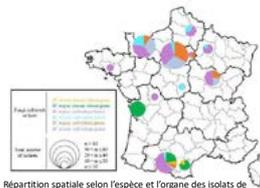
Caractérisation génétique de *Microdochium* spp.

➤ 2 génomes de référence ont été acquis

	M. nivale [MI18055]	M. majus [MI18056]
Taille génome (bp)	36 675 401	36 252 715
GC (%)	55	56
Nb scaffolds	36	13
Nb grands scaffolds (>1Mb)	10	13
Nb modèle de gènes avec séquences codantes	15 012	13 285
Nb SSR identifiés	5685	5877
Nb SSR/Mb	154.9	162.3

Caractéristiques des deux génomes (*M. majus* et *M. nivale*) acquis avec un séquençage PacBio (long read).

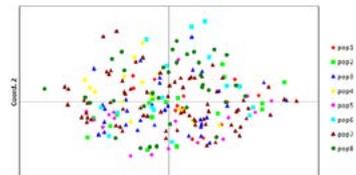
➤ Un important effort d'échantillonnage réalisé
➤ Des marqueurs SSR ont été développés pour chaque espèce



Espèce	Nombre d'individus génotypés	Nombre de SSR validés	Nombre moyen d'allèles par locus	Diversité génétique (h)
<i>M. majus</i>	450	22	5.7	0.378
<i>M. nivale</i>	198	19	8.1	0.442

Caractéristiques des isolats génotypés avec les microsatellites (SSR)

➤ Analyses de structuration génétique des populations

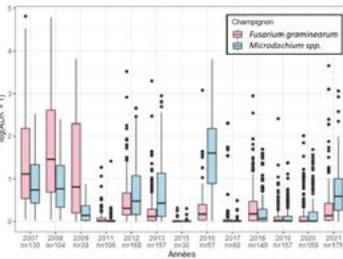


➔ Très forte synténie entre les deux espèces

➔ Diversité génétique plus importante chez *M. nivale*

➔ Aucune structuration génétique selon la localité, l'hôte ou l'organe mise en évidence avec ce jeu de données

Epidémiologie de *Microdochium* spp. et facteurs agro-climatiques

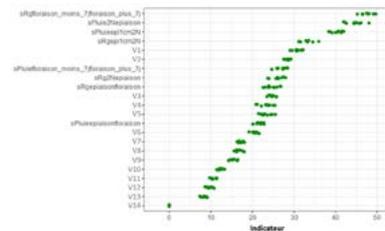


Quantité d'ADN (log (x+1)) de *F. graminearum* et *Microdochium* dans des grains de blé (tendre et dur) en fonction des années. En abscisse, est précisé pour chaque année le nombre d'échantillons analysés. *Microdochium* spp correspond à la somme des quantités d'ADN de *M. majus* et *M. nivale*.

➤ Prévalence significative de *Microdochium* spp. au cours des 15 dernières années en France avec une forte variabilité interannuelle
➤ Depuis 2016, année historique, seule 2021 a été une année assez favorable à *Microdochium* spp.

➤ Les facteurs agro-climatiques:

- ✓ Parmi les facteurs agronomiques testés (en particulier précédent et travail du sol), aucun ne permet d'expliquer la présence de *Microdochium* spp.
- ✓ La pluviométrie et le rayonnement global moyen sur différentes périodes (notamment autour de la floraison) ont été retrouvées parmi les principales variables explicatives de ce jeu de données



Graphique d'importance de variables pour prédire la quantité de *Microdochium* spp. La technique des forêts aléatoires a été mobilisée : ce graphique représente les classements des variables obtenus pour 30 forêts aléatoires. Plus la valeur de l'indicateur est importante et plus la variable correspondante permet d'expliquer la quantité de *M. spp.* mesurée. Afin d'alléger le visuel, les variables ne concernant pas uniquement la pluviométrie ou le rayonnement ont été anonymisées.

Mise au point de méthodes de phénotypage

➤ Conditions contrôlées



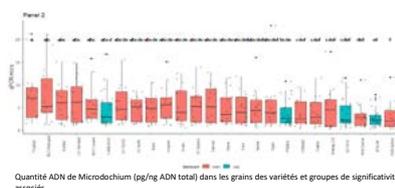
➤ Des méthodes développées sur feuilles détachées et épis maïs complexes à mettre en œuvre pour une caractérisation à « haut-débit »

➤ Au Champ



- Les nombreux essais réalisés ont permis de définir un protocole préférentiel pour évaluer les variétés vis-à-vis de *Microdochium* spp.:
- 3 applications d'inoculum: Dernière feuille étalée, début floraison et fin floraison avec bûchage si possible
- Eviter un précédent maïs
- Utiliser un fongicide spécifique anti *F. graminearum*
- Apporter une hygrométrie très importante par aspersion/brumisation

➤ Caractérisation d'un panel de variétés au champ



- Mise en évidence de différences de sensibilité entre les variétés pour *Microdochium* spp.
- Pas de différences de sensibilité observées selon la présence de *M. majus* et/ou *M. nivale*
- Pas de corrélation forte avec la note de résistance à l'accumulation à la DON?

Le projet a permis d'acquies des ressources microbiologiques, génétiques et méthodologiques utiles pour l'ensemble des partenaires et acteurs de la lutte contre les maladies des épis du blé tendre. Nous avons pu mettre en évidence une probable absence de structure génétique des populations entre les deux espèces de *Microdochium* à l'échelle du territoire mais aussi des plantes hôtes et des organes testés. Des facteurs climatiques responsables de la « microdochiose » ont été identifiés. Des protocoles permettant de mieux évaluer les variétés sont disponibles et ont permis de démontrer que du progrès génétique est possible.



CRACQ (Clone the RAC875 QTL) : Clonage et caractérisation d'un gène de maintien du rendement en conditions de stress thermique et hydrique chez le blé

Mickaël THROUDE^{1*}, Delphine FLEURY², Penny TRICKER², Diane MATHER², Scott BODEN²,
Hervé DUBORJAL¹, Lauriane CHASSAING¹, Matthieu BOGARD³, Katia BEAUCHENE³

1 - Limagrain Europe - Centre de Recherche de Chappes 63720 Chappes, FRANCE

2 - School of Agriculture, Food and Wine, The University of Adelaide- PMBI Glen Osmond SA 5064, AUSTRALIA

3 - Arvalis-Institut du Végétal - 45 Voie Romaine 41240 Ouzouer-le-marché, FRANCE

*Coordinateur : Mickaël THROUDE, mickael.throude@limagrain.com

1 Introduction

Notre projet répond à l'urgence de l'agriculture française et européenne face à la baisse des rendements céréaliers due aux évolutions climatiques. Alors que la demande mondiale en blé exige une augmentation annuelle de rendement de 1,6% (Lobell *et al.*, 2012), les taux stagnent à 1%. Les modèles climatiques prévoient une réduction de 4,1% à 6,4% des rendements pour chaque degré Celsius d'augmentation de la température moyenne planétaire (Liu *et al.*, 2016). En France, les pertes de rendement, estimées entre 1,5 et 2 quintaux par hectare (1,9% à 2%), augmentent avec chaque déficit hydrique de 10 mm (Gate, 1995), entraînant environ 740 000 tonnes de pertes nationales et un manque à gagner de plus de 100 millions d'euros. Notre projet vise à introduire de nouveaux allèles issus des variétés de blé australien, naturellement résistantes aux stress hydriques et thermiques, pour stabiliser les rendements des blés européens face au réchauffement climatique.

Malgré la connaissance de plusieurs gènes impliqués dans les réponses au stress hydrique et thermique chez les plantes, aucun gène de tolérance (assurant la stabilité du rendement en conditions de stress) n'a encore été identifié chez le blé. Les QTL (locus de caractères quantitatifs) associés au rendement dans des climats chauds et secs de type méditerranéen sont connus, mais leur utilisation dans les programmes de sélection est limitée. Deux obstacles majeurs se posent : d'une part, les performances des lignées d'introgessions de QTL sont variables en raison des interactions complexes avec l'environnement et le fond génétique ; d'autre part, la taille importante des intervalles des QTL entraîne souvent un autostop génétique négatif (entraînement de locus portants des allèles négatifs ou inadaptés), réduisant voire annulant leur effet positif. Pour surmonter ces difficultés, il est essentiel d'étudier systématiquement les QTL dans les environnements cibles, en prenant en compte les paramètres tels que le potentiel hydrique du sol et la température atmosphérique, ainsi que dans divers fonds génétiques. De plus, le clonage des gènes responsables des fonctions des QTL et les avancées récentes dans la génomique du blé (notamment l'assemblage du génome et les collections de mutants) permettent d'identifier et de caractériser de nouveaux gènes, contribuant ainsi à augmenter la diversité génétique nécessaire à la création variétale.

Ce projet s'est focalisé sur le QTL qDHY.3BL, responsable de la stabilité du rendement face aux variations climatiques. Ce QTL a été identifié dans une population

de blé de printemps issue du croisement des variétés australiennes RAC875 et Kukri. L'Université d'Adélaïde a mené une étude approfondie sur ce QTL localisé sur le chromosome 3B. Les résultats de 21 essais en champs en Australie et au Mexique ont montré que l'allèle de RAC875 améliore le rendement jusqu'à 12,5% par rapport à l'allèle de Kukri, ainsi que le poids des grains et la vigueur des plantes. L'interaction G x E a également été observée pour ce QTL. En fonction des conditions de sol, l'allèle RAC875 peut avoir un effet positif (sols profonds) ou nul (sols peu profonds en Australie méridionale), tandis que l'allèle de Kukri peut augmenter le rendement dans des conditions rares d'irrigation et de sols peu profonds. Une étude physiologique a montré que l'effet positif de l'allèle de RAC875 est associé à une augmentation de la biomasse, du poids et du nombre de grains lorsque la température dépasse 25°C au stade de floraison. De plus, ce QTL est présent chez la population australienne Drysdale/Gladius, où Drysdale porte l'allèle positif. Drysdale, adaptée aux sols profonds et aux climats chauds du Queensland et des Nouvelles Galles du Sud, pourrait être liée à la gestion de l'eau par la plante, une hypothèse qui a été testée dans le cadre de ce projet via l'utilisation de sondes « Sap Flow Meter » pour mesurer le flux de sève en conditions de stress.

L'analyse de ce QTL a été conduite via le développement d'une plateforme de phénotypage utilisant des containers en plastique pour simuler des sols profonds. Les expérimentations ont été réalisées dans un tunnel en polyuréthane pour élever la température ambiante pendant la phase de croissance des plantes. La cartographie fine du QTL a été réalisée sur une région de 690 kpb, contenant sept gènes, à l'aide de lignées recombinantes issues de la population biparentale RAC875 x Kukri. Ces travaux ont été initiés en amont dans le cadre de la thèse de doctorat de Pauline Thomelin et publiés durant ce projet (Thomelin *et al.* 2021). En utilisant les banques de séquençage du génome des quatre lignées parentales australiennes (Edwards *et al.* 2012), l'Université d'Adélaïde a identifié un gène présent dans l'intervalle de 690 kbp qui diffère entre Drysdale-RAC875 et Gladius-Kukri. Ce gène, modifié dans le promoteur chez RAC875, contient un domaine de réponse à l'acide abscissique, l'hormone de stress chez les plantes (Yoshida *et al.* 2014, *Curr Opin Plant Biol*). Des résultats préliminaires de PCR quantitative ont confirmé que ce gène serait sous-exprimé dans la lignée tolérante au stress RAC875. L'annotation du gène révèle de fortes homologies de séquence avec des gènes du

protéasome, un complexe protéique responsable de la dégradation de protéines spécifiques. Le protéasome est un complexe qui interagit avec l'ubiquitine et dégrade des protéines cibles. La voie ubiquitine-protéasome a un rôle dans de nombreux processus biologiques tels que la croissance des plantes, la différenciation cellulaire, le contrôle du cycle cellulaire, les réponses aux stress et l'apoptose (Stone 2014, Front Plant Sci).

Notre hypothèse de travail était donc que ce gène candidat TraesCS3B02G572900 (chr3B:803628607 à 803630082), codait pour un régulateur négatif appartenant au complexe ubiquitine-protéasome (annoté IWGSCV1: E3 ubiquitin-protein ligase), que nous nommerons UBP. Ce gène étant sous-exprimé chez la lignée RAC875, le protéasome ne serait pas fonctionnel et par conséquent, la protéine cible ne serait pas dégradée, ce qui aurait un effet positif sur la biomasse et le développement des grains (Thomelin *et al.* 2021). Une mutation du gène candidat par TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) pourrait donc avoir un effet similaire à l'allèle de RAC875, augmentant la biomasse, le poids du grain et le rendement en condition de stress thermique et/ou hydrique.

Les travaux de ce projet ont été subdivisés en quatre volets complémentaires, visant à valider l'effet de l'allèle positif du gène TraesCS3B02G572900 et de faciliter l'utilisation du QTL qDHY.3BL en sélection, notamment dans les blés d'hiver utilisés en Europe. Le premier s'est focalisé sur l'étude de la variabilité allélique naturelle, au locus du QTL qDHY.3BL, dans des lignées de blé d'hiver et de printemps, par séquençage d'Exome. Le second a permis de développer du matériel végétal en vue de la validation fonctionnelle du gène candidat UBP via l'utilisation de la variabilité induite chimiquement présente dans des populations de mutants TILLING. Le troisième volet a consisté à caractériser phénotypiquement la variabilité naturelle du gène UBP et d'en décoder les mécanismes physiologiques dans un vaste réseau d'essai (France, US, Espagne, Australie, Mexique). Enfin, le dernier volet a permis de mettre en évidence le pattern d'expression de la protéine UBP par séquençage d'ARNm de lignées sous stress thermique et hydrique, cultivées en conditions contrôlées.

2 Matériel et méthode

► Caractérisation phénotypique de la variabilité induite et naturelle chez le blé d'hiver et de printemps en conditions naturelles et contrôlées

Matériel végétal

La validation de l'effet du QTL qDHY.3B sur le rendement en condition de stress hydrique et thermique a été réalisée par l'évaluation de lignées quasi-isogéniques (NIL) créées en amont du projet par Limagrain (fonds hiver) et l'Université d'Adélaïde (fonds printemps). Ces lignées NIL ont été obtenues par au moins trois rétrocroisements successifs du parent donneur (allèle positif) avec des lignées receveuses (NIL BC pour Backcross) ou par autofécondations successives de lignées hétérozygotes pour l'allèle d'intérêt (lignées NIL HIF pour *Heterogenous Inbred Families*). La construction de ce matériel a été pilotée par l'utilisation de marqueurs moléculaires couvrant le QTL qDHY.3B. Quel que soit le type de

construction utilisé, une dernière étape d'autofécondation des plantes homozygotes au locus d'intérêt a permis de générer des couples de lignées homozygotes (couples NIL) pour chacun des deux allèles positifs et négatifs. Les évaluations au champ ont été réalisées sur ces couples NIL provenant de 3 fonds génétiques (de type printemps et hiver) décrits ci-dessous.

Lignées Isogéniques NIL HIF RAC875 x ALTIGO (fond hiver) : 3 couples

Trois couples de lignées quasi-isogéniques de type NIL HIF ont été produites à partir d'une population biparentale issue d'un croisement entre une variété de blé tendre d'hiver français nommée ALTIGO et la lignée printemps RAC875. Ces lignées ont été phénotypées en champ en condition de stress hydrique et thermique en 2017. Ces premiers essais avaient démontré des améliorations du rendement de +4.6% en condition stressée pour les lignées isogéniques porteuses de l'allèle RAC875, sur les essais les plus stressés.

CODE semis	Nom lignée	Couple NIL	Allele	Type
RAC-11	RAAL_Q3B_056.2_R	RAAL_Q3B_056.2	ALT	HIF
RAC-13	RAAL_Q3B_056.2_D	RAAL_Q3B_056.2	RAC	HIF
RAC-22	RAAL_Q3B_118.2_R	RAAL_Q3B_118.2	ALT	HIF
RAC-24	RAAL_Q3B_118.2_D	RAAL_Q3B_118.2	RAC	HIF
RAC-28	RAAL_Q3B_153.2_R	RAAL_Q3B_153.2	ALT	HIF
RAC-30	RAAL_Q3B_153.2_D	RAAL_Q3B_153.2	RAC	HIF
ALT	Altigo	control	ALT	line
RAC	RAC875	control	RAC	line

Tableau 1 : 3 couples de lignées isogéniques RAC875x ALTIGO

Lignées isogéniques NIL BC RAC875 x LG-ABSALON (fond hiver) : 5 couples

Les NIL BC (lignées quasi-isogéniques construites par backcross) sont des lignées quasiment identiques à la lignée receveuse, ce qui permet de mieux estimer l'effet du QTL dans un fond élite. Cette construction a l'avantage d'être plus facilement utilisable en sélection que le matériel de type NIL HIF qui peut contenir trop d'allèles exotiques pour initier des croisements. A partir des lignées HIF ALTIGO x RAC875, nous avons construit des lignées NIL BC par rétrocroisements successifs avec une variété de blé d'hiver français nommée LG-ABSALON (variété Limagrain française élite sud). Ce matériel a été construit au cours de ce projet et a pu être évalué en champ en année 3.

CODE semis	Nom lignée	Couple NIL	Allele	Type
LGPB20-0011	RAC-R18-03_1	RAC-R18-03	Absalon	BCby Absalon
LGPB20-0012	RAC-R18-03_3	RAC-R18-03	RAC	BCby Absalon
LGPB20-0014	RAC-R18-07_2	RAC-R18-07	Absalon	BCby Absalon
LGPB20-0013	RAC-R18-07_0	RAC-R18-07	RAC	BCby Absalon
LGPB20-0015	RAC-R18-08_0	RAC-R18-08	Absalon	BCby Absalon
LGPB20-0016	RAC-R18-08_4	RAC-R18-08	RAC	BCby Absalon
LGPB20-0017	RAC-R18-09_0	RAC-R18-09	Absalon	BCby Absalon
LGPB20-0018	RAC-R18-09_4	RAC-R18-09	RAC	BCby Absalon
LGPB20-0019	RAC-R18-19_0	RAC-R18-19	Absalon	BCby Absalon
LGPB20-0020	RAC-R18-19_4	RAC-R18-19	RAC	BCby Absalon
ABSALON	LG-ABSALON	control	Absalon	line
RAC	RAC875	control	RAC	line

Tableau 2 : 5 couples de lignées isogéniques RAC875x LG-ABSALON



Lignées Isogéniques NIL HIF RAC875 x KUKRI (fond printemps) : 4 couples

Quatre couples de lignées quasi-isogéniques de type NIL HIF ont été développées par l'Université d'Adélaïde à partir d'une population biparentale issue de deux lignées de printemps : RAC875 x KUKRI. Ces lignées ont été multipliées en début de projet en Australie pour permettre la mise en place des essais de phénotypage du volet 3 (en Espagne, Mexique et Australie).

CODE semis	Nom lignée	Couple NIL	Allele	Type
NIL 1	1056 A	1056	RAC	HIF
NIL 2	1056 B	1056	Kukri	HIF
NIL 3	2164 A	2164	RAC	HIF
NIL 4	2164 B	2164	Kukri	HIF
NIL 5	97 A	97	RAC	HIF
NIL 6	97 B	97	Kukri	HIF
NIL 7	1314 A	1314	RAC	HIF
NIL 8	1314 B	1314	Kukri	HIF

Tableau 3 : 4 couples de lignées isogéniques RAC875x KUKRI

Populations de TILLING utilisées pour induire des mutations dans le gène candidat UBP

Trois populations de TILLING ont été utilisées pour identifier des mutations sur la copie 3B du gène UBP et ses copies homéologues (3A et 3D) dans des fonds génétiques printemps et hiver, mais aussi l'effet cumulé de mutations des copies 3A et 3B dans un fond printemps. Dans les 3 populations, des mutations de type non-sens (codon stop), pouvant induire une protéine tronquée (effet délétère) ont été recherchées en priorité. A défaut, des mutations non-synonymes (codon muté) induisant un changement de conformation dans la protéine ont été sélectionnées.

Populations de blé d'hiver : nous avons utilisé deux populations de TILLING des variétés de blé d'hiver APACHE et KALAHARI composées respectivement de 5351 et 2304 lignées mutées par EMS (ethyl methanesulfonate). Le screening a été réalisé par capture et séquençage (Illumina MiSeq) des gènes ciblés.

Population blé de printemps européen : nous avons exploité la population TILLING de blé tendre de printemps CADENZA mutée par EMS. Cette population se compose de 1200 mutants dont les mutations ont été séquencées et répertoriées dans la base de données www.wheat-tilling.com (Krasileva et al 2017).

Population blé de printemps australien : nous avons criblé les 2000 lignées TILLING de la variété de printemps GLADIUS mutées par EMS à l'aide de la méthode CEL1 en collaboration avec l'Université de Sydney (Dong et al 2009, Plant Genome). Des mutations dans le gène UBP de type non-synonymes, ont été confirmées en amont du projet pour 23 lignées (7 lignées 3A, 6 lignées 3B et 10 lignées 3D) par séquençage SANGER. Les 23 lignées mutées ont été multipliées et croisées au cours du projet pour produire des doubles (3AB, 3BD, 3AD) et triple (3ABD) mutants.

Réseau expérimental

Un réseau expérimental de 30 essais mis en place entre 2019 et 2022 en France, Espagne, Etats-Unis et Australie sur 13 lieux ; en champ et sur la plateforme conditions contrôlées DroughtSpotter (cf. tableau ci-contre).

Chaque couple de lignée isogénique a été évalué sur une, deux ou trois années, avec pour objectif de mesurer l'effet du QTL qDHY.3BL sur le rendement en réponse au stress hydrique et thermique et à déterminer les conditions environnementales pour lesquelles le gène UBP a un effet positif, en particulier dans les blés européens. Pour des raisons agronomiques les essais réalisés en champ sur les blés de printemps (Australie, Espagne) et les blés d'hiver (Etats-Unis du nord, France), ont été menés séparément.

Chaque essai a fait l'objet d'une randomisation de type « imbriquée totale », c'est-à-dire que la randomisation conservait la proximité des deux lignées d'un même couple isogénique (cf. couples NIL des tableaux 1, 2 et 3). Sur chaque essai, des lignées témoins correspondantes aux lignées parentales utilisées pour créer le matériel ont également été évaluées. Les plans expérimentaux visant à évaluer la réponse au stress hydrique et thermique ont été conduits en 3 à 4 répétitions et avec une à deux modalités d'irrigation (sèche/DRY et irriguée/IRR) selon les lieux, et visant un stress hydrique post floraison.

Phénotypage

Sur chaque lieu, nous avons mesuré les composantes classiques de rendement : précocité (date d'épiaison à 50%), hauteur des plantes, humidité du grain, rendement à 15% d'humidité, poids de mille grains et sur certains lieux le poids spécifique et teneur en protéines du grain. Un bilan hydrique précis et une mesure des variables météo a permis de caractériser le type de stress rencontré. Sur le site de Gréoux-les-Bains un dispositif de phénotypage automatisé et l'usage de mesures effectués via des capteurs embarquées sur un drone ont permis d'acquérir les fractions de couverture verte, la hauteur et l'architecture fine du couvert, ainsi que la sénescence via des mesures de NDVI. Des minirhizotrons ont également été mis en place sur ce site pour accéder à la dynamique de croissance et d'estimer le volume racinaire des plantes.

Analyse des effets du matériel isogénique

Nous avons utilisé un script d'analyse des couples NILs, codé en 'R', développé durant le projet FSOV NIL-N par la société Biogemma. Ce script permet l'automatisation des tests statistiques, la production de rapports de synthèse et des visualisations graphiques des effets observés (sous forme de graphe radar). Pour chaque lieu et année, les lignées isogéniques ont été analysées couple par couple pour chaque modalité Irrigué ou sec. Pour chaque variable, nous avons réalisé un test basé sur la méthode Fisher LSD (*Fisher's Least Significant Difference test*) avec une p-value fixée à 5% pour détecter les différences significatives entre les couples isogéniques. L'analyse multi-locale et multi-année a été réalisée à l'aide du package R Metafor (rma.mv) qui permet de caractériser un effet et son risque associé (seuil également fixé à 5%). Des visualisations graphiques de type boxplot ont également été produites sur les différentes variables à l'aide du logiciel TIBCO-SPOTFIRE version 12.0.3.

Analyse GWAS

Les lignées du panel étudié (220 blés élites européens de type hiver issus du projet BreedWheat), ont été

An- née	Génétique	Type NIL	Type	Nom couples NIL	Lieu	Pays	Provider	Modalités	Nb parcelles
2021	RAC x Altigo	HIF	Hiver	RAAL_Q3B (056-118)	DroughtSpotter (URRBRAE)	Australie	UA	DRY/ HEAT/CONTROL (2 dates de semis) x 4 rep	96 pots
2021	RAC x Altigo	HIF	Hiver	RAAL_Q3B (056-118-153)	GREOUX- LES-BAINS	France	Arvalis	DRY/IRR x 3 rep	48
2020	RAC x Altigo	HIF	Hiver	RAAL_Q3B (056-118-153)	DroughtSpotter (URRBRAE)	Australie	UA	DRY/ HEAT/CONTROL x 4 rep	72 pots
2020	RAC x Altigo	HIF	Hiver	RAAL_Q3B (056-118-153)	CHATEAUNEUF	France	Heliantis	DRY/IRR x 4 rep	64
2020	RAC x Altigo	HIF	Hiver	RAAL_Q3B (056-118-153)	SAINT- BONNET- DE-MURE	France	Arvalis	DRY/IRR x 3 rep	48
2019	RAC x Altigo	HIF	Hiver	RAAL_Q3B (056-118-153)	GREOUX- LES-BAINS	France	Arvalis	DRY/IRR x 3 rep	48
2019	RAC x Altigo	HIF	Hiver	RAAL_Q3B (056-118-153)	PUSIGNAN	France	Arvalis	DRY/IRR x 4 rep	64
2019	RAC x Altigo	HIF	Hiver	RAAL_Q3B (056-118-153)	WALLA WALLA	États-Unis	Limagrain	DRY/IRR x 4 rep	64
2022	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	CORDOBA	Espagne	Limagrain	IRR x 4 rep	64
2022	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	ENSAYOS- EN-ALBACETE	Espagne	Limagrain	IRR x 4 rep	64
2022	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	JEREZ	Espagne	Limagrain	DRY x 4 rep	64
2022	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	CARMONA	Espagne	Limagrain	DRY x 4 rep	64
2021	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	CORDOBA	Espagne	Limagrain	IRR x 4 rep	32
2021	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	ENSAYOS- EN-ALBACETE	Espagne	Limagrain	IRR x 4 rep	32
2021	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	JEREZ	Espagne	Limagrain	DRY x 4 rep	32
2021	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	CARMONA	Espagne	Limagrain	DRY x 4 rep	31
2020	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	CARMONA	Espagne	Limagrain	DRY x 4 rep	27
2020	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	CORDOBA	Espagne	Limagrain	IRR x 4 rep	32
2020	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	GATTON	Australie	UA	DRY x 4 rep	32
2020	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	GATTON	Australie	UA	IRR (2 dates de semis) x 4 rep	64
2020	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	WARWICK	Australie	UA	DRY x 4 rep	32
2020	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	WARWICK	Australie	UA	IRR (2 dates de semis) x 4 rep	64
2020	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 2164-97-1314	GATTON	Australie	UA	IRR (2 dates de semis) x 4 rep	48
2020	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 2164-97-1314	WARWICK	Australie	UA	IRR x 4 rep	24
2019	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 1056-2164-97-1314	GATTON	Australie	UA	IRR (2 dates de semis) x 4 rep	64
2020	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 2164-97-1314	DroughtSpotter (URRBRAE)	Australie	UA	DRY/ HEAT/CONTROL x 4 rep	72 pots
2021	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 2164-1314	DroughtSpotter (URRBRAE)	Australie	UA	DRY/ HEAT/CONTROL (2 dates de semis) x 4	96 pots
2022	RAC x Kukri	HIF	Printemps	UA lines 2164-1314	DroughtSpotter (URRBRAE)	Australie	UA	DRY/ CONTROL x 4 rep	64 pots
2021	RAC x Absalon	BC	Hiver	RAC-R18- (03-07-08-09-19)	SAINT-PAUL- LES ROMANS	France	Heliantis	DRY/IRR x 4 rep	96
2021	RAC x Absalon	BC	Hiver	RAC-R18- (03-07-08-09-19)	WALLA WALLA	États-Unis	Limagrain	DRY/IRR x 4 rep	96

Tableau 4 : Liste des 30 essais réalisés de 2019 à 2022

génomées avec la puce à SNPs Affymetrix Axiom 280 K (Rimbert *et al.* 2018). Les locus hétérozygotes, les SNPs monomorphes, les SNPs dont la fréquence allélique mineure (MAF) était inférieure à 5% ont été écartés de l'analyse. Les données manquantes ont été imputées avec Beagle 4.1 (Browning and Browning 2016). L'analyse GWAS a été réalisée avec FaST-LMM v2.07 (Lippert *et al.* 2011). Après filtrage des données, 161 772 SNPs ont été testés sur les traits mesurés sur 210 variétés dans les quatre types d'environnement. Les études d'association SNP-caractère ont été réalisées avec le modèle mixte à locus unique (Yu *et al.* 2006).

► Caractérisation génétique des lignées NIL

Analyse du fond génétique et de la taille du QTL qDHY.3BL (RAC875) introgressé

La totalité du matériel végétal isogénique disponible a été caractérisé génétiquement en utilisant la technique de génotypage haut débit, Illumina Axiom avec une puce 20K développée par la société Limagrain (données et marqueurs confidentiels). Ce marquage a permis de contrôler le niveau d'homologie du fond génétique en dehors de la zone d'intérêt (objectif 95% d'homologie) ainsi que de mesurer la taille du fragment du QTL d'intérêt introgressé. Des visualisations graphiques de chaque couple isogénique ont été mise en place afin de confirmer l'état d'homogénéité de chaque chromosome. Ces visualisations ont été réalisées à l'aide du logiciel TIBCO Spotfire version 12.0.3.

Génotypage de SNP par la méthode KASPar

Les SNP utilisés dans cette étude ont été génotypés par la méthode KASPar (KBiosciences, Herts, UK) sur les 551 individus de la population. Les oligonucléotides KASPar ont été dessinés avec le logiciel Primer picker (KBioscience), les amplifications PCR ont été réalisées sur un hydrocycleur (LGC genomics), sur 50 cycles à 57°C et les lectures ont été effectuées sur ABI PRISM 7900 HT.

► Identification de la variabilité allélique naturelle

L'intervalle de confiance du QTL qDHY.3BL contient 8 gènes qui sont également présents sur les homéologues 3A et 3D. L'identification de la variabilité a été effectuée sur les 21 gènes candidats (7 sur le chr3A, 8 sur chr3B et 6 sur chr3D).

TraesCS3B01G570900	TraesCS3A01G505200	TraesCS3D01G623100LC
TraesCS3B01G571000	TraesCS3A01G505100	TraesCS3D01G512400
TraesCS3B01G572500	TraesCS3A01G505300	TraesCS3D01G512500
TraesCS3B01G572600	TraesCS3D01G512600	
TraesCS3B01G572700	TraesCS3A01G505300	TraesCS3D01G512500
TraesCS3B01G572800		
TraesCS3B01G572900	TraesCS3A01G505400	TraesCS3D01G512700
TraesCS3B01G573000	TraesCS3A01G505500	TraesCS3A01G684600LC

Tableau 5 : Liste des 21 gènes candidats homéologues 3A,B,D

Le séquençage de ces 21 gènes sur un panel de 528 blés d'hivers a été effectué par la technologie « NimbleGen Sequence Capture » en phase liquide puis séquençage par Illumina MiSeq selon un protocole interne Limagrain. Ce panel de 458 lignées était constitué de 450 lignées, représentant la variabilité mondiale des blés d'hiver (Core Collection INRA /projet BreedWheat) et de 78 lignées de blé sélectionnées pour représenter la variabilité des panels européens (lignées déjà

phénotypées dans le projet BreedWheat en condition de stress azoté et hydrique).

Un second jeu de données de séquençage shot-gun du génome de 16 variétés de blés (Edwards et al 2012) a été utilisé pour analyser la variabilité des blés de printemps sur ces 21 gènes. A l'aide des variants identifiés, un set de marqueurs KASPar a été utilisé pour génotyper un panel de 627 variétés représentant la diversité mondiale des blés de printemps.

► Analyse d'expression des gènes du QTL qDHY.3BL en conditions de stress hydrique et thermique

L'analyse de l'expression génique a été réalisée par séquençage d'ARN stranded (séquençage orienté pleine longueur) sur un total de 48 échantillons. Ces échantillons ont été réalisés sur 4 lignées NILs issues de 2 couples isogéniques : 1314 A-B et 2164 A-B. Les ARN ont été extraits sur des plantes cultivées en conditions contrôlées sur la plateforme DroughtSpotter de l'UA selon deux modalités de stress hydrique (WW : well watered et D: Drought), à 3 et 10 jours après l'application du stress et en 3 répliques techniques sur un échantillon de feuilles prélevé sur la feuille drapeau. Soit 4 lignées x 2 temps (3j/10j) x 2 traitements (WW/D) x 3 échantillons = 48 échantillons. Après un test de qualité de l'ARN, le séquençage a été réalisé sur la plateforme NovaSeq6000 et les données obtenues analysées pour identifier les gènes différentiellement exprimés entre les conditions de traitement et les différentes dates après le début du stress hydrique, à l'aide d'un pipeline interne utilisant le package d'analyse DESeq2 version : 1.42.0.

3 Résultats et Discussion

► Étude de la variabilité allélique naturelle du gène UBP chez le blé d'hiver et de printemps

Les 8 gènes candidats du chromosome 3B de la zone du QTL qDHY.3BL et leurs gènes orthologues sur les chromosomes 3A et 3D ont été séquencés par séquence capture sur un panel de 528 lignées de blé d'hiver incluant les parents des populations (RAC875, Altigo, Absalon, Kukri), puis par séquençage d'Exome sur un Panel de 250 lignées de blé Limagrain (panel confidentiel). Ce séquençage a permis de mettre en évidence 2321 variants de type SNP dans la zone du chromosome 3B de 802846473 bp à 804009874 bp. Dans la zone couverte par le gène candidat UBP (TraesCS3B01G572900), nous avons identifié 42 variants, dont 30 dans le gène et 12 dans la région promotrice de 2 kb en 5' du gène. Une annotation fonctionnelle des 30 variants de la région génique a permis d'identifier : 6 variants 3' UTR, 3 variants 5' UTR, un variant intronique, 18 variants synonymes et 2 variants non synonymes (p.Ala297Pro en position 803628975 et p.Val296Ala en position 803628977) situés tous deux dans l'exon 2 du gène. L'analyse fine des données de couverture de séquençage a également confirmé que le gène UBP n'était pas dupliqué.

La région promotrice étant par définition non ou mal couverte par la capture (définie sur le CDS du gène), nous avons complété le jeu de données par un séquençage SANGER de la région promotrice (environ 4500 bp en 5' du gène) sur les parents RAC 875, Altigo et Absalon.

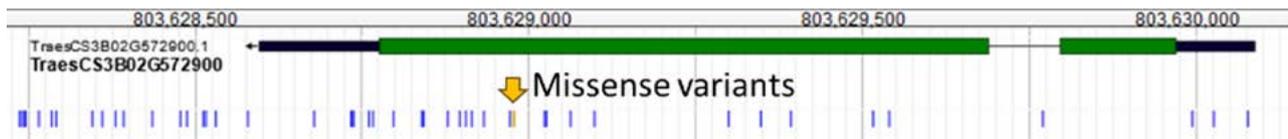


Figure 1 : représentation graphique des 30 variants identifiés dans le gène UBPA (TraesCS3B01G572900), SNP synonymes en bleu, SNP non synonymes (missense) en jaune

L'analyse des 42 variants de la zone, n'a mis en évidence aucun polymorphisme entre le parent tolérant à la sécheresse RAC875 versus les parents Absalon et Altigo. Cependant, ils étaient tous polymorphes entre RAC875 et la lignée sensible printemps Australienne Kukri. L'analyse du promoteur, n'a pas non plus mis en évidence de polymorphismes spécifiques entre RAC875 et Absalon/Altigo. Nous avons cependant retrouvé le polymorphisme du SNP ADW595 entre RAC875 et Kukri, identifié par l'UA. En effet, ce SNP ADW595 positionné dans la région promotrice du gène (A to T variant at position chr3B :803634611 bp) a été proposé comme pouvant être le polymorphisme causal du gène candidat UBPA responsable de l'effet du QTL qDHY.3BL par Thomelin *et al.* 2021. Les variants de la zone, incluant le variant ADW595 étaient tous liés entre eux et portaient l'allèle variant, de type RAC875, sur 280 individus du panel étudié, soit une fréquence élevée de 55.34% et seulement 2 haplotypes observés au sein des blés d'hiver séquencés.

En parallèle, l'UA a réalisé la même analyse par génotypage de deux SNP (ADW594 et ADW595) sur un panel de 627 lignées de blés de printemps représentant la variabilité mondiale. Ce travail a permis de mettre également en évidence une fréquence élevée de l'allèle RAC875 en Australie et en Europe (Thomelin *et al.* 2021).

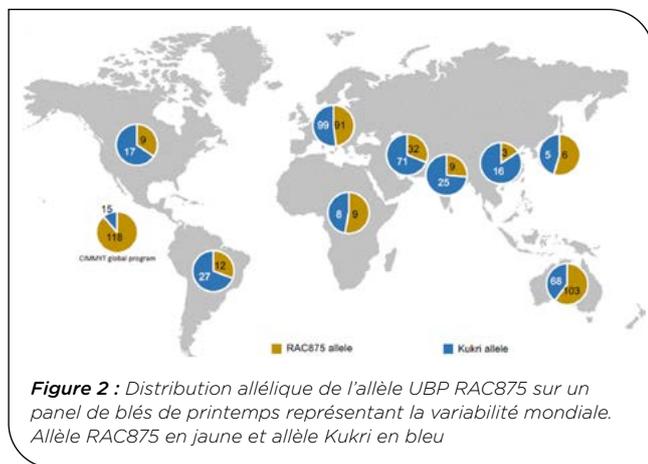


Figure 2 : Distribution allélique de l'allèle UBPA RAC875 sur un panel de blés de printemps représentant la variabilité mondiale. Allèle RAC875 en jaune et allèle Kukri en bleu

A partir des SNP identifiés par séquençage, un sous set de 21 variants, couvrant le gène UBPA, a été génotypé par la méthode KASPar sur un panel composé de blés élités européens de type hiver. Ce matériel, avait déjà été évalué en champ sur 3 années avec 26 essais, dans le projet BreedWheat dans des environnements sous contraintes abiotiques, dont notamment 6 essais présentant un stress hydrique avéré (travaux de Touzy *et al.* 2019). Une analyse GWAS (161K SNP Axiom + 21 SNP UBPA) a été effectuée selon deux méthodes : par environnement et multi-environnement classifiés selon l'analyse des indices de stress hydrique et tels que décrits dans la figure ci-contre.

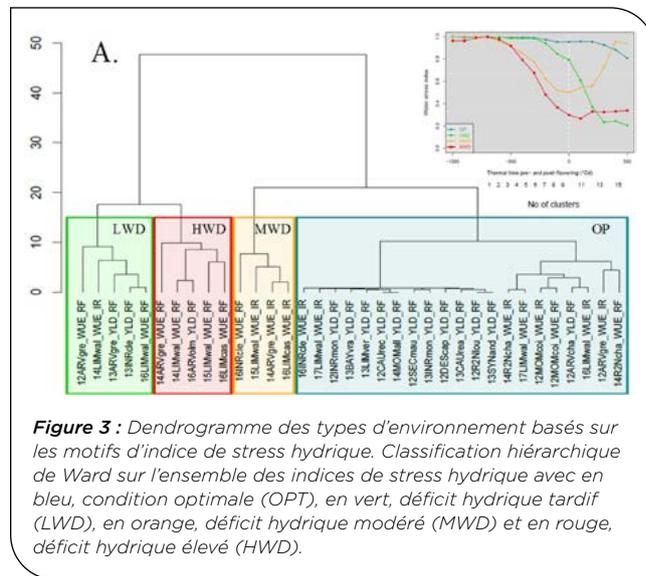


Figure 3 : Dendrogramme des types d'environnement basés sur les motifs d'indice de stress hydrique. Classification hiérarchique de Ward sur l'ensemble des indices de stress hydrique avec en bleu, condition optimale (OPT), en vert, déficit hydrique tardif (LWD), en orange, déficit hydrique modéré (MWD) et en rouge, déficit hydrique élevé (HWD).

L'analyse des données de rendement (GY), précocité de floraison (DOE) et poids de mille grains (TKW), n'ont pas permis de mettre en évidence de région associée à la tolérance au stress hydrique et thermique sur le chromosome 3B (seuil : $-\log_{10}(Pvalue) > 3$), et tout particulièrement dans la région du gène UBPA, quelle que soit la méthode testée. Le Manhattan plot ci-dessous présente les résultats obtenus avec la méthode par environnement, au niveau du chromosome 3BL et du QTL qDHY.3B matérialisé par la flèche rouge.

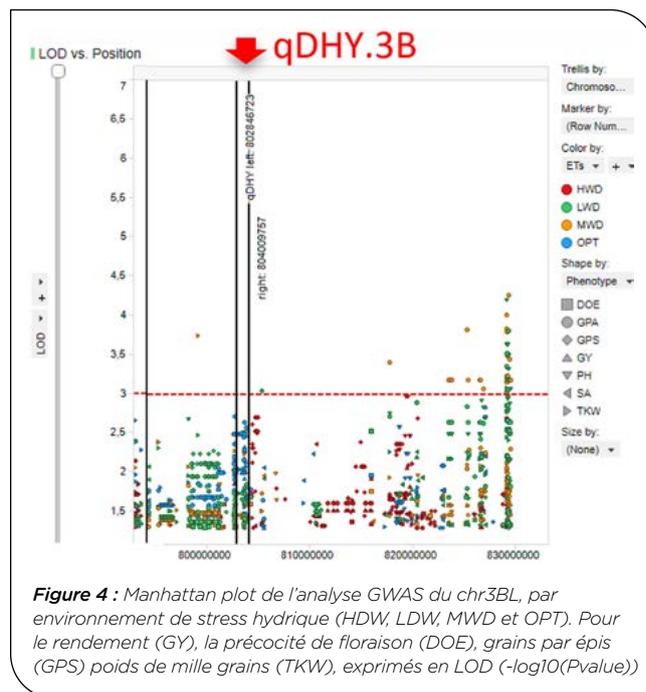


Figure 4 : Manhattan plot de l'analyse GWAS du chr3BL, par environnement de stress hydrique (HDW, LDW, MWD et OPT). Pour le rendement (GY), la précocité de floraison (DOE), grains par épis (GPS) poids de mille grains (TKW), exprimés en LOD ($-\log_{10}(Pvalue)$)

► **Identification de variabilité allélique induite dans le gène UBP dans des populations de TILLING**

Quatre populations de TILLING ont été exploitées pour identifier des mutations sur les copies 3A/3B/3D du gène UBP dans des fonds génétiques printemps (GLADIUS et CADENZA) et hiver (APACHE et KALAHARI).

Aucune mutation STOP n'a pu être détectée dans la population CADENZA, nous avons seulement identifié des mutations non-synonymes de moindre intérêt pour la validation fonctionnelle de ce gène. Dans les populations APACHE et KALAHARI, malgré des efforts conséquents de screening par séquençage et de validation des mutations par la méthode KASPAR, nous n'avons identifié que trois mutations STOP sur la copie homéologue UBP_3A (TraesCS3A01G505400) et une mutation du site d'épissage de l'intron du gène candidat UBP_3B, décrites dans le tableau ci-dessous.

Population	Mutant ID	Gène	Chrom.	Impact	Mutation type
Apache	APB_3843	TraesCS3A01G505400	3A	HIGH	stop_gained
KALAHARI	Kal_06_302	TraesCS3A01G505400	3A	HIGH	stop_gained
KALAHARI	Kal_06_177	TraesCS3A01G505400	3A	HIGH	stop_gained
KALAHARI	Kal_06_196	TraesCS3B01G572900	3B	HIGH	splice_intron_variant

Tableau 6 : Liste des mutants TILLING type hiver identifiés

Pour toutes ces mutations, nous avons sélectionné et multiplié des plantes homozygotes mutantes et sauvages (de type lignées isogéniques).

Dans la population GLADIUS, l'UA a fixé et multiplié les plantes portant les deux mutations STOP identifiées en amont de ce projet dans le gène UBP_3B (TraesCS3B01G572900). Il n'a pas été possible non plus d'obtenir des doubles et triples mutants fertiles

en croisant ces mutants avec d'autres mutants STOP sur les copies 3A et 3D (TraesCS3A01G505400 et TraesCS3D01G512700).

► **Caractérisation phénotypique de la variabilité induite et naturelle chez le blé d'hiver et de printemps en conditions naturelles et contrôlées**

L'objectif de cette partie était de confirmer l'effet positif des allèles du QTL qDHY.3B sur le rendement en condition de stress hydrique et thermique dans un blé d'hiver français et d'étudier l'effet des nouveaux allèles induits par mutagenèse des blés d'hiver et de printemps, ainsi que de tenter de décrire les mécanismes physiologiques.

Concernant les mutations induites dans le matériel hiver et printemps, les quantités de semences produites pour les mutants étant trop faibles, il n'a pas été possible de phénotyper les mutants durant ce projet.

La validation de la variabilité naturelle (Allèle RAC875 du QTL qDHY.3B) sur le rendement en condition de stress hydrique et thermique a été réalisée par l'évaluation de lignées quasi-isogéniques (NIL) dans des fonds hiver et printemps, par construction de type HIF (Heterogenous Inbred Families) et BC (Backcross).

Dans un premier temps nous avons évalué la qualité du matériel génétique produit par génotypage moléculaire (18 000 SNP) et analyse de similarité des couples isogéniques. Pour tous les couples NIL retenus dans cette étude, nous avons pu démontrer que la distance génétique entre les couples isogéniques était inférieure à 0.1 (distance génétique de Roger), comme c'est le cas dans l'exemple présenté ci-contre (figure 5) sur le matériel isogénique RAC875 x KUKRI, dans le fond printemps. Une analyse similaire sur le matériel RAC875 x ABSALON (de type NIL BC) a permis de confirmer que toutes les lignées isogéniques étaient proches de leur parent récurrent ABSALON avec une distance de Roger comprise entre 0.059 et 0.172, ce qui est très satisfaisant pour ce type de construction.

A)

	KUKRI	RAC 875	NIL1_1056A	NIL2_1056B	NIL3_2164A	NIL4_2164B	NIL5_97A	NIL6_97B	NIL7_1314A	NIL8_1314B
KUKRI	0	0.751	0.499	0.495	0.488	0.485	0.525	0.525	0.512	0.518
RAC 875	0.751	0	0.558	0.563	0.57	0.572	0.536	0.534	0.546	0.541
NIL1_1056A	0.499	0.558	0	0.102	0.57	0.569	0.443	0.437	0.52	0.522
NIL2_1056B	0.495	0.563	0.102	0	0.567	0.564	0.452	0.441	0.517	0.519
NIL3_2164A	0.488	0.57	0.57	0.567	0	0.112	0.592	0.589	0.564	0.566
NIL4_2164B	0.485	0.572	0.569	0.564	0.112	0	0.584	0.58	0.561	0.565
NIL5_97A	0.525	0.536	0.443	0.452	0.592	0.584	0	0.118	0.539	0.545
NIL6_97B	0.525	0.534	0.437	0.441	0.589	0.58	0.118	0	0.544	0.548
NIL7_1314A	0.512	0.546	0.52	0.517	0.564	0.561	0.539	0.544	0	0.097
NIL8_1314B	0.518	0.541	0.522	0.519	0.566	0.565	0.545	0.548	0.097	0

B)

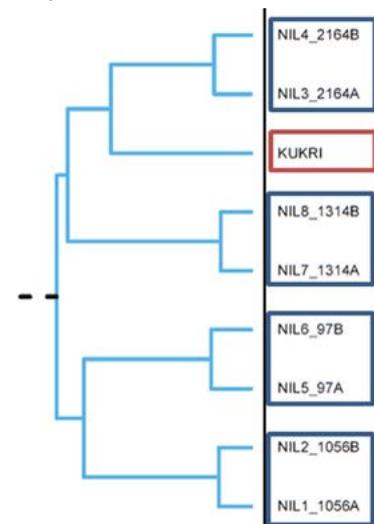


Figure 5 : Évaluation de la distance génétique entre les couples NIL du matériel isogénique RAC875 x KUKRI dans le fond printemps (A). Distance génétique de Roger (B) Clustering dendrogram

Pour tous les couples isogéniques, les marqueurs moléculaires spécifiques de la lignée RAC875, développés en début de projet, ont permis de confirmer que les couples portaient les versions alléliques attendues (c'est-à-dire allèle RAC875 versus l'allèle sensible des receveurs).

Les différents locus Vrn (Vernalization) et Ppd (Photoperiode) connus pour jouer un rôle important dans la régulation de la floraison chez le blé ont été caractérisés chez toutes les lignées NIL à l'aide d'un set de marqueurs moléculaires (set de marqueurs confidentiels Limagrain). Ils ont permis de confirmer que les NIL HIF RAC875x KUKRI étaient de type printemps et les lignées RAC875x ALTIGO de type hiver. Nous avons cependant mis en évidence quelques variations au niveau de certains locus Vrn et Ppd mais sans qu'il y ait de divergences au sein d'un même couple de lignées isogéniques. Les lignées HIF BC RAC875 x ABSALON étaient toutes de type hiver et parfaitement fixées aux allèles du parent récurrent ABSALON.

Caractérisation des lignées NIL RAC875 x ALTIGO, fond hiver européen.

Les trois couples de lignées isogéniques de type HIF ont été évalués en champ sur 6 lieux de 2019 à 2021 en France et Etats-Unis dans des environnements soumis à différents stress hydriques (conditions optimales irriguées ou sèches). Sur ces différents essais, nous n'avons pas réussi à démontrer l'effet positif des lignées isogéniques portant l'allèle RAC875, sur le rendement en condition de stress hydrique. Au contraire, sur certains lieux, cet allèle semble apporter un effet négatif en condition stressée (non irriguée). A titre d'illustration, c'est ce qui a été observé sur le site de Gréoux-les-Bains en 2021, sur lequel un stress hydrique en condition non irriguée a été confirmé à partir du stade floraison, via un calcul d'indice de stress hydrique (cf. figure ci-dessous) et une perte de rendement de 22.3 q/ha entre les deux conditions.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 7 ci-contre, sur les 3 couples testés, nous n'observons pas d'effet

positif sur le rendement (GY 15%) en condition de stress hydrique, sur les lignées portant l'allèle RAC875 (Q3B+ / en rouge) versus les lignées portant l'allèle ALTIGO (Q3B- / en bleu) au QTL. Nous observons au contraire une baisse de rendement moyen de -4.1 et -4.2 q/ha pour les deux couples NIL RAAL_Q3B_056.2 et 118.2, et un écart non significatif pour le couple 153.2.

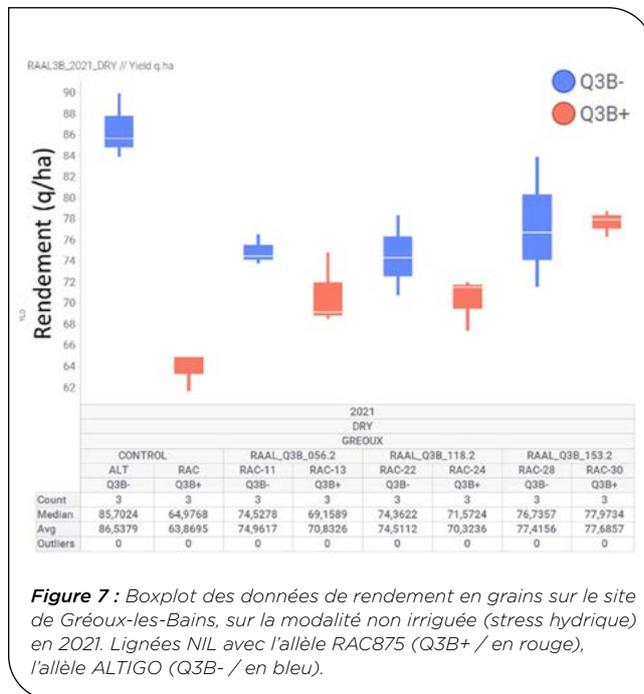


Figure 7 : Boxplot des données de rendement en grains sur le site de Gréoux-les-Bains, sur la modalité non irriguée (stress hydrique) en 2021. Lignées NIL avec l'allèle RAC875 (Q3B+ / en rouge), l'allèle ALTIGO (Q3B- / en bleu).

À la suite de ces observations, il ne nous a pas semblé pertinent d'exploiter les données générées par le dispositif de phénotypage automatisé de Gréoux-les-Bains (fractions de couverture verte, mesures de sénescence NDVI, etc...), ni les données des minirhizotrons, mis en place sur ce site, pour explorer le développement racinaire et tenter de décrire les mécanismes physiologiques sous-jacents du QTL qDHY.3BL, alors que l'effet du QTL n'était pas visible.

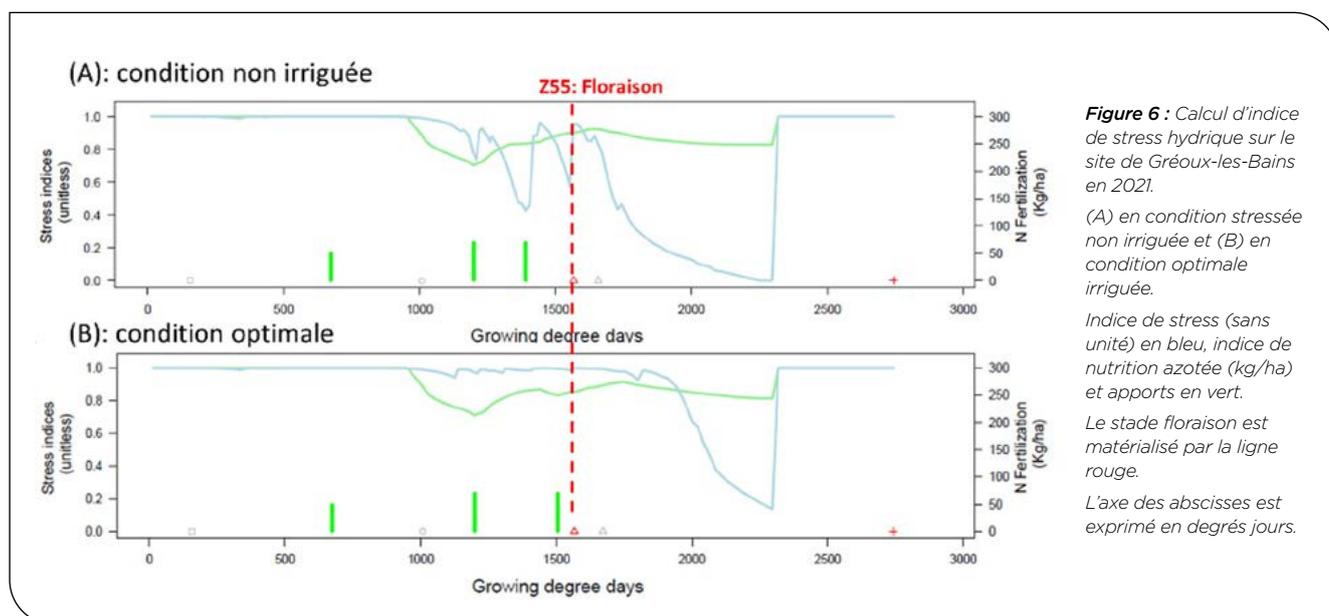


Figure 6 : Calcul d'indice de stress hydrique sur le site de Gréoux-les-Bains en 2021.

(A) en condition stressée non irriguée et (B) en condition optimale irriguée.

Indice de stress (sans unité) en bleu, indice de nutrition azotée (kg/ha) et apports en vert.

Le stade floraison est matérialisé par la ligne rouge.

L'axe des abscisses est exprimé en degrés jours.

Caractérisation des lignées NIL RAC875 x ABSALON, fond hiver européen.

Les cinq couples de lignées isogéniques de type HIF et deux lignées parentales, produits en fin de projet, ont été évalués en champ sur seulement 2 lieux en 2021 en France et Etats-Unis dans des environnements soumis à un stress hydriques (conditions optimales irriguées ou sèches non irriguées).

Bien que ces couples de lignées isogéniques soient très proches génétiquement du parent récurrent ABSALON, l'analyse des effets a été réalisée par comparaison des couples isogéniques. Sur les deux lieux étudiés (figure 8), nous n'avons pas réussi à mettre en évidence d'effet positif significatif de l'allèle RAC875 sur le site de Walla walla (A) et Saint-Paul-les-Romans (B).

Les résultats au champ, obtenus sur les lignées isogéniques RAC875 x ALTIGO et ABSALON semblent vouloir démontrer que l'effet du QTL qDHY.3BL n'est pas significatif dans le fond génétique des blés d'hiver européens et les environnements testés dans cette étude.

Caractérisation des lignées NIL RAC875 x KUKRI, fond printemps australien.

Les 3 couples de lignées isogéniques de type HIF et les deux lignées parentales ARC875 et KUKRI, développés par l'UA ont été évalués sur 17 lieux en Australie et en Espagne entre 2019 et 2022 dans des environnements soumis à un stress hydriques et thermique (conditions optimales irriguées ou sèches non irriguées situées parfois sur des lieux différents).

Sur les 10 essais réalisés en Espagne du Sud, nous avons observé des variations de l'effet de l'allèle RAC875 sur le rendement, en fonction des lieux, années et environnement (tableau 7A). En condition stressées, nous avons mesuré des variations de rendement positives et négatives (tableau 7B) entre les deux allèles RAC875 et KUKRI. Ces variations pouvant aller par exemple de +3.8 à -3.1 q.ha pour le couple NIL 2164, qui présente en moyenne des pertes de rendement en condition optimale irriguée.

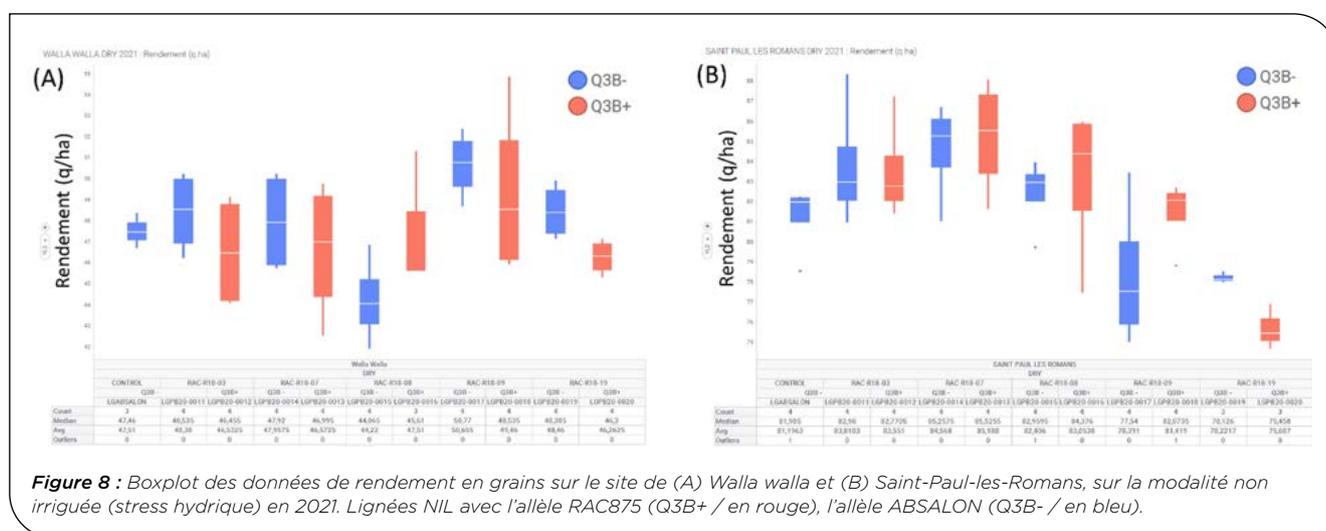


Figure 8 : Boxplot des données de rendement en grains sur le site de (A) Walla walla et (B) Saint-Paul-les-Romans, sur la modalité non irriguée (stress hydrique) en 2021. Lignées NIL avec l'allèle RAC875 (Q3B+ / en rouge), l'allèle ABSALON (Q3B- / en bleu).

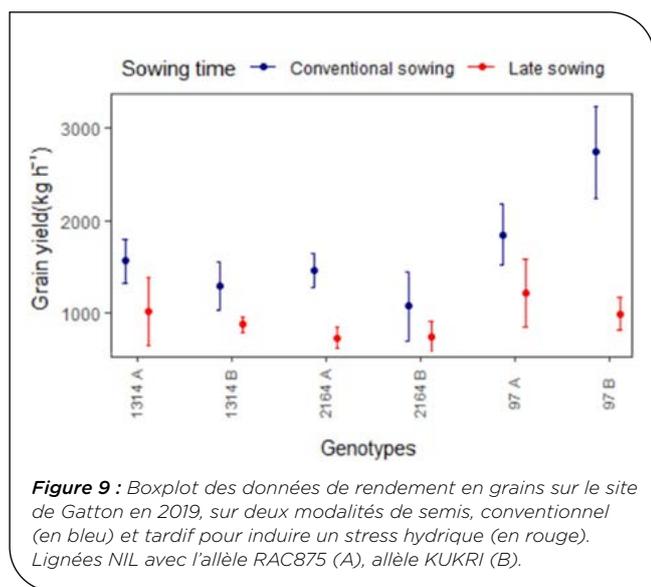
A) Condition	Stressé (DRY)					Optimal (IRR)				
Année	2020	2021	2021	2022	2022	2020	2021	2021	2022	2022
Lieu	CAR	CAR	JER	CAR	JER	COR	COR	PA-ALB	COR	PA-ALB
individual	YIELD	YIELD	YIELD	YIELD	YIELD	YIELD	YIELD	YIELD	YIELD	YIELD
RAC875	32,5	10,2	44,1	38,6	48,2	58,7	77,7	90,0	62,2	92,3
KUKRI	23,9	7,3	37,1	35,6	41,7	52,1	66,1	89,1	62,5	75,7
2164A	31,3	9,1	45,9	33,3	49,2	64,6	77,2	86,4	66,6	83,4
2164B	34,4	9,9	42,1	31,8	46,8	61,5	82,6	96,1	67,0	86,7
97A	25,3	7,0	40,0	36,3	37,7	54,8	66,1	85,5	49,1	82,9
97B	24,9	6,9	35,1	34,8	36,2	55,3	64,6	83,6	47,8	81,9
1314A	39,3	13,5	43,7	31,2	44,5	64,1	81,0	93,4	64,3	83,8
1314B	38,0	13,0	44,9	32,3	43,0	64,7	78,8	88,9	60,8	83,2

B) Condition	Stressé (DRY)					Optimal (IRR)				
Année	2020	2021	2021	2022	2022	2020	2021	2021	2022	2022
Lieu	CAR	CAR	JER	CAR	JER	COR	COR	PA-ALB	COR	PA-ALB
Couple NIL	Effet rendement moyen en q.ha (allèle RAC875 - allèle KUKRI)									
Parents	8,6	2,9	7,0	3,1	6,4	6,7	11,7	0,9	-0,3	16,6
2164	-3,1	-0,8	3,8	1,5	2,4	3,1	-5,4	-9,7	-0,4	-3,3
97	0,4	0,1	4,9	1,5	1,5	-0,6	1,5	1,8	1,3	1,0
1314	1,3	0,5	-1,2	-1,1	1,5	-0,6	2,2	4,5	3,5	0,6

Tableau 7 : Rendement moyen (q,ha) des lignées RAC875 x KUKRI sur les 10 essais espagnols en condition stressée (DRY) et non stressée (IRR). (A) rendement moyen sur les 4 répétitions, (B) Différence de rendement entre l'allèle A (RAC875) et l'allèle B (KUKRI), positifs en vert, négatif en rouge et non significatifs en bleu.

Nous avons donc pu mettre en évidence un effet du QTL, mais il semble variable entre les couples et les environnements testés, ce qui semble vouloir démontrer un manque de stabilité du QTL dans les environnements stressés.

Des essais similaires conduits en Australie sur 7 essais, à Gatton et Warwick, tendent à démontrer les mêmes conclusions sur la stabilité du QTL. C'est par exemple le cas de l'essai de Gatton en 2019 (cf. figure 9, ci-dessous), où l'on peut observer des effets sur le rendement assez variables d'un couple NIL à l'autre avec des effets peu significatifs de l'allèle RAC875 en condition de stress thermique (semis tardif), en rouge. Nous pouvons également remarquer qu'en condition de stress hydrique, le rendement moyen est généralement compris entre 8 et 12 q.ha.

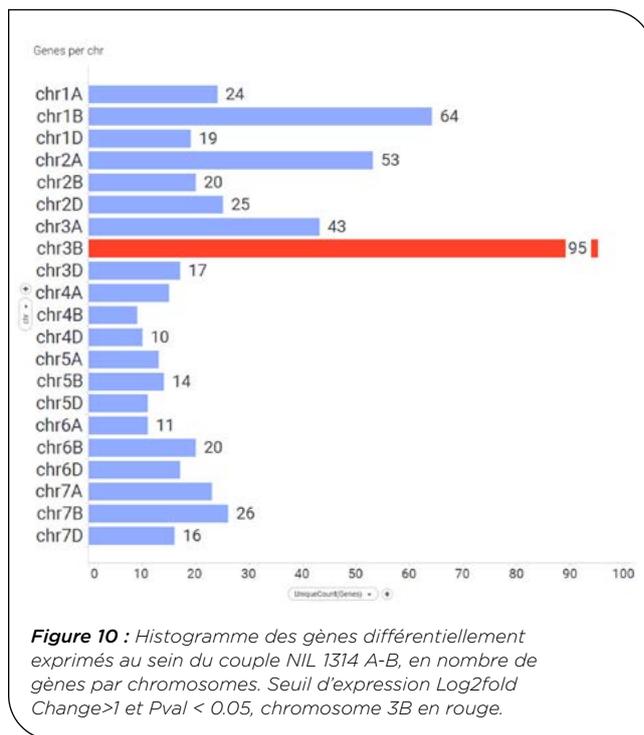


► Analyse d'expression des gènes du QTL qDHY.3BL en conditions de stress hydrique et thermique

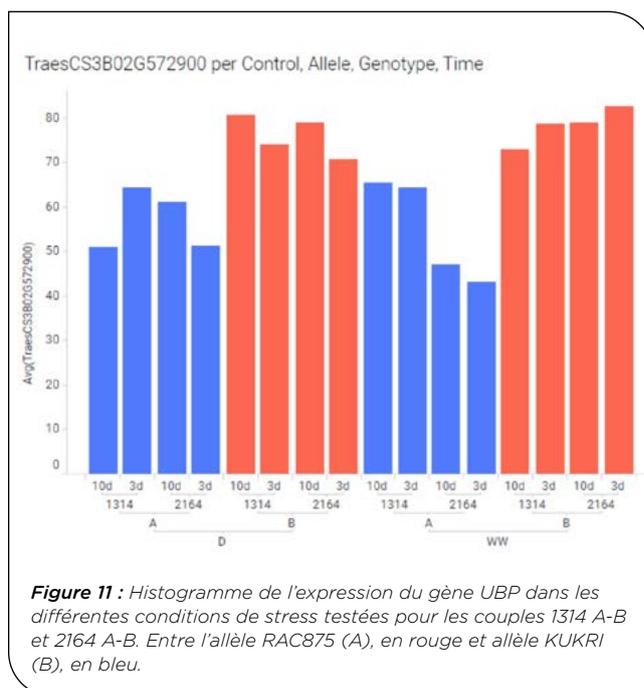
L'analyse de l'expression par séquençage d'ARN avait pour objectif de confirmer l'expression différentielle du gène UBP vis-à-vis de sa réponse au stress, mis en évidence par Thomelin *et al.* 2021 par qPCR et de documenter tous les gènes différentiellement exprimés afin de tenter d'identifier les processus biologiques et voies métaboliques affectées par l'allèle UBP présent chez RAC875.

Nous avons séquencé le 2 couples isogéniques : 1314 A-B et 2164 A-B (lignées printemps australiennes), selon deux modalités de stress hydrique (WW : irrigation optimale et D : stressé), à 3 et 10 jours après l'application du stress. L'analyse des données de séquençage d'ARN a permis d'identifier 79 309 gènes exprimés (High Conf: 60 345 + Low Conf: 18 964 gènes) dans nos conditions expérimentales. L'analyse du score Log2foldChange a mis en évidence 571 gènes différentiellement exprimés (allèle RAC875 vs KUKRI ; seuil Log2foldChange>1 et pval < 0.05), au sein du couples NILs 1314, en condition de stress hydrique à J+10. Ces gènes sont répartis sur les 21 chromosomes avec, une prédominance sur le chromosome 3B (95 gènes), 3A, 2A, 1B (cf. figure 10). Cependant, il est possible que ces régions différentiellement exprimées soient plus liées à la

construction isogénique imparfaite des lignées NIL, plutôt qu'à des gènes régulés par l'expression du gène UBP_3B.



L'analyse de l'expression du gène UBP_3B (TraesCS3B01G572900), a démontré une variation d'expression assez faible entre les allèles RAC875 et KUKRI : Log2fold Change de 0,63 et pval de 0.03. Cependant, malgré le manque de significativité nous confirmons une légère sous expression du gène UBP portant l'allèle RAC875 (en bleu), avec un différentiel non significatif entre les conditions de stress (D et WW) appliquées lors de cette expérimentation (cf. figure 11).



4 Conclusion

Malgré un contexte très complexe lié au COVID et à des réorganisations chez deux des partenaires, la collaboration entre Limagrain, l'université d'Adélaïde et Arvalis l'institut du végétal a permis de disséquer en profondeur le QTL qDHY.3BL, identifié par l'UA dans le cadre des travaux de thèse de J. Bonneau (Bonneau *et al.* 2013). Ce projet est un bel exemple de collaboration internationale et une illustration de la continuité du projet ANR BreedWheat (ANR-10-BTBR-03) dont une partie des données génotypique et phénotypiques ont pu être exploitées pour réaliser une analyse GWAS. Les différents volets de ce projet ont permis d'étoffer les connaissances de ce locus et d'évaluer l'intérêt de ce QTL détecté initialement dans le blé de printemps pour l'amélioration des blés d'hiver européens vis-à-vis de tolérance au stress hydrique et thermique qui représente un des défis de demain pour l'agriculture.

La caractérisation de la variabilité allélique du gène candidat UBP_3B a permis de démontrer que les allèles de ce locus (version RAC875, tolérant) étaient déjà présents à une fréquence élevée dans le matériel français et européen des blés d'hiver. Les nombreux essais mis en place tendent à démontrer que l'effet de ce QTL dans les blés d'hiver a un impact très modéré voire négatif et qu'il présente une faible stabilité dans les environnements évalués. Nous avons cependant pu confirmer une tendance positive des effets du QTL dans les blés de printemps en Europe, cependant le potentiel de rendement étant plus élevé en conditions de stress hydrique en Europe, 25 à 50 q.ha versus 8 à 12 q.ha en Australie, il semble plus difficile de mettre en évidence et valoriser l'effet de ce QTL dans les environnements actuels européens.

La validation fonctionnelle du gène candidat UBP_3B par l'utilisation de mutations induites n'a pas pu être réalisée au cours de ce projet, mais plusieurs mutants ont été identifiés et multipliés en vue de cet objectif.

Des expérimentations complémentaires et analyses des données produites (Expérimentations DroughtSpotter, mesure des flux de sèves ou architecture racinaire) pourraient s'avérer nécessaires pour évaluer les mécanismes physiologiques sous-jacents mis en place dans le mécanisme de tolérance de ce QTL, mais les données de séquençage d'ARN ont confirmé des variations d'expression du gène candidat UBP.

D'un point de vue scientifique et méthodologique, ce projet propose différentes approches, analyses, technologies et dispositifs expérimentaux qui pourront être utilisés pour valider d'autres QTL identifiés pour d'autres caractères d'intérêt agronomique.

Ce projet a également permis de fournir un catalogue de lignées isogéniques printemps et hiver susceptibles d'être rapidement exploités dans des programmes de sélection variétale ainsi que des marqueurs moléculaires pour suivre le QTL. Enfin, une publication a pu être réalisée en utilisant une partie des données produites dans ce projet, dans la revue *Journal of Experimental Botany*, en 2021 (Thomelin *et al.* 2021).



Photo 1 : expérimentation « wheelie bins », Adélaïde (Australie) 2020.



Photo 2 : expérimentation « Drought Spotter », Urrbrae (Australie) 2022

Références bibliographiques

- Browning BL., Browning SR.** 2016. Genotype imputation with millions of reference samples. *Am J Hum Genet* 98:116-126.
- Fleury D, Jefferies S, Kuchel H, Langridge P.** 2010. Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany* 61: 3211.
- Fleury D, Himanen K, Cnops G, Nelissen H, Boccardi TM, Maere S, Beemster GT, Neyt P, Anami S, Robles P, Micol JL, Inze D, Van Lijsebettens M.** 2007. The Arabidopsis thaliana homolog of yeast BRE1 [an E3 ligase] has a function in cell cycle regulation during early leaf and root growth. *Plant Cell* 19: 417.
- François Postic.** Test et apports d'outils de phénotypage racinaires directs (imagerie des racines) et indirects (méthode électrique capacitive) pour une utilisation en sélection variétale au champ : application au blé. Thèse Arvalis, Université d'Avignon, 2016.
- Gouache D, Le Bris X, Bogard M, Deudon O, Pagé C, Gate P.** 2012. Evaluating agronomic adaptation options to increasing heat stress under climate change during wheat grain filling in France. *European Journal of Agronomy* 39, pp. 62-70
- Lippert C., Listgarten J., Liu Y., Kadie CM., Davidson RI., Heckerman D.** 2011. FaST linear mixed models for genome-wide association studies. *Nat Methods* 8:833-835.
- Parent B, Bonneau J, Maphosa L, Kovalchuk A, Langridge P, Fleury D.** 2017. Quantifying wheat sensitivities to environmental constraints to dissect G x E interactions in the field. *Plant Physiology* pp. 00372.
- Parent B, Shahinnia F, Maphosa L, Berger B, Rabie H, Chalmers K, Kovalchuk A, Langridge P, Fleury D.** 2015. Combining field performance with controlled environment plant imaging to identify the genetic control of growth and transpiration underlying yield response to water deficit stress in wheat. *Journal of Experimental Botany* 66: 5481.
- Rimbert H., Darrier B., Navarro J., Kitt J., Choulet F., Leveugle M., Duarte J., Rivière N., Eversole K., Le Gouis J., on behalf The BreedWheat Consortium, on behalf The BreedWheat Consortium, Davassi A., Balfourier F., Le Paslier M-C., Berard A., Brunel D., Feuillet C., Poncet C., Sourdille P., Paux E.** 2018. High throughput SNP discovery and genotyping in hexaploid wheat.
- Schoppach R, Taylor JD, Majerus E, Claverie E, Baumann U, Suchecki R, Fleury D, Sadok W.** 2016. High resolution mapping of traits related to whole-plant transpiration under increasing evaporative demand in wheat. *Journal of Experimental Botany* 67: 2847.
- Shahinnia F, Le Roy J, Laborde B, Sznajder B, Kalambettu P, Mahjourimajd S, Tilbrook J, Fleury D.** 2016. Genetic association of stomatal traits and yield in wheat grown in low rainfall environments. *BMC Plant Biology* 16: 150.
- Thomelin P, Bonneau J, Brien C, Suchecki R, Baumann U, Kalambettu P, Langridge P, Tricker P, Fleury D.** 2021. The wheat Seven in absentia gene is associated with increases in biomass and yield in hot climates. *Journal of Experimental Botany* 4, 3774-3791.
- Thomas M, Pingault L, Poulet A, Duarte J, Throude M, Faure S, Pichon JP, Paux E, Probst AV, Tatout C** 2014. Evolutionary history of Methyltransferase 1 genes in hexaploid wheat. *BMC Genomics* 15:922.
- Thomelin P,** "Progress toward the positional cloning of qDHY.3BL, a QTL associated with yield variation in hot climate in bread wheat". Thèse de doctorat, Université d'Adélaïde. 2020.
- Touzy G., Rincant, R., Bogard, M., Lafarge, S., Dubreuil, P., Mini, A., ... & Praud, S.** 2019. Using environmental clustering to identify specific drought tolerance QTLs in bread wheat (*T. aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 132, 2859-2880.
- Touzy G,** "Analyse génétique et écophysiological de la tolérance à la sécheresse chez le blé tendre". Thèse CIFRE Arvalis-Biogemma-INRA, Université d'Auvergne, travaux en cours.
- Yu J., Pressoir G., Briggs WH., Vroh Bi. I., Yamasaki M., Doebley JF., McMullen MD., Gaut BS., Nielsen DM., Holland JB., Kresovich S., Buckler ES.** 2006. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat Genet* 38:203-208.

CRACQ (Clone the RAC875 QTL) : Clonage et caractérisation d'un gène de maintien du rendement en conditions de stress thermique et hydrique chez le blé

Mickaël THROUDE^{1*}, Delphine FLEURY², Penny TRICKER², Diane MATHER², Scott BODEN², Hervé DUBORJAL¹, Lauriane CHASSAING¹, Matthieu BOGARD³, Katia BEAUCHENE³

1 - Limagrain Europe - Centre de Recherche de Chappes 63720 Chappes, France
2 - School of Agriculture, Food and Wine, The University of Adelaide- PMBI Glen Osmond SA 5064, Australia

3 - Arvalis-Institut du Végétal - 45 Voie Romaine 41240 Ouzouer-le-marché, France
*Coordinateur : Mickaël THROUDE, mickael.throude@limagrain.com

Le projet CRACQ répond à l'urgence de l'agriculture européenne face à la diminution des rendements céréaliers due notamment aux changements climatiques. Il visait à introduire des allèles de blé australien résistants au stress hydrique et thermique (issus de la lignée de printemps tolérante RAC875) pour stabiliser les rendements européens. Cette étude s'est focalisée sur le QTL qDHY.3BL mis en évidence par l'Université d'Adélaïde (Thomelin et al. 2021) et notamment le gène candidat TraesCS3B02G572900, annoté comme étant une E3 ubiquitin-protein ligase (UBP) codant pour un régulateur négatif appartenant au complexe ubiquitine-protéasome et qui pourrait avoir un effet positif sur la biomasse et le développement des grains lorsqu'il est sous-exprimé chez la lignée RAC875. Les travaux ont été subdivisés en quatre volets complémentaires, visant à valider l'effet de l'allèle positif du gène UBP et de faciliter l'utilisation du QTL qDHY.3BL en sélection, notamment dans les blés d'hiver utilisés en Europe. Le premier s'est focalisé sur l'étude de la variabilité allélique naturelle, au locus du QTL qDHY.3BL, dans des lignées de blé d'hiver et de printemps, par séquençage d'Exome. Le second a permis de développer du matériel végétal en vue de la validation fonctionnelle du gène candidat UBP via l'utilisation de la variabilité induite, présente dans des populations de mutants TILLING. Le troisième volet a consisté à caractériser phénotypiquement la variabilité naturelle du gène UBP et d'en décoder les mécanismes physiologiques dans un vaste réseau d'essai (France, US, Espagne, Australie, Mexique). Enfin, le dernier volet a permis de mettre en évidence le pattern d'expression de la protéine UBP par séquençage d'ARNm de lignées sous stress thermique et hydrique, cultivées en conditions contrôlées.



1- Etude de la variabilité allélique naturelle, dans des lignées de blé d'hiver et de printemps, par séquençage d'Exome

Le gène UBP 3B et ses copies homologues sur les chromosomes 3A et 3D ont été séquencés par séquence capture sur un panel de 30 lignées de blé d'hiver, et par séquençage d'Exome sur un panel de 250 lignées de blé Limagrain.

Dans le gène candidat UBP 3B, nous avons identifié 42 variants, dont 30 dans le gène et 12 dans la région promotrice de 2 kb en 5' du gène. Une annotation fonctionnelle des 30 variants de la région génique a permis d'identifier : 6 variants 3' UTR, 3 variants 5' UTR, un variant intronique, 18 variants synonymes et 2 variants non synonymes (p.Ala297Pro en position 803628975 et p.Val296Ala en position 803628977) situés tous deux dans l'exon 2 du gène.



Figure 1 : représentation graphique des 30 variants identifiés dans le gène UBP (TraesCS3B01G572900). SNP synonymes en bleu, SNP non synonymes (missense) en jaune

L'analyse des variants de la zone, n'a mis en évidence aucun polymorphisme entre le parent tolérant à la sécheresse RAC875 versus les parents sensibles Absalon et Altigo. Le polymorphisme SNP ADW595 a cependant été retrouvé entre RAC875 et Kukri, identifié par l'UA. Le SNP ADW595 positionné dans la région promotrice du gène (A to T variant at position chr3B :803634611 bp) a été proposé comme pouvant être le polymorphisme causal du gène candidat UBP par l'université d'Adélaïde (UA). Une analyse GWAS n'a mis en évidence aucun effet de cette zone et variants identifiés dans un panel de blés européens phénotypés en conditions de stress hydrique et thermique (données BreedWheat / 26 essais / 3 années).

En parallèle, l'UA a réalisé une analyse par génotypage du SNP ADW595 sur un panel de 627 lignées de blés de printemps, représentant la variabilité mondiale. Ce travail a permis de mettre également en évidence une fréquence élevée de l'allèle RAC875 en Australie et en Europe

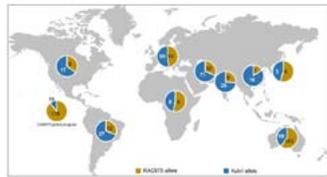


Figure 2 : Distribution de l'allèle UBP RAC875 sur un panel de blés de printemps représentant la variabilité mondiale. Allèle RAC875 en jaune et allèle Kukri en bleu.

3- Caractérisation phénotypique du gène UBP et des mécanismes physiologiques dans un vaste réseau d'essai (blés d'hiver et de printemps)

Un réseau expérimental de 30 essais mis en place entre 2019 et 2022 en France, Espagne, Etats-Unis et Australie sur 13 lieux ; en champ et sur la plateforme conditions contrôlées DroughtSpotter. Sur chaque lieu, nous avons mesuré les composantes classiques de rendement, réalisé un bilan hydrique et une mesure des variables météo afin de caractériser le type de stress rencontré.

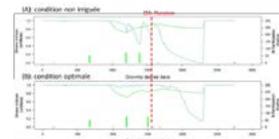


Figure 3 : Exemple de calcul d'indice de stress hydrique sur le site de Gréoux-les-Bains en 2021. (A) en condition stressée non irriguée et (B) en condition optimale irriguée. Indice de stress (sans unité) en bleu, indice de nutrition azotée (kg/ha) et apports en vert. Le stade floraison est matérialisé par la ligne rouge. L'axe des abscisses est exprimé en degrés jours.

Les résultats au champ, obtenus sur les lignées isogéniques fond hiver, RAC875 x ALTIGO et ABSALON semblent vouloir démontrer que l'effet du QTL qDHY.3BL n'est pas significatif dans le fond génétique des blés d'hiver européens et les environnements testés dans cette étude.

Les 3 couples de lignées isogéniques de type HIF et les deux lignées parentales ARC875 et KUKRI, développés par l'UA ont été évalués sur 17 lieux en Australie et en Espagne entre 2019 et 2022 dans des environnements soumis à un stress hydriques et thermique.

Ce projet est un bel exemple de collaboration internationale qui a permis d'approfondir notre compréhension du locus QTL qDHY.3BL étudié initialement dans les blés de printemps australiens et d'évaluer son potentiel pour l'amélioration de la tolérance au stress hydrique et thermique des blés d'hiver européens, répondant à un défi majeur pour l'agriculture future. Les analyses ont révélé une fréquence élevée des allèles favorables dans le matériel génétique européen, bien que leur effet soit modéré voire négatif dans ces blés, contrairement aux blés de printemps où un effet positif a pu être confirmé. La validation fonctionnelle du gène candidat, par l'utilisation de plantes mutées, n'a pas été possible dans ce projet, mais des perspectives de recherche supplémentaires pourront être envisagées pour éclaircir les mécanismes physiologiques impliqués dans la tolérance au stress, à partir du matériel généré. D'un point de vue méthodologique, ce projet a fourni des approches et des dispositifs expérimentaux utiles pour étudier d'autres QTL d'intérêt agronomique, tout en facilitant le développement de lignées isogéniques et de marqueurs moléculaires pour les futurs programmes de sélection variétale. Enfin, une publication basée sur les résultats de ce projet a été réalisée dans le Journal of Experimental Botany en 2021 (Thomelin et al. 2021).



2- Développement de matériel végétal en vue de la validation fonctionnelle du gène candidat UBP (TraesCS3B02G572900) et ses copies homologues

Quatre populations de TILLING ont été exploitées pour identifier des mutations sur les copies 3A/3B/3D du gène UBP dans des fonds génétiques printemps (GLADIUS et CADENZA) et hiver (APACHE et KALAHARI).

Aucune mutation STOP n'a pu être détectée dans la population CADENZA, nous avons seulement identifié des mutations non-synonymes de moindre intérêt pour la validation fonctionnelle de ce gène. Dans les populations APACHE et KALAHARI, malgré des efforts conséquents de screening par séquençage et de validation des mutations par la méthode KASPAR, nous n'avons identifié que trois mutations STOP sur la copie homologue UBP_3A (TraesCS3A01G505400) et une mutation du site d'épissage de l'intron du gène candidat UBP_3B, décrites dans le tableau ci-dessous.

Population	Mutant ID	Gène	chrom.	Impact	mutation type
Apache	APB_3843	TraesCS3A01G505400	3A	HIGH	stop_gained
KALAHARI	Kal_06_302	TraesCS3A01G505400	3A	HIGH	stop_gained
KALAHARI	Kal_06_177	TraesCS3A01G505400	3A	HIGH	stop_gained
KALAHARI	Kal_06_196	TraesCS3B01G572900	3B	HIGH	splice_intron_variant

Tableau 1 : liste des mutants TILLING type hiver identifiés

Pour toutes ces mutations, nous avons sélectionné et multiplié des plantes homozygotes mutantes et sauvages (de type lignées isogéniques).

Dans la population GLADIUS, l'UA a fixé et multiplié des plantes portant les deux mutations STOP identifiées en amont de ce projet dans le gène UBP_3B (TraesCS3B01G572900). Il n'a pas été possible d'obtenir des doubles et triples mutants fertiles en croisant ces mutants avec d'autres mutants STOP sur les copies 3A et 3D (TraesCS3A01G505400 et TraesCS3D01G512700).



Sur les 10 essais réalisés en Espagne, nous avons observé des variations de l'effet de l'allèle RAC875 sur le rendement (tableau 2). En condition stressée, nous avons mesuré des variations de rendement positives et négatives pouvant aller par exemple de +3.8 à -3.1 q. ha pour le couple NIL 2164, mais il a été observé des pertes de rendement en condition optimale.

Condition	Stress (DRY)					Optimal (IRR)				
	2020	2021	2021	2022	2022	2020	2021	2021	2022	2022
Année	2020	2021	2021	2022	2022	2020	2021	2021	2022	2022
Lieu	CA8	CA6	IR8	CA8	IR8	CA8	CA8	CA8	CA8	CA8
Couple NIL	Effet rendement moyen en q. ha allèle RAC875 - allèle KUKRI									
Parents	5.6	2.9	7.0	3.1	6.4	6.7	11.7	0.9	0.3	16.6
2164	15.1	-0.8	2.8	1.5	2.4	3.1	0.4	0.7	-0.4	3.3
87	0.4	0.3	4.9	1.5	1.5	-0.6	1.5	3.8	1.9	1.0
1314	0.3	0.5	-1.3	-3.1	1.5	-0.6	2.2	4.5	1.1	0.6

Tableau 2 : Rendement moyen (q/ha) des lignées RAC875 x KUKRI sur les 10 essais espagnols en condition stressée (DRY) et non stressée (IRR). Différence de rendement entre l'allèle A (RAC875) et l'allèle B (KUKRI), positifs en vert, négatif en rouge et non significatifs en bleu.

Nous avons donc pu mettre en évidence un effet du QTL, mais il semble variable entre les couples et les environnements testés, ce qui semble vouloir démontrer un manque de stabilité du QTL dans les environnements stressés.

4- Analyse d'expression de la protéine UBP par séquençage d'ARNm en conditions de stress thermique et hydrique

L'analyse de l'expression du gène UBP_3B, a démontré une variation d'expression assez faible entre les allèles RAC875 et KUKRI : Log2Fold Change de 0,63 et pval de 0.03. Nous avons observé une légère sous expression du gène UBP portant l'allèle RAC875 (en bleu), avec un différentiel non significatif entre les conditions de stress (D et WW) appliquées lors de cette expérience (cf. figure 4).

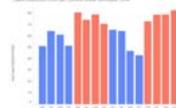


Figure 4 : Expression du gène UBP dans les différentes conditions de stress testées pour les couples 1314 A-B et 2164 A-B. RAC875(A), en rouge et KUKRI(B), en bleu.

TritiRB : Caractérisation de sources de résistance durables à la rouille brune chez le Triticale

Henriette GOYEAU¹, Anne-Lise BOIXEL¹, Ghislain DELESTRE¹, Corentin PICARD¹, Annaig BOUGUENNEC³, Christophe JEUDI^{2*}, Éric DELALEAU⁴, Frédéric FANTIN⁵, Anthony ROULLIER⁶, Philippe Du CHEYRON⁷, Valérie LAURENT², Ellen GOUDEMAND DUGUE²

1 - Université Paris-Saclay, INRAE, UR BIOGER, 91123 Palaiseau, FRANCE

2 - SAS Florimond Desprez Veuve et Fils, BP 41, 59242 Cappel en Pévèle

3 - UCA, INRAE, GDEC, 63000, Clermont-Ferrand, FRANCE

4 - Lemaire-Deffontaines, 180 rue du Rossignol, 59310 Auchy les Orchies

5 - Agri-obtentions URD78, Ferme de Gauvilliers, 78660 Orsonville

6 - RAGT 2n, rue Emile Singla, site de Bourran, 12000 Rodez

7 - Arvalis-Institut du Végétal, 3 rue Joseph et Marie Hackin, 75016 Paris

*Coordinateur : GIE Triticale

1 Introduction

La France est le 3^e producteur Européen de triticale, après la Pologne et l'Allemagne, avec une production annuelle autour de 2 millions de tonnes (FAOSTAT, 2024). Après une augmentation quasi-constante depuis 30 ans, les surfaces de triticale en France ont atteint 416 000 ha en 2012, et étaient de 326 000 ha en 2023 (*source Agreste 2016 et 2023*), répartis sur 5 bassins : Bretagne, Centre-Est, Pays de Loire, Centre-Ouest et Occitanie. Chez cette espèce destinée essentiellement au marché fourrager, le progrès génétique a permis une amélioration de la qualité du grain (moins d'échaudage notamment) et du rendement en grains et en pailles. L'offre variétale s'est élargie, avec actuellement une trentaine de variétés disponibles en France. Issu du croisement entre un blé (*Triticum spp.*) et un seigle (*Secale cereale*), le triticale (*x Triticosecale*) est une céréale récente : les premiers programmes de sélection ont débuté dans les années 1960. L'origine récente de l'espèce a pour conséquence une base génétique encore relativement étroite.

En conditions climatiques et édaphiques peu favorables, le rendement du triticale est supérieur à celui du blé. En conséquence, le triticale est une culture indispensable dans des zones où les stress tels que les sols hydromorphes, la sécheresse et l'acidité du sol ne permettent pas la culture du blé (Audenaert *et al.* 2014). Par ailleurs, le triticale est particulièrement adapté à la culture à bas niveaux d'intrants, par ses besoins en nutriments plus modestes que le blé, et par un bon niveau de résistance aux bioagresseurs. La rouille brune, causée par *Puccinia triticina*, est une préoccupation importante, puisque sur variétés sensibles, en 2016 en Bretagne, elle a provoqué des pertes de rendement de 30 à 60 quintaux (Culture du triticale - ARVALIS 2023). Dès le début des années 80, les triticales ont été utilisés en croisement pour introgresser leur très bonne résistance à la rouille brune dans des variétés de blé tendre américaines (Wilson and Shaner, 1984, 1987), ou du CIMMYT (Wilson, 1989). Cependant, dès les années 1990, la question de la sensibilité du triticale aux rouilles s'est posée en Allemagne (Schinkel 2002, cité par Audenaert *et al.*, 2014), puis en Pologne (Sodkiewicz and Strzembicka, 2004), ainsi qu'en Russie

et en Belgique (Audenaert *et al.*, 2014). En effet, avec la forte progression des surfaces cultivées en triticale, le spectre et l'incidence des maladies sur cette culture a évolué (Oettler, 2005), avec une adaptation des agents pathogènes fongiques à ce nouvel hôte. Malgré des tentatives de diversification de sources de résistance aux maladies du triticale conduites à partir d'*Aegilops tauschii* (Kwiatek *et al.*, 2015), la base génétique des programmes de sélection actuels demeure très étroite (Audenaert *et al.*, 2014).

Les études du déterminisme génétique de la résistance aux principales maladies préoccupantes du triticale (oïdium, rouilles et fusariose ; Audenaert *et al.*, 2014) sont encore très peu développées. Des variétés avec un bon niveau de résistance adulte au champ à l'oïdium ont été répertoriées (Flath, 2011; Troch *et al.*, 2013), mais la base génétique de la résistance à l'oïdium chez une gamme de variétés de triticale européennes demeure étroite (Troch *et al.*, 2013). Une analyse de génétique d'association pour la résistance à la rouille jaune, motivée par l'émergence d'une nouvelle race agressive en Europe, a été conduite sur 919 lignées et variétés de triticale (Losert *et al.*, 2017). Elle a permis de mettre en évidence une résistance de type quantitatif, basée sur quelques QTL à effet moyen. Pour la rouille brune, seules deux études ont identifié une résistance basée sur des gènes spécifiques (Audenaert *et al.*, 2014), dont un (LrTM16) introduit à partir de *T. monococcum*. Le déterminisme génétique de la résistance du triticale à la rouille brune reste donc largement méconnu. La résistance des variétés de triticale actuellement inscrites en France est de très bon niveau, la majorité des variétés ayant une note Arvalis-Geves d'au moins 7. Toutefois, si la base génétique de cette résistance à la rouille brune ne repose que sur quelques gènes de résistance spécifique, l'évolution des populations de *P. triticina* pourrait rapidement détériorer le niveau de résistance de ces variétés. Il est donc nécessaire de veiller à diversifier la base génétique du matériel utilisé en France.

La qualité et la précision des résultats des études de déterminisme génétique reposent fortement sur la pertinence du phénotypage. En matière de résistance aux maladies, le phénotypage doit être conduit avec des isolats du pathogène représentatifs de la population ciblée et de sa diversité. Pour des agents pathogènes

biotrophes et hautement spécialisés comme les rouilles et l'oïdium, et pour une espèce hôte résultant d'un croisement récent entre blé et seigle, la question se pose de l'origine des isolats virulents sur triticale : populations déjà existantes sur blé et/ou seigle, ou bien émergence d'une nouvelle population spécifique au triticale ?

L'étude de la structure génétique des populations de *Blumeria graminis* a mis en évidence que les isolats d'oïdium virulents sur triticale résultaient d'évènements de différenciation récents et multiples, dans le temps et dans l'espace en Europe, à partir de la population virulente sur blé (Troch *et al.*, 2012). Les isolats de *B. graminis* issus de triticale sont plus agressifs sur triticale que sur blé, et réciproquement. Pour la rouille jaune, la race à l'origine d'épidémies en Scandinavie en 2009-2010 était bien spécifique au triticale (Ali *et al.*, 2017). Par contre, il semble que la race « Warrior » d'origine exotique détectée à partir de 2011, suite au contournement de la résistance de la variété de blé du même nom, soit capable d'attaquer également le triticale (Hovmoller *et al.*, 2016). Pour la rouille brune, l'espèce présente sur triticale, *P. triticina*, est la même que sur le blé. Toutefois, la littérature sur la structure des populations de rouille brune sur triticale est rare et souvent peu précise, et ne permet pas de déterminer si les épidémies survenues sur triticale sont dues à des pathotypes spécialisés.

Les tests de résistance à la rouille brune de lignées et variétés de triticale réalisés en République Tchèque (Hanzalova and Bartos, 2011), en Inde (Bhardwaj *et al.*, 2010), et en Australie (Zhang *et al.*, 2010) ne précisent pas si les pathotypes de rouille brune utilisés provenaient d'isolats collectés sur triticale. En Afrique du Sud, la race 3SA144, porteuse de la virulence sur le gène *Lr32* issu de *A. tauschii*, a été détectée pour la première fois en 2005 sur triticale (Pretorius and Bender, 2010), et retrouvée ensuite en 2009 presque exclusivement sur triticale (Terefe *et al.*, 2014). Cette nouvelle race est apparue par mutation à partir de pathotypes blé (Visser *et al.*, 2012). Aucune information n'est donnée sur les pathotypes à l'origine des épidémies de rouille brune sur triticale survenues en Pologne dans les années 1990, mentionnées par Sodkiewicz and Strzembicka (2004). Ces mêmes auteurs ont utilisé 4 isolats de rouille brune collectés sur blé pour l'introgession dans le triticale d'un gène issu de *T. monocoocum*.

En France, le suivi des populations de rouille brune de 1999 à 2016 a permis de collecter une quarantaine d'échantillons sur triticale, et d'identifier un unique phénotype de virulence et génotype SSR spécifique du triticale : ce phénotype/génotype n'a jamais été trouvé sur blé, et réciproquement aucun des phénotypes collectés sur blé n'a jamais été trouvé sur triticale. Il possède très peu de virulences (virulent uniquement sur *Lr2c*, *Lr10* et *Lr17b*) ce qui suggère qu'une sous-population spécifiquement adaptée au triticale s'est développée. Cependant, il ne peut être exclu que la population se développant sur triticale soit plus complexe : d'une part, l'échantillonnage extrêmement restreint doit être étendu pour compléter la prospection. D'autre part, les outils d'identification utilisés ne sont peut-être pas adaptés : la gamme d'hôtes différentiels utilisée étant la même que celle développée pour le blé tendre. Il est possible que des sources de résistance utilisées dans la sélection du triticale ne soient pas représentées dans cette gamme différentielle.

La base génétique de la résistance du Triticale à la rouille brune et la population pathogène de *P. triticina* à l'origine de cette maladie restant peu caractérisées, nous avons cherché, au sein du projet « TritiRB », à caractériser la base génétique de sources de résistance dans le matériel génétique utilisé en France, en combinant des approches de génotypage et de phénotypage sur l'hôte et sur l'agent pathogène.

2 Matériel et méthode

► A. Caractérisation de la population pathogène

Afin de pouvoir disposer d'une vision représentative de la population actuelle de *Puccinia triticina* se développant sur la culture du triticale en France, un échantillonnage d'isolats a été réalisé sur le réseau d'essais du GIE Triticale et sur des cultivars connus dans les régions historiques de la culture de cette espèce.

Multiplification et mise en collection du matériel biologique

Pour identifier une variété hôte qui n'exercerait aucun filtre sur la population présente dans les échantillons récoltés, ces derniers ont été multipliés sur la variété Bellac et sur 9 autres témoins candidats sensibles (dont Michigan Amber, Harrier, Marko et Vuka) afin de maximiser le nombre d'échantillons récupérés et de quantifier l'effet filtre entre variétés/espèces servant à la multiplication.

Les lots de spores constitués à partir des feuilles sporulantes collectées sur le terrain ont été purifiés (isolement monopustule) et conservés à -80°C. 101 des 134 isolats obtenus ont pu être exploités et multipliés de façon à produire une quantité de spores suffisante pour procéder à leur caractérisation par phénotypage (mise au point d'une gamme d'hôtes différentiels pour établir les profils de virulence et ainsi disposer d'un outil de phénotypage représentant au mieux les gènes de résistance présents dans les variétés de triticale) et par génotypage (diversité génétique évaluée à l'aide de marqueurs microsatellites).

Phénotypage sur une gamme d'hôtes potentiellement différentiels

Un panel diversifié de 109 lignées, représentant au mieux les gènes de résistance présents dans les variétés auxquelles la population de rouille brune est confrontée, a été utilisé pour réaliser un tri d'hôtes potentiellement différentiels (au sens sources de résistance diversifiées). Ce panel est constitué de 26 lignées de la gamme d'hôtes différentiels représentant les sources de résistances utilisées en blé tendre (gamme sur laquelle un unique pathotype majoritaire triticale, virulent sur *Lr2c*, *Lr10*, *Lr17b*, avait été distingué jusqu'alors au niveau national), 10 isolignées de la variété Thatcher porteuses de gènes *Lr* supplémentaires identifiés comme pertinents (Pretorius and Bender, 2010 ; Czajowski *et al.*, 2021b), 34 variétés représentatives des ressources génétiques utilisées en France, en Allemagne et en Pologne et 39 lignées du programme ADT « Augmentation de la Diversité génétique du Triticale » d'INRAE et du GIE TRITICALE.

Phénotypage des isolats

En serre, ces 109 variétés et lignées ont été inoculées avec les 101 échantillons de *P. triticina* prélevés sur triticales dans le cadre du projet. Les plantules élevées en serre et âgées de 7 jours ont été inoculées sur la première feuille par pulvérisation d'une suspension de spores dans de l'huile minérale Novec. A l'issue d'une période d'incubation de 9 jours en serre à 18°/22°C, les types d'infection ont été relevés selon l'échelle de Stakman *et al.* (1962).

Génotypage

Jusqu'à présent, toutes les souches de *P. triticina* étaient caractérisées à l'aide de 19 marqueurs SSR. Une étude récente a mis en évidence des nouveaux marqueurs qui permettent de mieux caractériser les populations de cet agent pathogène sur triticales (Czajowski *et al.*, 2021a). Après une première sélection réalisée en dehors du projet, 35 marqueurs ont été conservés pour la caractérisation des isolats prélevés sur triticales. Les analyses génétiques ont été conduites avec le langage de programmation R et le package "Poppr" (Kamvar *et al.*, 2014).

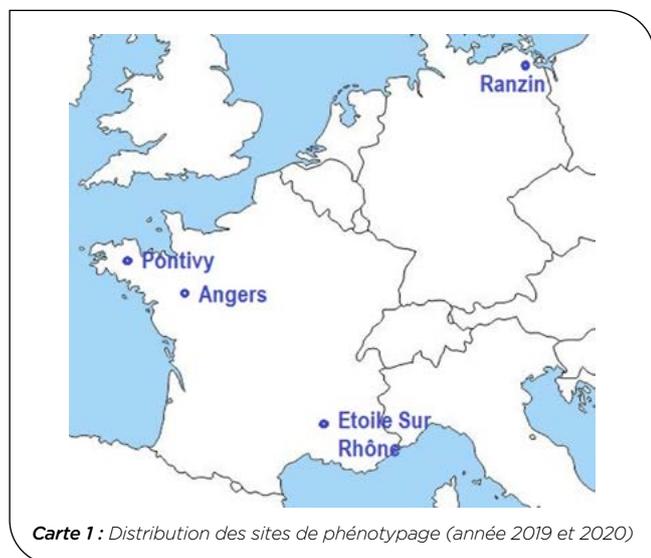
► B. Panel végétal et phénotypage

Un panel variétal (Tableau 1) composé de 19 variétés de niveaux de résistance/sensibilité à la rouille brune connus (CTPS, Arvalis ou source Obtenteur), ainsi que de 15 triticales primaires octoploïdes repérés pour leur résistance à la rouille brune (Tableau 2) ont été utilisés pour identifier de nouvelles sources de résistance.

Deux populations de 200 et 253 lignées recombinantes obtenues par SSD (Single Seed Descent) respectivement des croisements Vuka x Trefl et Kaulos x Vuka ont également été étudiées afin de cartographier les gènes de résistance impliqués. Vuka présente une sensibilité avérée à la rouille brune alors que Kaulos et Trefl présentent un bon niveau de résistance (Tableau 1).

Caractérisation au champ de la résistance à la rouille brune et de l'impact de la maladie

Le phénotypage réalisé en années 2019 et 2020 a été effectué sur quatre sites, 3 sites situés en France et un en Allemagne (Carte 1).



Carte 1 : Distribution des sites de phénotypage (année 2019 et 2020)

Pour favoriser l'établissement de la rouille brune dans les essais et permettre un phénotypage plus précis, des lignes de contaminateur de la variété sensible à la rouille brune Vuka ont été implantées dans les plateformes de phénotypage.

Les dispositifs implantés sur les sites d'Angers et Pontivy ont reçu une contamination artificielle d'une souche commune de rouille brune (Pathotype 012002 – isolat BT06 M103-3) en 2019. A la suite d'une mauvaise implantation en 2020 sur le site de Pontivy, seul le site d'Angers a reçu une contamination artificielle, les autres sites étaient en contamination naturelle.

Deno	Note Rouille brune (sources CTPS/ARVALIS)
Bellac	2
Vuka	4
Bikini	6
Grenado	6
Jokari	6
Rgt Omeac	6
Kws Fido	6
Kaulos	7
Kws Aveo	7
Rgt Eleac	7
Agostino	8
Adverdo	8
Anagram	8
Brehat	8
Elicsir	8
Kasyno	8
Ramdram	8
Rgt Ruminac	8
Trefl	9

Tableau 1 : Niveau de résistance à la rouille brune du panel variétal (1 = Sensible, 9 = Résistant)

Trit RB19	Nom	Généalogie
1	14BS20-3-39	028B1-2-1(Altria-cf)/Dukato
2	15BS13-2-2	Azzerti/Brasetto
3	15BS13-3-1	Azzerti/Brasetto
4	15BS13-3-2	Azzerti/Brasetto
5	16B59-1-3	Gotik/SU_ Stakkato
6	14BS29-4-1	Lyrik/Elego
7	16B525-1-5	13BB11-2-1-1(Barok-ocf)/Brasetto
8	15BS37-1-6	13BB1-2-2-4(Barok-ocf)/Dankowskie Nowe
9	15BS47-1-12	13BB8-2-1-1(Barok-ocf)/Dankowskie Nowe
10	15BS53-1-1	13BB11-2-1-3(Barok-ocf)/Dankowskie Nowe
11	15BS76-1-3	13BB4-2-1-7(Barok-ocf)/Elego
12	15BS77-1-6	13BB4-2-1-8(Barok-ocf)/Elego
13	15BS79-1-6	13BB6-2-1-5(Barok-ocf)/Elego
14	15BS81-1-12	13BB8-2-1-1(Barok-ocf)/Elego
15	16BS18-1-17	13BB8-2-1-1(Barok-ocf)/SU_Allawi

Tableau 2 : Triticales primaires retenus pour leur bonne résistance à la rouille brune et leur généalogie

Le niveau de résistance des lignées de chaque population a été évalué par l'observation des symptômes caractéristiques de rouille brune sur les derniers étages foliaires, selon une échelle de notation de 1 (résistant) à 9 (sensible) correspondant à la surface sporulante.

Par manque de semences, les triticales primaires n° 1, 5 et 10 n'ont pas pu être observés à Ranzin.

Génotypage

Les 2 populations Vuka x Trefl et Kaulos x Vuka ont été génotypées avec 960 marqueurs SNP par la plateforme Gentyane INRAE à Clermont Ferrand et les cartes génétiques réalisées dans le cadre du FSOV rouille Jaune ont été utilisées pour la recherche de QTL à l'aide du package Rqtl.

La recherche de QTL de résistance à la rouille brune a été réalisée à partir de 3 lieux (Angers, Etoile-sur-Rhône et Ranzin) et 2 années de phénotypage de la rouille brune pour les 2 populations Vuka x Trefl et Kaulos x Vuka. La contamination en année 1 à Ranzin et Etoile sur Rhône ayant été trop faible ces données ont été écartées.

3 Résultats

► A. Caractérisation de la population pathogène

Bilan de la campagne d'échantillonnage

Soixante-dix isolats ont été collectés entre 2018 et 2021 en diversifiant les cultivars, les années et les régions de collecte. Une trentaine d'isolats provenant de collectes précédentes (conduites entre 2001 et 2017) complète ce jeu de données (Figure 1a). Un peu plus du tiers des échantillons proviennent de lignées en cours de sélection, douze ont été collectés sur la variété Triskell, sept sur la variété Bellac et le reste est réparti sur 29 variétés cultivées avec des effectifs inférieurs à 5 (Figure 1b).

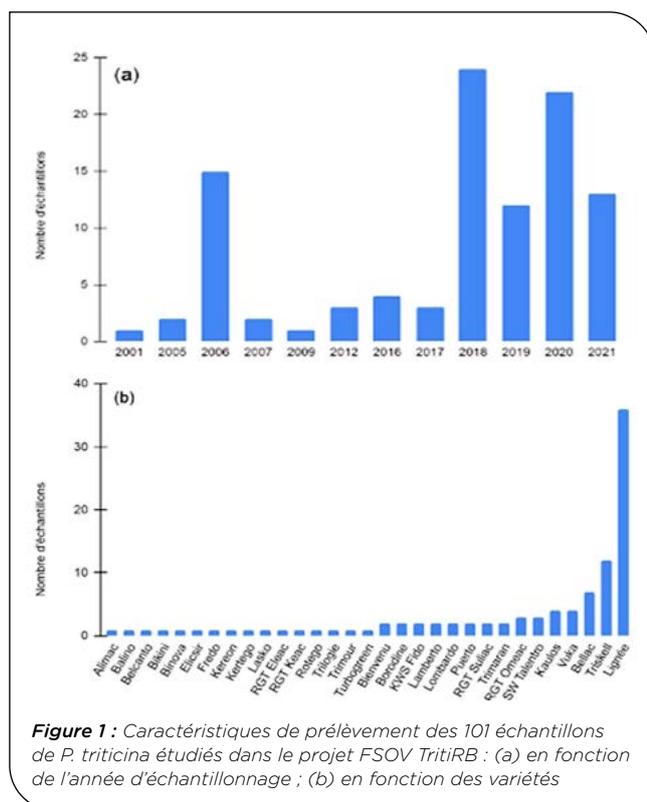


Figure 1 : Caractéristiques de prélèvement des 101 échantillons de *P. triticina* étudiés dans le projet FSOV TritiRB : (a) en fonction de l'année d'échantillonnage ; (b) en fonction des variétés

Multiplication et mise en collection du matériel biologique

Sur l'ensemble des lignées testées pour la multiplication et la mise en collection des souches Triticale, ce sont les variétés Marko et Harrier, sensibles à plus de 95% des souches Triticale multipliées à ce jour à INRAE BIOGER,

qui semblent les plus intéressantes pour récupérer le maximum d'échantillons représentatifs de la population d'isolats virulents sur Triticale (Tableau 3).

	Lignées en cours de sélection	Variétés cultivées (France)	Variétés cultivées (Europe)	Effectif total
Collection INRAE BIOGER antérieure	0	70	0	70
2019	7	5	5	17
2020	10	22	2	34
2021	7	6	0	13
Total en collection	24	103	7	134

Tableau 3 : Isolats considérés pour la caractérisation de la population de *P. triticina* sur la culture du triticale

► B. Phénotypage des populations pathogènes

Mise au point de la gamme d'hôtes différentiels spécifique Triticale

L'ensemble des échantillons de *P. triticina* du projet a été caractérisé sur 94 hôtes différentiels des 109 initiaux (instabilité de certaines lignées). En conservant uniquement la gamme différentielle utilisée en blé tendre, la moitié des isolats appartiennent à l'un des trois pathotypes qui étaient déjà connus sur triticale (0120020, 0120060, 0120420) tandis que 11% des isolats ont des pathotypes connus de type blé tendre. Ces échantillons proviennent principalement de lignées en sélection ou de variétés assez sensibles comme SW Talento. Le reste des isolats possède des pathotypes nouveaux avec des effectifs faibles (3 ou 4 isolats) à très faibles (1 ou 2 isolats). Cette dernière catégorie contient 19 isolats qui ont principalement été isolés à partir de lignées en sélection ou de variétés plutôt résistantes (notes Arvalis ≥ 7) telles que Elisir ou Kereon.

Sur l'ensemble des 94 différentiels, trois isolats présentent exactement le même profil de virulence (Tr18M117, Tr06M102 et Tr06M103), ainsi que deux autres qui possèdent un autre profil (Tr01M005 et Tr05M308). Le reste des échantillons détient une combinaison de virulence unique sur ces différentiels. Peu de caractérisations des virulences des populations de *P. triticina* provenant du triticale sont publiées ; toutefois une étude récente (Czajowski *et al.*, 2021b) s'intéresse aux virulences de 242 souches polonaises sur 33 lignées isogéniques *Thatcher*. La comparaison des résultats obtenus ici avec ceux issus de cette publication pour les 29 lignées isogéniques *Thatcher* communes (Figure 2) a mis en évidence des similitudes de comportement pour plusieurs lignées comme celles portant *Lr9* et *Lr19* qui ne sont jamais contournées, celles portant *Lr1*, *Lr2a* et *Lr26* qui sont faiblement contournées, ou celles portant *Lr10*, *Lr14b* et *LrB* qui sont fortement contournées en France comme en Pologne. Pour certaines lignées, les fréquences de virulence sont très différentes entre la France et la Pologne, comme pour *Lr3ka*, *Lr21*, *Lr29* et *Lr44*. Le coefficient de corrélation entre ces deux études est de 0,74 ce qui démontre que les populations françaises et polonaises de rouille brune présentes sur triticale sont relativement semblables.

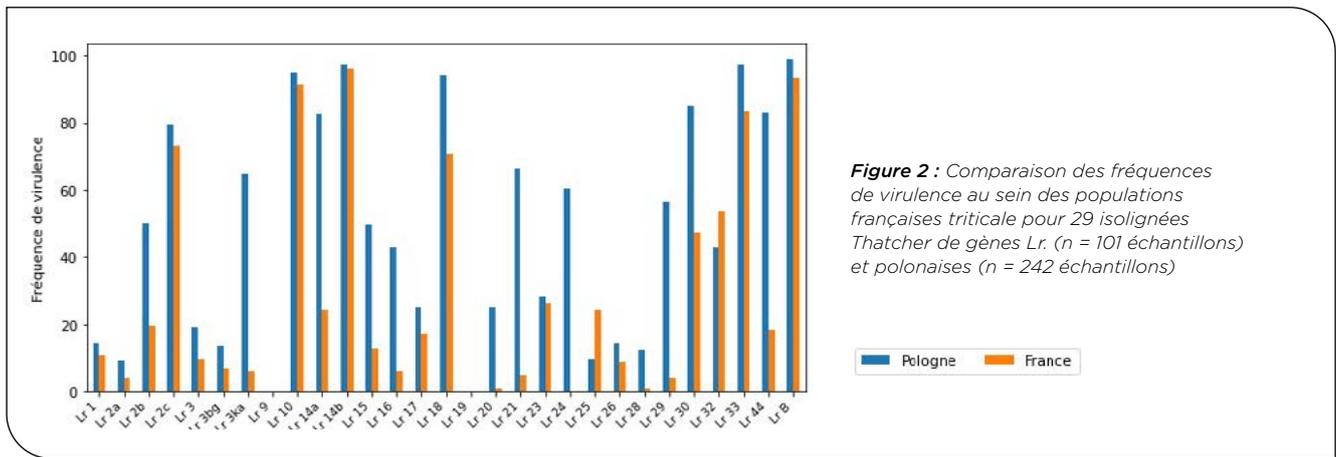


Figure 2 : Comparaison des fréquences de virulence au sein des populations françaises triticales pour 29 isolignées Thatcher de gènes Lr. (n = 101 échantillons) et polonaises (n = 242 échantillons)

Proposition d'une gamme d'hôtes différentiels spécifique triticale

L'échelle de Stakman a été adaptée aux populations françaises de *P. tritricina* afin de pouvoir caractériser les interactions entre cet agent pathogène et son hôte (Stakman *et al.*, 1962). Ce système de notations implique une multitude de types d'infection qui sont notés différemment tels que “;” qui correspond à des chloroses d'hypersensibilité ou “3+”, une interaction de type sensible (grandes urédies sans chlorose). Afin de faciliter les analyses, ces types d'infections ont été regroupés en cinq catégories qui se différencient par le niveau de sporulation observé (Figure 3).

Au regard de ces 5 catégories d'infection, on observe une grande diversité au sein de l'ensemble des différentiels (Figure 4). Certains différentiels très résistants (comme *Lr9*, *Lr19*, *Lr20* et *Lr24*) ou très sensibles (comme *Lr10*, *Lr14b*, Morocco ou Harrier) ne font pas de bons candidats pour l'établissement d'une gamme différentielle. Certains différentiels sont représentés par les cinq catégories d'infections en proportions relativement similaires, tels que *Lr23*, *Lr25*, Agostino et RGT Belemac. Pour assurer un minimum de discrimination, l'un des premiers critères de sélection pour le choix des différentiels de la gamme a donc été un pourcentage de souches sensibles compris entre 10 et 90 % ; 49 candidats ont été sélectionnés sur ce critère.

Type d'infection	Pourcentage total	Type d'infection	Pourcentage total
0;	3,7	;12-	1,1
;-	2,9	;12	8,3
;-	32	;12C	2,3
;	16,0	;12+	0,1
;N	1,3	12C	0,0
;1-	0,2	2	0,0
;1	3,8	2C	0,1
1C	0,1	X--	0,7
;1N	0,1	Y--	0,0
Groupe Résistant ("R")		X-	1,4
Pas ou très peu de sporulation		X-C	0,1
Groupe Intermédiaire faible ("I-")			
Réponse de type faible			
Type d'infection	Pourcentage total	Type d'infection	Pourcentage total
X	16,2	X+	2,8
Y	0,1	X+C	0,4
Z	0,0	X++	2,1
XC	2,7	X++C	0,2
Groupe Intermédiaire ("I")		X++3	2,5
Réponse moyenne		X++3C	0,2
Type d'infection	Pourcentage total	23	0,6
X++3+	3,1	23C	0,4
33+	4,2	3	0,8
3+	18,0	3C	0,3
Groupe Sensible ("S")		Groupe Intermédiaire fort ("I+")	
Interactions totalement sensibles		Réponse de type forte	

Figure 3 : Catégorisation des types d'infection pour classer les souches en cinq groupes. Les proportions des types d'infection correspondent aux caractérisations obtenues pour les 101 souches sur les 94 différentiels

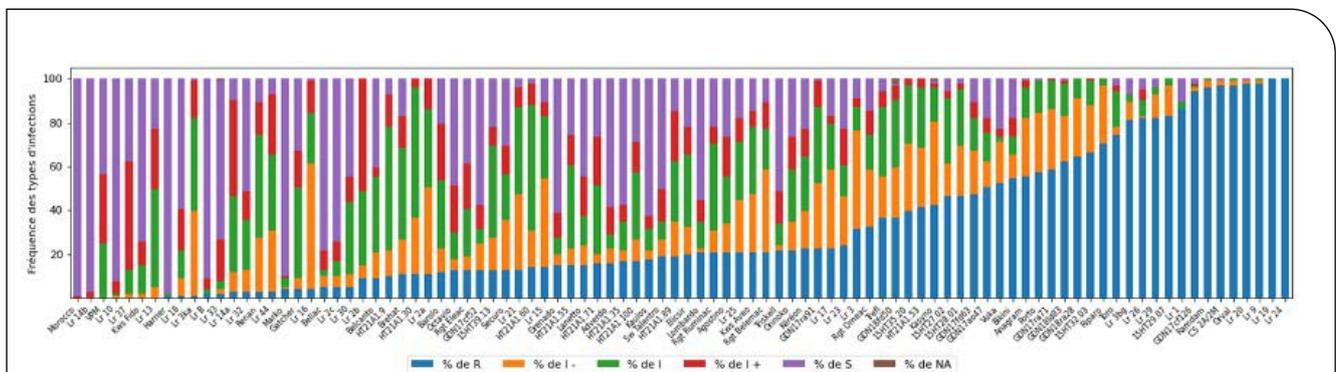


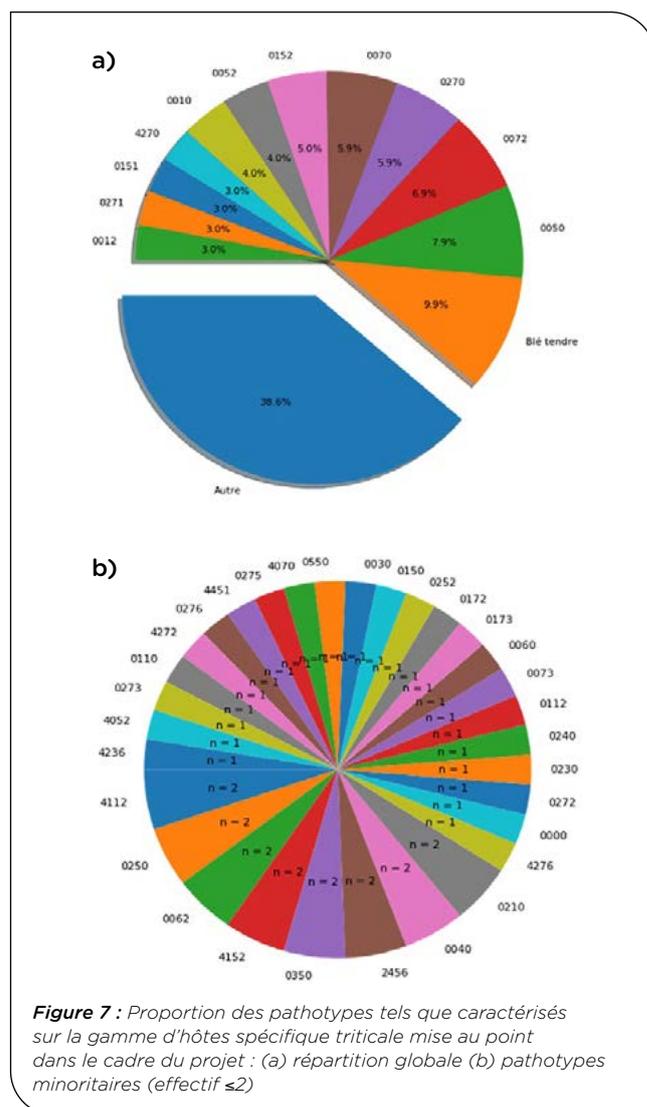
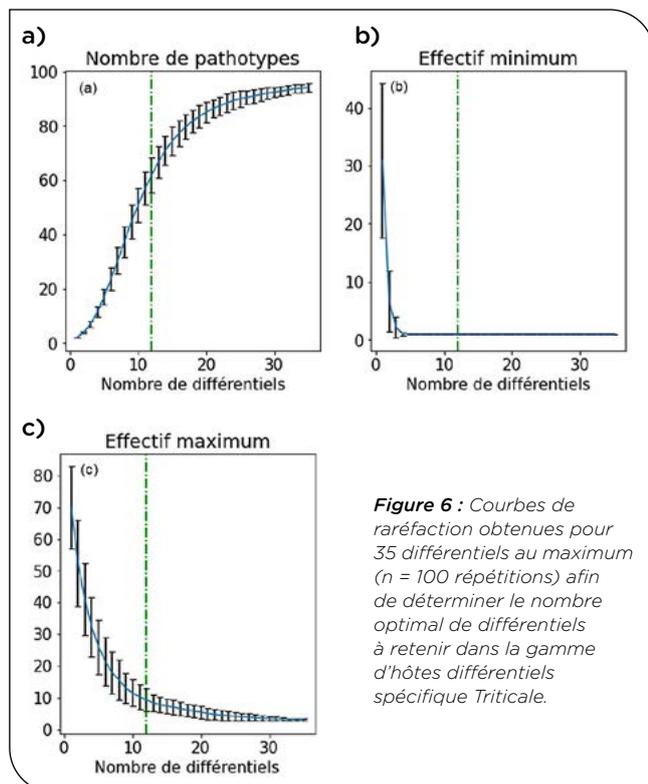
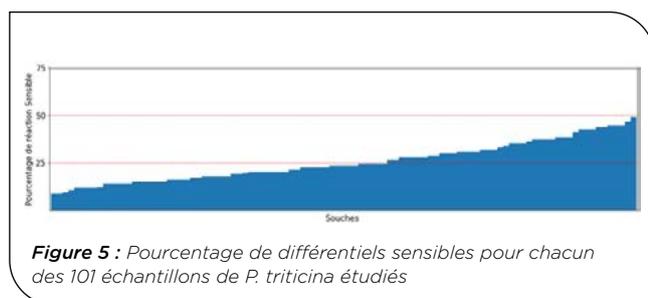
Figure 4 : Fréquence des différents types d'infections obtenus lors de la caractérisation des 101 échantillons de *P. tritricina* sur les 94 différentiels

L'existence de réponses contrastées au niveau de nombreux différentiels, pourrait témoigner d'une grande diversité au sein de notre population d'isolats. Ceci a été confirmé via l'observation du pourcentage de différentiels sensibles (Figure 5). Certaines souches sont capables de contourner environ 40% des différentiels tandis que d'autres moins de 10%. Il y a également un contraste au sein des pathotypes déterminés avec la gamme blé tendre. Par exemple, pour les isolats qui possèdent le pathotype O120060 (14 individus), le pourcentage de différentiels contournés varie entre 12 et 45%. De même, le pourcentage pour ceux de pathotype O120020 (32 individus) varie entre 9 et 43%. Ceci témoigne de la nécessité d'établir une gamme différentielle spécifique pour les populations de triticales.

Afin de déterminer le nombre d'hôtes différentiels à retenir pour la gamme différentielle spécifique Triticale, une analyse de raréfaction a été réalisée (Figure 6). A partir des 49 différentiels candidats, 35 différentiels ont été sélectionnés de façon aléatoire afin de calculer trois paramètres 100 fois : le nombre de combinaisons de virulences différentes ainsi que l'effectif minimal et maximal pour ces combinaisons. On observe que, dès 5 différentiels, il y a au minimum une souche qui possède une combinaison de virulence unique (effectif minimal = 1 ; Figure 6b). On constate également un

nombre important de profils de virulence différents, et donc des pathotypes différents, avec peu de différentiels. Par exemple, seulement 8 différentiels suffisent pour différencier environ 40 pathotypes (Figure 6a) et le pathotype majoritaire aura un effectif d'environ 15 individus (Figure 6c). Afin de déterminer le maximum de diversité au sein de notre population triticales, le nombre de différentiels a été fixé à 12 (le milieu de la phase de croissance de prise en compte de la diversité) en retenant sept lignées isogéniques Thatcher (*Lr1*, *Lr3*, *Lr23*, *Lr17*, *Lr37*, *Lr44* et *LrB*) et cinq variétés de triticales (Belcanto, RGT Belemac, RGT Eleac, Trefl, KWS Fido). *Lr15*, présentant exactement le même profil de virulence que *Lr1* sur l'ensemble des souches testées, n'a pas été sélectionné pour cette gamme d'hôtes différentiels.

Cette gamme permet d'identifier 50 pathotypes différents sur les 101 souches testées, avec des effectifs allant de un à huit isolats (Figure 7a et 7b), et de conserver une bonne différenciation des isolats ayant un pathotype de type blé tendre. Cependant, il ne semble pas y avoir de pathotype majoritaire pour les pathotypes de type triticales (Figure 7a). Tout comme avec la gamme spécifique blé tendre, il y a plusieurs pathotypes (39) avec des effectifs inférieurs ou égaux à 2 (Figure 7b).



► C. Génotypage des populations pathogènes

Au total, quarante MLG (multilocus genotypes) différents ont été déterminés dont seulement quatre possèdent des effectifs supérieurs à 3 individus (Figure 8). Ceci témoigne d'une très grande diversité au sein de la population de *P. triticina* prélevée sur triticale, ce qui est en parfaite adéquation avec les résultats obtenus à partir des données de phénotypage.

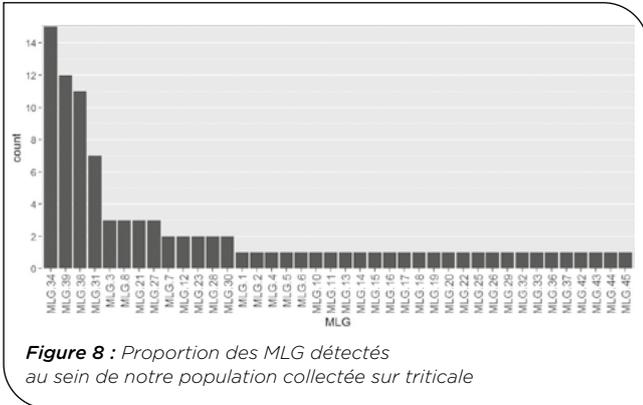


Figure 8 : Proportion des MLG détectés au sein de notre population collectée sur triticale

Afin de visualiser les relations entre les individus, nous avons décidé de représenter le Minimum spanning network (MSN) en utilisant, d'une part, les pathotypes déterminés à l'aide de la gamme blé tendre (Figure 9a) et, d'autre part, les pathotypes déterminés à partir de la gamme triticale (Figure 9b). Cette méthode permet de visualiser la distance de Bruvo entre les différents groupes génétiques. Pour les deux représentations, seuls les pathotypes ayant un effectif supérieur ou égal à 5 ont été représentés. Les pathotypes restants ont été classés dans la catégorie "Autre". Pour les deux représentations, les pathotypes de type blé tendre sont discriminés du reste des échantillons. Les pathotypes déterminés avec la gamme d'hôtes différentiels triticale établie lors du projet sont mieux regroupés. Ceci témoigne de la meilleure adaptation de notre gamme pour caractériser les isolats de *P. triticina* issus de variétés triticale. Pour le cas des pathotypes déterminés à l'aide de la gamme d'hôtes différentiels utilisée pour caractériser les isolats issus de variétés blé tendre, les effectifs sont plus importants (entre 12 et 32), ce qui peut rendre le regroupement de ces isolats plus compliqué. Dans les deux cas, on observe trois groupes de faibles effectifs (dont un comprenant des isolats ayant des pathotypes de type blé tendre) et un groupe qui représente environ 80% de notre population collectée sur triticale (Figure 9).

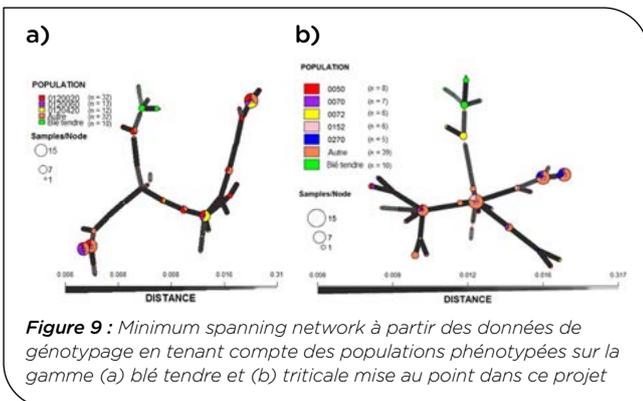


Figure 9 : Minimum spanning network à partir des données de génotypage en tenant compte des populations phénotypées sur la gamme (a) blé tendre et (b) triticale mise au point dans ce projet

Dans le but de confirmer les deux groupes de faibles effectifs de pathotypes triticale, une Analyse en Composantes Principales (ACP) suivie d'une Classification Hiérarchique sur Composantes Principales (HCPC) a été réalisée (Figure 10a) à partir des tailles d'allèles des différents marqueurs sur l'ensemble des souches pour l'ensemble des données. Deux isolats ayant des pathotypes uniques de type blé tendre (Tr21_M006 et Tr18_M361) sont isolés des autres isolats. Afin de mieux visualiser les résultats de cette analyse pour les isolats de pathotypes de type triticale, celle-ci a été de nouveau réalisée en excluant les isolats ayant un pathotype de type blé tendre (Figure 10b). On retrouve ainsi les trois groupes triticales déjà identifiés dans le MSN (identité des isolats au sein de ces groupes) : l'un avec 80% des échantillons (cluster 2), et les deux autres de faibles effectifs (clusters 1 et 3).

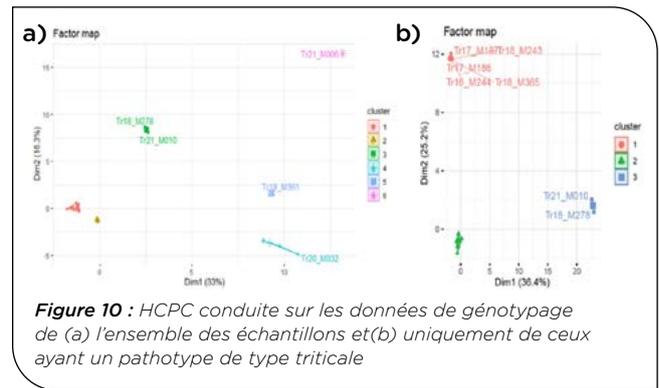


Figure 10 : HCPC conduite sur les données de génotypage de (a) l'ensemble des échantillons et (b) uniquement de ceux ayant un pathotype de type triticale

La détermination de l'informativité des marqueurs génétiques pris en compte dans les analyses de populations a été évaluée avec le logiciel Cervus (Kalinowski *et al.*, 2007) pour calculer le Polymorphism Information Content (PIC), le nombre d'allèles par marqueurs et l'hétérozygotie attendue/observée. Sur les 35 marqueurs microsatellites (SSR) utilisés, 9 marqueurs sont très informatifs dont 6 sont des nouveaux marqueurs testés dans le cadre de ce projet et seulement 2 sont sur le même chromosome (WLR2-25 et WLR5-5 sur le chromosome 07A) (Figure 11).

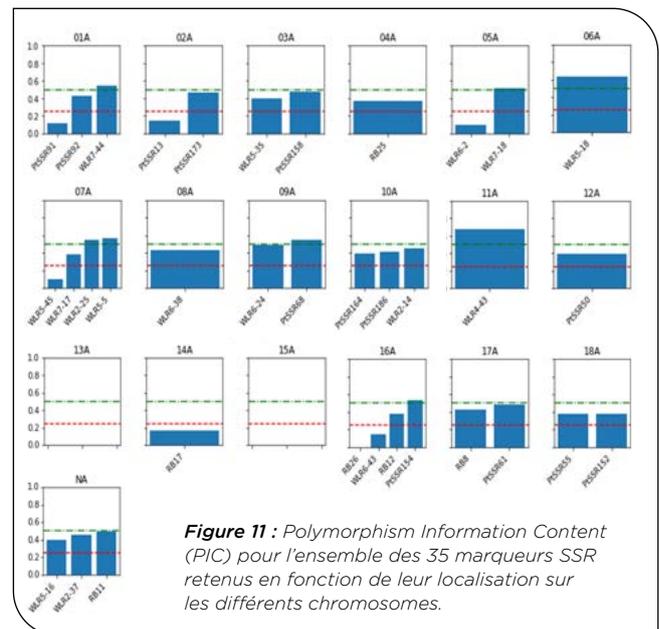


Figure 11 : Polymorphism Information Content (PIC) pour l'ensemble des 35 marqueurs SSR retenus en fonction de leur localisation sur les différents chromosomes.

La prise en compte des marqueurs moyennement informatifs (19 marqueurs SSR avec un PIC > 0,25) permettrait d'avoir au minimum un marqueur sur chacun des 18 chromosomes (la localisation n'ayant pas pu être réalisée pour les marqueurs RB11, WLR5-16 et WLR2-37) pour 80% des chromosomes de *P. triticina* (à l'exception des chromosomes 13A et 15A sans marqueur identifié et du chromosome 14A pour lequel le marqueur existant n'est pas informatif ; Figure 11). Un nouveau set de marqueurs SSR a ainsi été proposé pour caractériser les populations de *P. triticina* collectées sur triticales en se basant sur plusieurs critères :

1. Une valeur de PIC supérieure à 0,25 (marqueur moyennement informatif) et idéalement supérieure à 0,5 (marqueur très informatif, Botstein *et al.*, 1980)
2. Un seul marqueur par chromosome pour avoir une bonne couverture génotypique
3. S'il y a plusieurs marqueurs avec un PIC supérieur à 0,5 sur le même chromosome (cas de WLR2-25 et WLR5-5 sur le chromosome 7A), le marqueur ayant la meilleure correspondance avec les groupes génétiques définis précédemment a été conservé.

Ce set contient donc : WLR7-44, PtSSR173, PtSSR158, RB25, WLR7-18, WLR5-18, WLR2-25, WLR6-38, PtSSR68, WLR2-14, WLR4-43, PtSSR50, PtSSR154, PtSSR61, PtSSR152 qui sont localisés sur 15 des 18 chromosomes de *P. triticina*. WLR5-16 et RB11 dont les localisations ne sont pas connues complètent ce set (Figure 11).

Une nouvelle ACP suivie d'une HCPC a ensuite été réalisée avec ce nouveau set de marqueurs pour les seuls isolats avec un pathotype de type triticales. Les trois mêmes groupes sont retrouvés avec ce nouveau set, il n'y a donc pas de perte d'information majeure malgré la diminution du nombre de marqueurs considérés dans le set de SSR spécifique triticales (Figure 12).

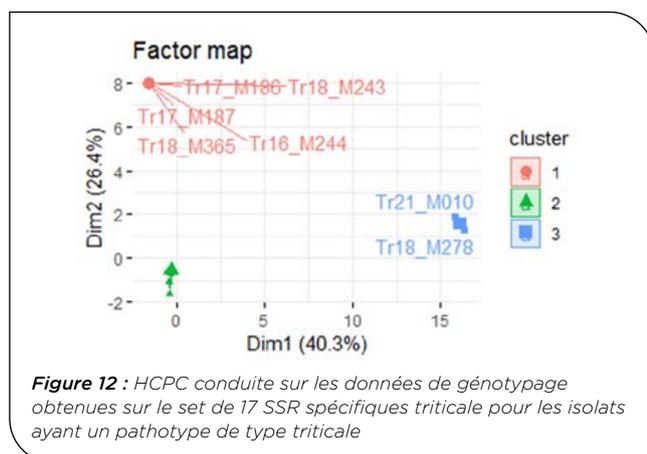


Figure 12 : HCPC conduite sur les données de génotypage obtenues sur le set de 17 SSR spécifiques triticales pour les isolats ayant un pathotype de type triticales

► D. Caractérisation au champ de la diversité des sources de résistance à la rouille brune dans les variétés cultivées en France, et de l'impact de la maladie

En 2019, sur les quatre sites disponibles pour le phénotypage seuls les sites d'Angers, d'Etoile sur Rhône et Ranzin (Allemagne) ont été notés. Le dispositif implanté sur le site de Pontivy n'a pas pu être phénotypé en rouille brune à cause d'une présence trop importante de rouille jaune, qui en s'installant plus

précocement est venue contrarier l'implantation de la rouille brune malgré la contamination artificielle réalisée sur ce dispositif.

La figure 13 présente les pressions de rouille brune observées sur les populations biparentales TrVu et KaVu sur les sites d'Angers, d'Etoile-sur-Rhône et Ranzin.

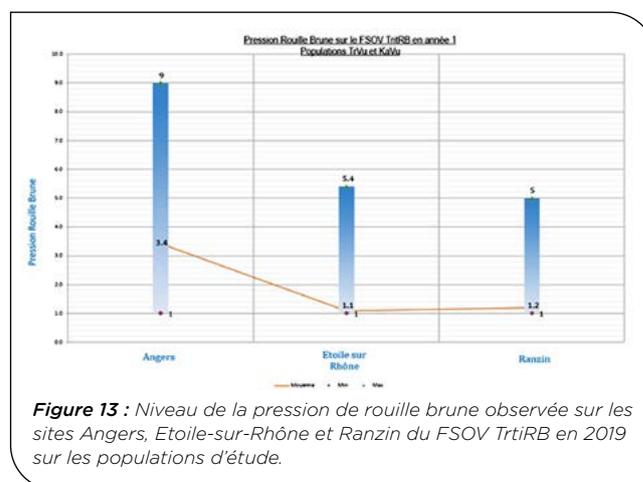


Figure 13 : Niveau de la pression de rouille brune observée sur les sites Angers, Etoile-sur-Rhône et Ranzin du FSOV TrTriRB en 2019 sur les populations d'étude.

La pression en rouille brune a été relativement faible sur les sites d'Etoile-Sur-Rhône et Ranzin sur les deux populations. Seul le site d'Angers qui a reçu une contamination artificielle, présente un niveau d'attaque de rouille brune plus importante mais qui reste néanmoins assez modérée. Les causes possibles à ces faibles pressions peuvent être une faible présence de la rouille brune sur site, de mauvaises conditions de développement et/ou la compétition avec la rouille jaune qui s'est développée plus précocement.

Le niveau assez modéré de la pression rouille brune a permis d'observer une gamme de sensibilité au sein des individus des deux populations d'étude TrVu et KaVu, l'écart entre les individus les plus sensibles et les plus résistants reste relativement faible (3 points d'écart). A Angers, la population VuTr semble un peu plus sensible que la population KaVu (pour les quartiles, la médiane et le niveau maximum atteint) (Figure 14).

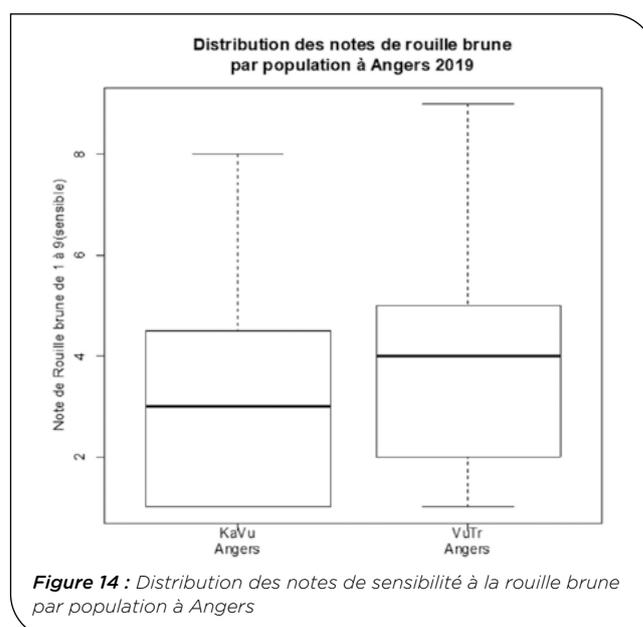


Figure 14 : Distribution des notes de sensibilité à la rouille brune par population à Angers

En 2020, sur les quatre sites de phénotypage, seul le site d'Etoile sur Rhône a montré une pression de rouille brune intéressante pour un phénotypage (Figure 15). Une mauvaise implantation due aux conditions climatiques de l'année n'a pas permis d'exploiter le site de Pontivy et la plateforme sur le site d'Angers a été « polluée » par la présence de rouille jaune précoce et de tâches physiologiques importantes. Quant au site situé en Allemagne, aucune pression de rouille brune n'a été observée.

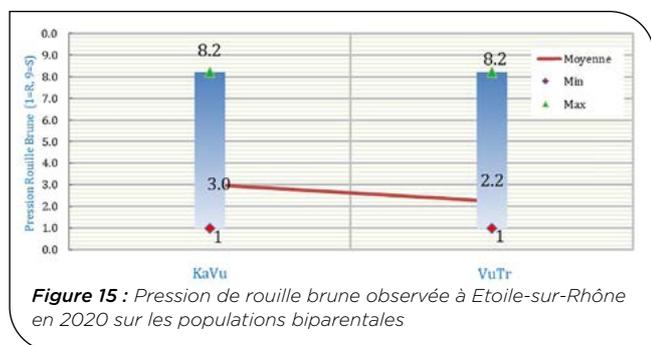


Figure 15 : Pression de rouille brune observée à Etoile-sur-Rhône en 2020 sur les populations biparentales

Phénotypage du panel variétal

La figure 16 présente la comparaison de la sensibilité à la rouille brune observée sur le panel variétal entre les années 2019 (à Angers) et 2020 (à Etoile-sur-Rhône). En 2020, 4 variétés n'ont pu être notées. La comparaison a été réalisée sur les quinze variétés du panel présentes les deux années.

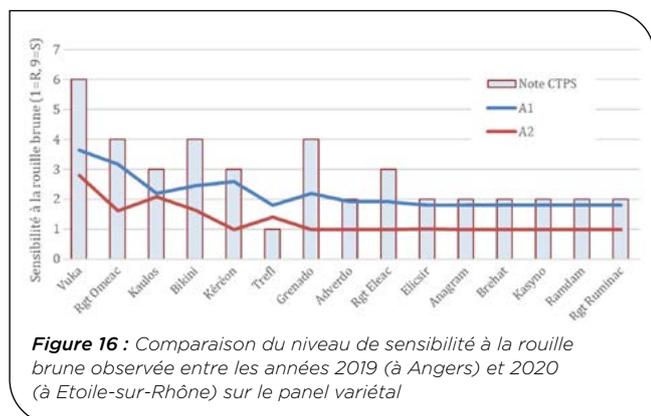


Figure 16 : Comparaison du niveau de sensibilité à la rouille brune observée entre les années 2019 (à Angers) et 2020 (à Etoile-sur-Rhône) sur le panel variétal

De même que pour les populations biparentales, en 2019, sur les quatre sites de phénotypage, seul le site d'Angers a présenté des niveaux de symptômes de rouille brune exploitables et en 2020 seul le site d'Etoile sur Rhône a apporté un niveau d'attaque de la rouille brune satisfaisant.

Malgré le peu de données communes aux deux années du projet et une pression relativement faible en 2019 et moyenne en 2020, nous observons les profils variétaux attendus vis-à-vis de leur sensibilité à la rouille brune respectives. La variété Bellac la plus sensible du panel n'a pas pu être notée en 2020 mais montrait bien un des profils les plus sensibles de 2019. La variété Vuka (cotation CTPS à 4) et RGT Omeac (cotation CTPS à 6) sont les variétés notées les plus sensibles sur ces deux années. De même, les variétés au profil résistant comme Anagram, Brehat, Kasyno, Ramdam montrent bien leur résistance vis-à-vis de la rouille brune ces deux années. La corrélation entre les deux années est assez élevée (0,774) et confirme que les phénotypages réalisés sur le panel, bien qu'en conditions de faible pression rouille jaune, sont cohérents.

Phénotypage des triticales primaires

Aucun symptôme n'a été vu sur les triticales primaires octoploïdes en 2019 et 2020. Toutes les notes sont égales à 1 quel que soit le lieu, y compris à Angers en 2019 ou sur Etoile sur Rhône en 2020 où la pression était correcte. Cela confirme la bonne résistance de ces triticales destinés à être utilisés en géniteurs (les n° 1, 2, 6, 10 et 13 ont d'ailleurs déjà été utilisés). Néanmoins une nouvelle année d'observations serait nécessaire. Ces résistances peuvent provenir du parent blé résistant (cas de Azzerti par exemple) et/ou du seigle (cas de SU Stakkato et Dukato notamment) (Tableau 2).

► E. Déterminisme génétique de la résistance à la rouille brune de deux parents résistants

Phénotypage des populations d'étude

Les notations de sensibilité à la rouille brune en 2019 (année 1) sur ces populations n'ont pas apporté une grande diversité, les notes s'étalant uniquement dans une échelle de 2 à 4, tandis que sur l'année 2020 (année 2), les notes allaient de 1 à 7.

Population Vuka x Trefl (VuTr)

Il y a une diversité de la sensibilité à la rouille brune entre les lignées composant la population VuTr (figure 17). La corrélation entre la sensibilité à la rouille brune de 2019 et 2020 est correcte (0,68). Les lignées peu à moyennement sensibles sont restées dans les mêmes valeurs de sensibilité (figure 17).

Population Kaulos x Vuka (KaVu)

La corrélation entre les deux années sur la sensibilité à la rouille brune est assez moyenne (0,44) reflétant une plus grande disparité de la sensibilité à la rouille brune entre les années 2019 et 2020 (figure 18) notamment sur les lignées sensibles.

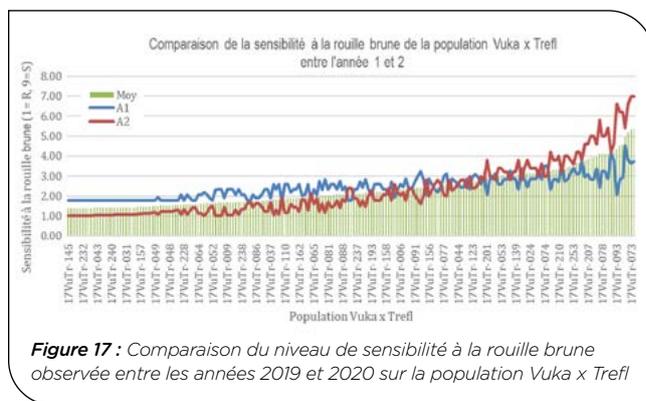


Figure 17 : Comparaison du niveau de sensibilité à la rouille brune observée entre les années 2019 et 2020 sur la population Vuka x Trefl

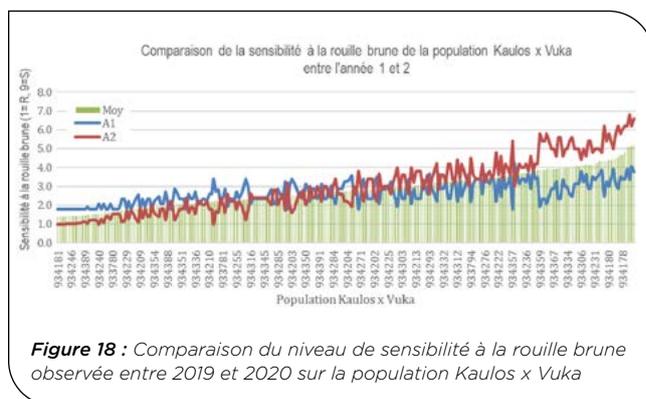


Figure 18 : Comparaison du niveau de sensibilité à la rouille brune observée entre 2019 et 2020 sur la population Kaulos x Vuka

► F. Analyse QTL de résistance à la rouille brune

Plusieurs QTL ont été détectés (Tableau 4). Pour la population KaVu, des QTL de résistance ont été mis en évidence pour l'année 2020 à Etoile sur Rhône sur les chromosomes 4R, 5R et 6A. Ils expliquent entre 6,52 et 7,29%.

Sur la population VuTr, 2 QTL majeurs apportés par Trefl (à Angers, 43,3% en 2019 et 13,5% en 2020 et à Etoile sur Rhône en 2020, 30% d'explication) ont été mis en évidence sur le chromosome 4R. Un QTL à faible part d'explication (5,3%) a également été mis en évidence sur le chromosome 4B. Les 2 QTL majeurs de la populations VuTr, bien que ciblant 2 lieux et 2 années différentes, n'en forment probablement qu'un seul.

Les QTL d'épiaison identifiés dans le cadre de la recherche de QTL pour la résistance à la Rouille Jaune (FSOV Rouille Jaune) ne correspondant à aucun des QTL identifiés pour la résistance à la Rouille Brune, aucun effet de l'épiaison sur la résistance à la rouille brune n'a été mis en évidence.

4 Conclusion

Les deux premières années du projet ont été caractérisées par une faible attaque de la rouille brune sur une majorité des sites. En effet, seuls les sites d'Angers en année 1 et d'Etoile-sur-Rhône en année 2 (sous contamination artificielle) ont permis des notations satisfaisantes. Ceci souligne la difficulté à phénotyper pour la rouille brune, qui a été soit peu présente ou peu développée, soit fortement concurrencée par de la rouille jaune plus précoce. De plus, la contamination artificielle ne garantit en rien un meilleur phénotypage de la rouille brune du fait de la concurrence toujours possible de la rouille jaune.

Une pression plus importante en 2020 a toutefois permis de déceler plus facilement les lignées les plus sensibles à la rouille brune.

L'ensemble des échantillons de *P. triticina* collectés sur triticale présente une très forte diversité phénotypique. Des isolats ayant des pathotypes de type blé tendre ont été détectés mais ils se différencient fortement des autres isolats, ce qui témoigne de la présence d'une sous-population spécifique au triticale.

De nombreux nouveaux pathotypes ont été détectés avec de nouvelles virulences, comme sur *Lr3*, ce qui témoigne d'une diversification des populations de *P. triticina* au cours de ces dernières années avec une sélection de pathotypes spécialisés au triticale.

Le projet TritiRB a permis la mise au point d'une gamme d'hôtes différentiels spécifique aux isolats collectés

sur triticale et d'identifier une diversité de nouveaux pathotypes non détectés jusqu'alors. En effet, des isolats triticale présentant le même pathotype avec la gamme blé tendre ont des profils de virulence très différents sur la gamme triticale. Une forte diversité génotypique a également été observée avec un total de quarante MLG différents que nous avons pu regrouper en : un groupe principal contenant la majorité des isolats, puis deux autres de faibles effectifs. Afin de diminuer le nombre de marqueurs microsatellites nécessaires pour la caractérisation génétique, un nouveau lot informatif de 17 marqueurs a été proposé. Un lien entre génotype et pathotype a pu être mis en évidence notamment pour l'un des deux groupes génétiques 'triticale' de faibles effectifs. C'est le cas notamment des souches virulentes sur Thatcher-Lr3, Thatcher-Lr44 ou Trefl (<10%) : les deux seules souches capables de contourner les résistances de ces trois différentiels constituent par exemple un seul même groupe génétique.

Concernant le déterminisme génétique de la résistance à la rouille brune, un QTL majeur de résistance a été mis en évidence sur le chromosome 4R dans la population biparentale VuTr. Ce QTL explique à lui seul plus de 40% de la variance phénotypique totale avec l'allèle favorable provenant du parent Trefl. La zone délimitant le QTL mesure entre 2,4 et 3,5 cM selon l'environnement dans lequel il a été mis en évidence. Afin de faciliter l'utilisation de ce QTL de résistance, une cartographie fine de la région en saturant l'intervalle avec de nouveaux marqueurs moléculaires pourrait être réalisée ainsi que la production de recombinants supplémentaires pour réduire la taille de ce QTL. L'objectif final serait de pouvoir développer des marqueurs moléculaires pour suivre ce QTL dans des projets de sélection assistée par marqueurs et ainsi faciliter et accélérer la sélection.

Les résultats obtenus permettent de mettre à disposition sur cette espèce les outils suivants :

- Guide des symptômes (types d'infection) de rouille brune sur triticale permettant d'affiner le phénotypage.
- Mise à disposition d'un protocole de production, conservation et application des inoculas de *Puccinia triticina*.
- Détermination de la spécificité d'hôtes de *Puccinia triticina* pour une meilleure gestion des systèmes de culture.
- Meilleure connaissance du comportement des variétés de triticale actuelles face à cette maladie ayant notamment permis l'établissement d'une nouvelle gamme d'hôtes différentiels spécifique triticale.
- Détection de QTL de résistance adulte permettant la création de génotypes résistants par les sélectionneurs
- Ressources génétiques nouvelles.

pop	année/lieu	pic	chrom	pos	Intervalle de confiance	LOD	%	effet RB
A= Vuka B=Kaulos								
KV	Année 2 Etoile sur Rhone	Sd17446	4R	125	123.5-128.6	3.69	6.52 %	BB=-0.75
KV	Année 2 Etoile sur Rhone	Sd29675	5R	141.2	81.3-161.5	3.82	7.29 %	bb=-0.82
KV	Année 2 Etoile sur Rhone	Sd5884	GAb	9.4	0-15	3.98	7.16 %	AA=-0.82
A= Vuka B=Trefl								
VuTr	Année 1 Angers	Sd25974	4Rb	9.4	6.6-10	17.87	43.30 %	BB=-2.51
VuTr	Année 2 Etoile sur Rhone	Sd6876	4Rb	12.5	10.3-12.8	11.09	30 %	BB=-0.56
VuTr	Année 2 Angers	Sd6876	4Rb	12.5	10.3-12.8	4.52	13.54 %	BB=-1.27
VuTr	Année 2 Angers	Sd13355	4B		0-6.79	2.11	5.34 %	AA=-1.07

Tableau 4 : QTL de résistance à la rouille brune identifiés sur les populations biparentales KaVu et VuTr

Références bibliographiques

- Ali S, Rodriguez-Algaba J, Thach T, Sorensen CK, Hansen JG, Lassen P, Nazari K, Hodson DP, Justesen AF, Hovmoller M** (2017). Yellow rust epidemics worldwide were caused by pathogen races from divergent genetic lineages. *Front. Plant Sci.* 8, 1057.
- Audenaert K, Troch V, Landschoot S, Haesaert G** (2014). Biotic stresses in the anthropogenic hybrid triticale (xTriticosecale Wittmack): current knowledge and breeding challenges. *Eur. J. Plant Pathol.* 140, 615-630.
- Bhardwaj SC, Prashar M, Jain SK, Kumar S, Sharma YP** (2010). Physiologic specialization of *Puccinia triticina* on wheat (Triticum species) in India. *Indian J. Agric. Sci.* 80, 805-811.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW** (1980). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 32, 314-331.
- Czajowski G, Kosman E, Słowacki P, Park RF, Czembor P** (2021a). Assessing new SSR markers for utility and informativeness in genetic studies of brown rust fungi on wheat, triticale, and rye. *Plant Pathology*, 70(5), 1110-1122.
- Czajowski G, Kosman E, Słowacki P, Park RF, Czembor P** (2021b). Pathogenic and genetic diversity of *Puccinia triticina* from triticale in Poland between 2012 and 2015. *Plant Pathology*, 70(9), 2148-2164.
- Flath K** (2011). Interaction between powdery mildew (*Blumeria graminis*) and triticale (xTriticosecale) in Germany as a model for pathosystem analysis. *Phytopathology* 101.
- Hanzalova A, Bartos P** (2011). Resistance of Triticale to wheat leaf rust (*Puccinia triticina*). *Czech J. Genet. Plant Breed.* 47, 10-16.
- Hovmoller M, Walter S, Bayles RA, Hubbard A, Flath K, Sommerfeld N, Leconte M, Czembor P, Rodriguez-Algaba J, Thach T, Hansen JG, Lassen P, Justesen AF, Ali S, de Vallavieille-Pope C** (2016). Replacement of the European wheat yellow rust population by new races from the centre of diversity in the near-Himalayan region. *Plant Pathol.* 65, 402-411.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC** (2007). Revising how the computer program *CERVUS* accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16, 1099-1106.
- Kamvar ZN, Tabima JF, Grünwald NJ** (2014). Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* 2:e281; DOI 10.7717/peerj.281
- Kwiatek, Majka M, Wiśniewska H, Apolinarska B, Belter J** (2015). Effective transfer of chromosomes carrying leaf rust resistance genes from *Aegilops tauschii* Coss. into hexaploid triticale (xTriticosecale Witt.) using *Ae. tauschii* × *Secale cereale* amphiploid forms. *J. Appl. Genet.* 56, 163-168.
- Losert D, Maurer HP, Leiser WL, Würschum T** (2017). Defeating the Warrior: genetic architecture of triticale resistance against a novel aggressive yellow rust race. *Theor. Appl. Genet.* 130, 685-696.
- Oettler G** (2005). The fortune of a botanical curiosity – Triticale: past, present and future. *J. Agric. Sci.* 143, 329.
- Pretorius ZA, Bender CM** (2010). First report of virulence for the wheat leaf rust (*Puccinia triticina*) resistance gene *Lr32* in South Africa. *Plant Dis.* 94, 381-381.
- Sodkiewicz W, Strzembicka A** (2004). Application of *Triticum monococcum* for the improvement of triticale resistance to leaf rust (*Puccinia triticina*). *Plant Breed.* 123, 39-42.
- Stakman EC, Stewart DM., Loegering WQ** (1962). Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. *U.S. Agric Res Serv E617*, 1-53.
- Terefe TG, Visser B, Herselman L, Prins R, Negussie T, Kolmer JA, Pretorius ZA** (2014). Diversity in *Puccinia triticina* detected on wheat from 2008 to 2010 and the impact of new races on South African wheat germplasm. *Eur. J. Plant Pathol.* 139, 95-105.
- Troch V, Audenaert K, Bekaert B, Höfte M, Haesaert G** (2012). Phylogeography and virulence structure of the powdery mildew population on its 'new' host triticale. *BMC Evol. Biol.* 12, 76.
- Troch V, Audenaert K, Vanheule A, Bekaert B, Höfte M, Haesaert G** (2013). Evaluation of Resistance to Powdery Mildew in Triticale Seedlings and Adult Plants. *Plant Dis.* 97, 410-417.
- Visser B, Herselman L, Bender CM, Pretorius ZA** (2012). Microsatellite analysis of selected *Puccinia triticina* races in South Africa. *Australas. Plant Pathol.* 41, 165-171.
- Wilson J** (1989). Inheritance of the Leaf Rust Resistance of Four Triticale Cultivars. *Phytopathology* 79, 731.
- Wilson J, Shaner G** (1984). Genetics of leaf rust resistance in triticale. *Phytopathology* 74, 875.
- Wilson J, Shaner G** (1987). Slow leaf-rusting resistance in triticale. *Phytopathology* 77, 458-462.
- Zhang J, Wellings CR, McIntosh RA, Park RF** (2010). Seedling resistances to rust diseases in international triticale germplasm. *Crop Pasture Sci.* 61, 1036-1048.

TritiRB : Caractérisation de sources de résistance durables à la rouille brune chez le Triticale

Anne-Lise BOIXEL¹, Valérie LAURENT², Annaig BOUGUENNEC³, Ellen GOUEMAND DUGUE², Christophe JEUDI^{2*}, Éric DELALEAU⁴, Frédéric FANTIN⁵, Anthony ROULLIER⁶, Philippe Du CHEYRON⁷, Ghislain DELESTRE¹, Corentin PICARD¹, Henriette GOYEAU¹

1 - Université Paris-Saclay, INRAE, UR BIOGER, 91123 Palaiseau

2 - SAS Florimond Desprez Veuve et Fils, BP 41, 59242 Cappelle en Pevèle

3 - UCA, INRAE, GDEC, 63000, Clermont-Ferrand, FRANCE

4 - Lemaire-Deffontaines, 180 rue du Rossignol, 59310 Auchy les Orchies

5 - Agri-Obtentions URD78, Ferme de Gauvilliers, 78660 Orsonville

6 - RAGT 2n, rue Emile Singla, site de Bourran, 12000 Rodez

7 - Arvalis-Institut du Végétal, 3 rue Joseph et Marie Hackin, 75016 Paris

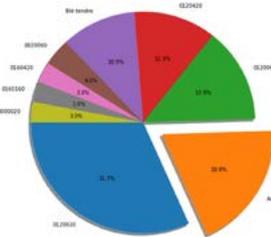
*Coordinateur : GIE Triticale

Contexte et objectifs

Le triticale est sujet à des épidémies de rouille brune, qui peuvent impacter fortement le rendement (de 30 à 40% sur variété sensible en 2016) en particulier dans l'Ouest de la France. Il est donc indispensable de veiller à introduire dans le fonds génétique des sources de résistance, de préférence quantitatives et diversifiées, pour assurer leur durabilité. Pour une gestion de l'efficacité et de la durabilité des résistances génétiques du Triticale vis-à-vis de la rouille brune, nous avons procédé à la caractérisation : (i) des populations de l'agent pathogène (*P. triticina*) à l'origine des épidémies de rouille brune sur cette espèce, (ii) de la résistance du matériel génétique proposé par le GIE Triticale, (iii) du déterminisme génétique de la résistance à la rouille brune en réalisant le phénotypage de lignées descendantes de croisements avec une variété sensible.

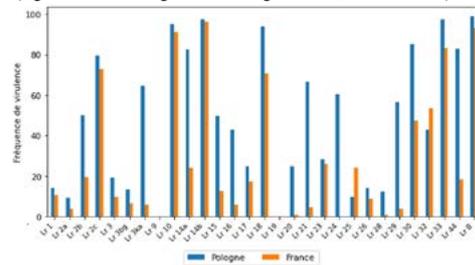
Gamme d'hôtes différentiels spécifique triticale

Mise au point d'une gamme de 12 hôtes différentiels permettant de mieux discriminer les phénotypes de virulence vis-à-vis des gènes *Lr* et des sources de résistance utilisées dans la sélection du triticale : 8 pathotypes majoritaires et 3 groupes phénotypiques



Proportion des pathotypes tels que caractérisés sur la gamme d'hôtes spécifiques triticale mise au point dans le cadre du projet

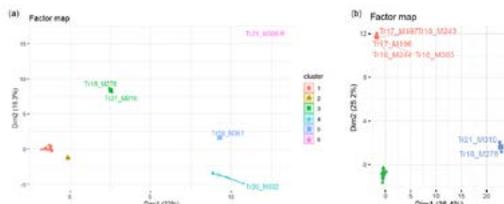
Des populations françaises et polonaises de *P. triticina* sur triticale qui présentent 74% de similitude sur leurs fréquences de virulence (e.g. contournement généralisé des gènes *Lr10*, *Lr14b* et *LrB*)



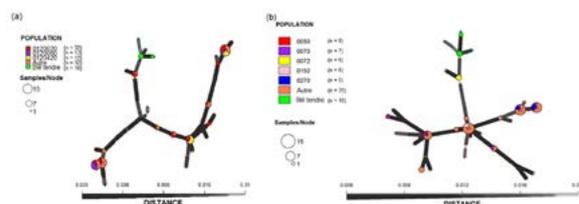
Comparaison des fréquences de virulence au sein des populations françaises (n = 101 échantillons) et polonaises (n = 242 échantillons) collectées sur triticale pour 29 isolignées Thatcher pour les gènes *Lr*

Caractérisation des populations de *P. triticina* prélevées sur triticale

Quatre groupes génotypiques : un de type blé tendre et trois autres spécifiques triticale dont un majoritaire regroupant 80% des isolats



HCPC (Hierarchical Clustering on Principal Components) conduite sur les données de génotypage en tenant compte de (a) l'ensemble des échantillons puis (b) uniquement avec ceux ayant un pathotype de type triticale



Minimum spanning network sur les données de génotypage en tenant compte des populations phénotypées sur (a) la gamme blé tendre et (b) la gamme triticale mise au point dans ce projet

Recherche de sources de résistance

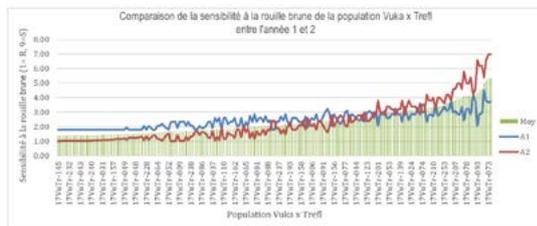
Phénotypage

Ségrégation de résistance quantitative au champ :

- 2 populations de triticale (obtenues par Single Seed Descent (SSD)) : **Vuka x Trefl** et **Kaulos x Vuka**
- 200 et 253 descendants en contamination naturelle et artificielle sur **4 lieux** et **2 années** de phénotypage.



Localisation des sites de phénotypage



Comparaison du niveau de sensibilité à la rouille brune observée entre les années 2019 et 2020 sur la population Vuka x Trefl.

Génotypage

Détections de QTL majeurs :

- 1) Un QTL majeur de résistance a été mis en évidence dans la population biparentale **Vuka x Trefl**. Le QTL localisé sur le **chromosome 4R** explique à lui seul plus de **40%** de la variance phénotypique totale avec l'allèle favorable provenant du parent **Trefl**.
- 2) Un QTL à faible effet (5.34% d'explication) a également été mis en évidence sur le chromosome 4B de la population Vuka x Trefl.
- 3) Pour la population Kaulos x Vuka, des QTL de résistance ont été mis en évidence pour l'année 2 à Etoile sur Rhône sur les chromosomes 4R, 5R et 6A. Ils expliquent entre 6.52 et 7.29%.

Conclusion-Discussion

Des lignées résistantes de triticale et de triticale primaire ont été repérées malgré la difficulté de phénotyper la rouille brune au champ pendant le projet. Des outils de phénotypage (gamme de 12 hôtes différentiels) et de génotypage (jeu de 17 marqueurs SSR) des populations de *P. triticina* spécifiques triticale ont été développés. Ces outils ont permis une caractérisation fine des profils de virulence (8 pathotypes majoritaires et 3 groupes phénotypiques) et de la diversité génétique des populations (40 Multi-Locus Genotypes).

Un QTL majeur de résistance a été mis en évidence dans la population biparentale Vuka x Trefl sur le chromosome 4R. Le QTL explique à lui seul plus de 40% de la variance phénotypique totale avec l'allèle favorable provenant du parent Trefl. A ce stade, la zone délimitant le QTL mesure entre 2,4 et 3,5 cM selon l'environnement dans lequel il avait été mis en évidence. Afin de faciliter l'utilisation de ce QTL de résistance, une cartographie fine de la région sera réalisée (projet FSOV RUSTRIT 2023-2027).

DÉBAT : Analyse de Diversité d'un panel de pré-breeding de Blé tendre par une approche Transcriptomique

Hélène RIMBERT¹, Frédéric CHOLET¹, Odile ARGILLIER², Jérôme AUZANNEAU³, Mark DAVEY⁴, Philippe DUFOUR⁵, Sylvie DUTRIEZ⁶, Pascal GIRAudeau⁷, Ellen GOUEMAND-DUGUE⁸, Gemma MOLERO⁹, Michael THROUDE¹⁰, David GRIMBICHLER¹¹, Etienne PAUX¹², Sophie BOUCHET^{1*}

1 - INRAE-Université Clermont-Auvergne, UMR 1095, GDEC, 5 chemin de Beaulieu, 63100 Clermont-Ferrand, FRANCE

2 - Syngenta France SA, 2 avenue Gustave Eiffel, F-28000 Chartres, FRANCE

3 - AGRI-Obtentions, Chemin de la Petite Minière, 78280 Guyancourt, FRANCE

4 - BASF Innovation Center Gent, Technologiepark-Zwijnaarde 101, 9052 Gent, BELGIQUE

5 - RAGT, Rue Emile Singla, BP 3331 12033 Rodez Cedex 9, FRANCE

6 - Lidea Seeds, avenue Gaston Pheobus, 64230 Lescar, FRANCE

7 - Secobra Recherches, Centre de Bois-Henry, 78580 Maule, FRANCE

8 - FLORIMOND DESPREZ VEUVE & FILS, 59242 Cappelle-en-Pévèle, FRANCE

9 - KWS MOMONT SAS, 7 Rue de Martinval, 59246 Mons-en-Pévèle, FRANCE

10 - Limagrain Europe, Centre de recherche de Chappes, 63720 Chappes, FRANCE

11 - Université Clermont Auvergne, Plateforme AuBi and Mésocentre Clermont-Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, FRANCE

12 - VetAgro Sup, 89 Avenue de l'Europe, CS 82212, 63370 Lempdes, FRANCE

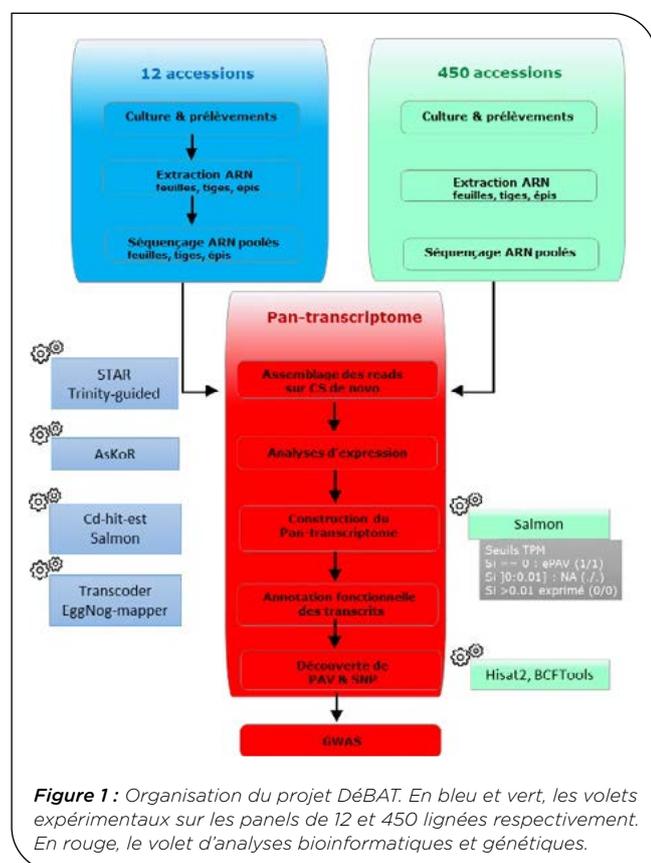
*Coordinateur : Sophie BOUCHET, sophie.bouchet@inrae.fr

1 Introduction

Développer de nouvelles variétés de blé plus résistantes aux stress biotiques et abiotiques est un défi majeur de la sélection d'aujourd'hui pour l'agriculture de demain. Pour cela, les ressources génétiques constituent un réservoir de gènes et d'allèles encore largement inexploités.

Dans le cadre du projet Investissements d'Avenir BreedWheat, un panel de 450 lignées issues de la diversité mondiale et adapté à une culture en France a été sélectionné. Ce panel, appelé BWP3, a fait l'objet de caractérisations au niveau moléculaire (génotypage 350K SNP, capture d'exome de 2000 gènes candidats) et phénotypique (rendement en condition optimale ou stressée, résistance aux maladies majeures, qualité protéique et boulangère). Le séquençage du génome entier reste une option trop coûteuse en raison de la taille du génome du blé tendre. Une alternative consiste à étudier le génome exprimé par l'intermédiaire du transcriptome.

Dans le cadre du projet DÉBAT, nous avons produit un catalogue de l'ensemble des gènes exprimés dans les lignées du panel BWP3 par la méthode RNA-seq (Figure 1). Nous avons séquencé à forte profondeur les transcrits de 12 lignées représentatives de la diversité. Nous avons pu comparer les niveaux d'expression des gènes dans 3 tissus différents (tige, épi et feuille). Le reste du panel a été séquencé sur le mélange des 3 tissus. Ceci nous a permis d'identifier la présence absence (PAV) d'isoformes de protéines sur l'ensemble du panel et de typer les SNP présents dans ces séquences. Des analyses d'association ont été conduites sur les PAV et les SNP avec les phénotypes évalués dans le cadre du projet compagnon Ex-IGE porté par Limagrain et INRAE (Figure 1).

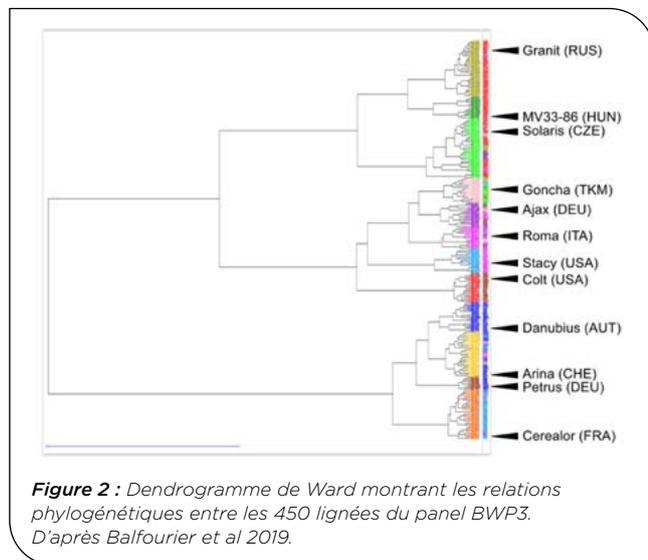


2 Matériel et méthode

► Sélection de douze lignées représentatives du panel BWP3

Sur la base des résultats obtenus dans le cadre du projet BreedWheat, un arbre phylogénétique des 450 lignées du panel BWP3 a été construit et nous a permis de définir douze groupes génétiques (Figure 2). Les groupes 1 à 6

correspondent principalement à des variétés d'Europe de l'Est et du Sud ; les groupes 7 et 8 à des variétés d'Amérique du Nord ; les groupes 9 à 12 à des variétés d'Europe de l'Ouest. Nous avons ensuite sélectionné un représentant pour chacun des douze groupes (Figure 2). Ces douze lignées sont utilisées dans le volet 1 du projet pour des analyses transcriptomiques fines.



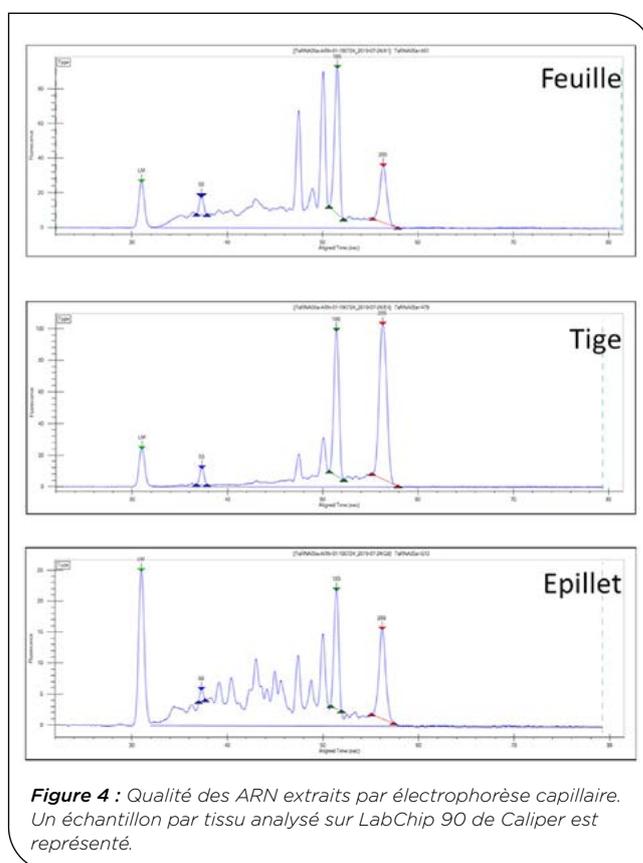
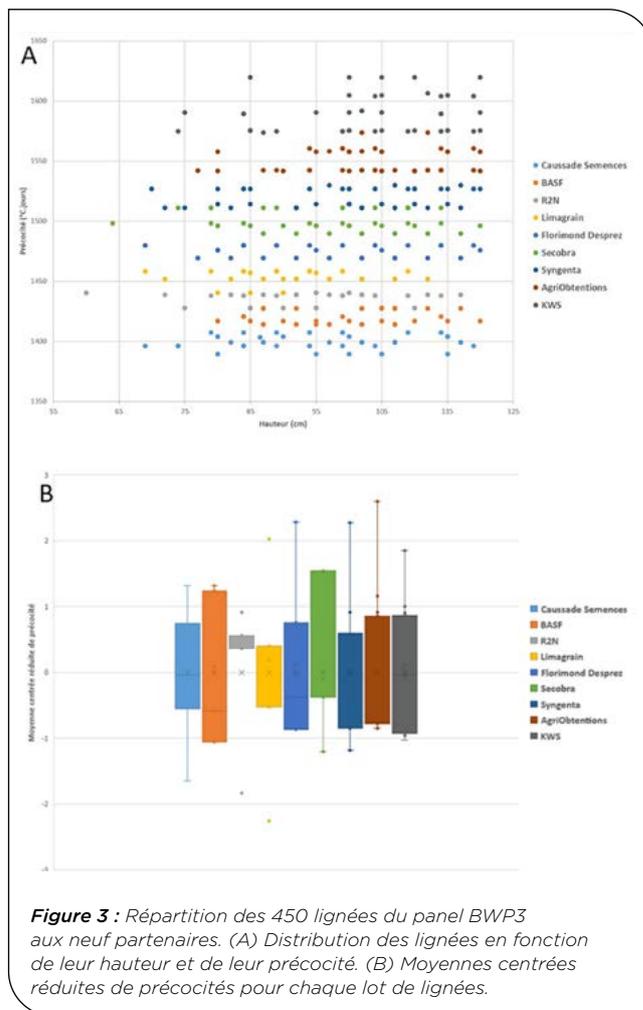
► Culture et prélèvements

Les neuf partenaires privés (AgriObtections, BASF, Caussade Semences, Florimond Desprez, KWS, Limagrain, R2N, Secobra, Syngenta) ont mis en culture 50 lignées du panel BWP3 (Annexe 1). Ces lots ont été constitués de manière à homogénéiser autant que possible les précocités des lignées pour un même partenaire (Figure 3A). L'écart moyen entre les lignées les plus précoces et les plus tardives d'un lot est d'environ 25 degrés jour, soit environ deux jours (Figure 3B). En parallèle, Biogemma a reçu les semences des 12 lignées représentatives des groupes.

Le Centre de Ressources Biologiques « Céréales à Pailles » d'INRAE GDEC a distribué les graines du panel. Elles sont issues d'autofécondations contrôlées et correspondent aux mêmes lots que ceux utilisés dans les projets BreedWheat et EX-IGE. Les plantes ont été cultivées en serre dans les mêmes conditions chez les différents partenaires. Des échantillons ont été prélevés à partir de trois organes à des stades de développement différents pour maximiser la diversité des transcrits : feuilles au stade trois feuilles (Zadoks Z13), tige au stade floraison (Z65) et épillet au stade floraison (Z65) (Annexe 1).

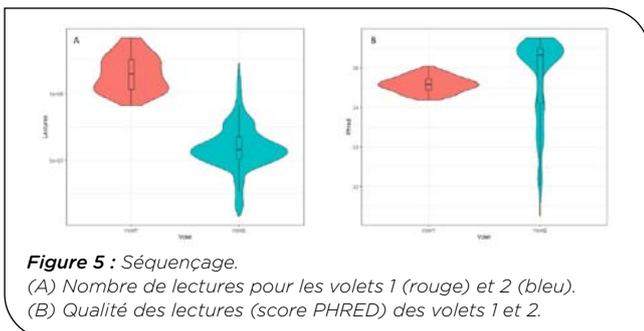
► Extraction d'ARN et construction des banques

Les ARN totaux ont été extraits par Biogemma à l'aide du kit Promega SV 96 total RNA Isolation System. Dans le volet 1, pour les 12 lignées, chacun des trois échantillons de tissus fait l'objet de deux extractions. Dans le volet 2, une seule extraction a été réalisée par échantillon de tissu. La qualité des ARN extraits a été évaluée par électrophorèse capillaire sur un système LabChip 90 de Caliper (Figure 4). Pour les feuilles et les tiges, la qualité est correcte, comme montré par le score RIN (RNA Integrity Number) proche voire supérieur à 7. Pour les épillets, les profils montrent un début de dégradation, avec un score RIN de l'ordre de 5.



► Séquençage

Les banques ont été séquençées sur Illumina NovaSeq6000 qui séquence en paires de lectures (2x150 pb). L'ensemble des extractions ont été séquençées individuellement pour les 12 lignées de référence, et poolées pour le panel. Pour le volet 1, le nombre total de banques est donc de 72 (12 lignées x 3 échantillons x 2 réplicats). Dans le volet 2, pour chacune des 450 lignées, un pool équimolaire des ARN totaux provenant des différents tissus a été réalisé avant construction des banques. Chaque banque de RNAseq a été indexée par une séquence unique, permettant un pooling avant séquençage. Pour le volet 1, une moyenne de 2 x 115 millions de lectures et 35 Mb ont été produites, et pour le volet 2, une moyenne de 2 x 59 millions de lectures et 18 Mb (Figure 5A). Tous les échantillons ont une très bonne qualité (score Phred > 30) avec une moyenne supérieure à 34 (Figure 5B).



► Développement d'un pipeline d'analyse

Ces analyses ont nécessité des ressources de calcul exceptionnelles. Nous avons développé un pipeline automatisé et optimisé sur le cluster de calcul HPC2 ainsi que sur l'infrastructure cloud du Mésocentre de Clermont-Ferrand OSCAR (OpenStack Cloud en Auvergne Rhône-Alpes, Figure 6). Ce pipeline inclut des étapes de nettoyage des extrémités de reads de mauvaise qualité avec Trimmomatic (Bolger *et al.* 2014), d'alignement sur transcrits par l'outil Salmon (Patro *et al.* 2017), d'alignement sur génome entier avec STAR (Dobin *et al.* 2013), d'assemblage de transcrits de novo avec Trinity (Grabherr *et al.* 2011) et de clustering de transcrits avec cdhit (Li and Godzik 2006) (Annexe 3). Les scripts sont écrits en BASH et sont utilisés dans des environnements informatiques dédiés grâce à Conda. Ils sont disponibles sur la forge GitLab d'INRAE (<https://forgemia.inra.fr/fsov-debat/debat-bashpipeline>).

► Construction du pan-transcriptome

Nous avons conduit un alignement préliminaire des données de séquençage des douze lignées du volet 1 sur la séquence de référence de Chinese Spring (CS) v1.1 à l'aide de l'outil Kallisto. Les lectures de séquençage ont ensuite été alignées sur le génome de référence Chinese Spring (IWGSC refseq v2.1 (Zhu *et al.* 2021)) avec STAR. Les alignements des réplicats ont ensuite été fusionnés avec SAMTools merge (Li *et al.* 2009). Trinity a ensuite été utilisé en mode « genome guided » pour tirer profit des informations d'ancrage sur CS lors de l'assemblage des transcrits. Toutes les lectures non « mappées » ont été assemblées à part. Les transcrits obtenus ont ensuite été comparés entre échantillons pour obtenir un jeu de données non redondant. Pour cela, nous avons utilisé une méthode de « clustering » de séquences (CD-HIT-EST) en spécifiant les seuils suivants : $\geq 99\%$ d'identité nucléotidique sur $\geq 90\%$ de la longueur des

transcrits. Par ailleurs, les transcrits < 500 bp ont été éliminés à cette étape. Enfin, les lectures Illumina ont été « remappées » sur ce set de transcrits avec Salmon. Le but était ici d'éliminer les contigs qui correspondent à des résidus de transcription (transcrits douteux, peu reproductibles) et aux erreurs dans le processus d'assemblage par Trinity.

► Caractérisation du pan-transcriptome chez les 450 lignées

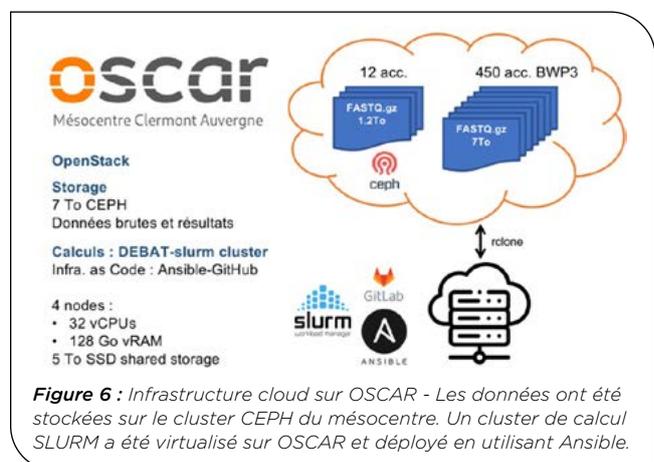
Les lectures de séquençage produites dans le volet 2 ont été nettoyées avec Trimmomatic puis ont été assignées au pan-transcriptome à l'aide de Salmon. Salmon réalise un pseudo-mapping et non un alignement comme les outils de mapping classiques et nous donne directement les valeurs de Transcripts Per Million (TPM) pour chacune des lignées. Un ePAV (Présence Absence d'expression) a été considéré absent d'une lignée lorsque la valeur de TPM du transcrit est de 0. Les transcrits ayant une valeur de TPM > 0.01 sont considérés comme présents. Tous les transcrits pour lesquels la valeur de TPM était comprise entre 0 et 0.01 ont été convertis en données manquantes. Cela nous permet de générer une matrice de ePAVs pour les 400k transcrits et les 450 accessions. Une recherche de polymorphisme sur ces ePAV a produit une matrice 83K SNP supplémentaires sur le panel. Ces données sont accessibles aux partenaires du projet sur le dépôt RechercheDataGouv (RDG) (<https://doi.org/10.57745/GQZF6L>).

► Analyse fonctionnelle des gènes

Les gènes différentiellement exprimés entre tissus ont été recherchés avec AskoR(askomics/askoR) sur les 12 lignées de référence. Les contrastes d'expression entre tissus ont été évalués avec DESeq2. Les gènes correspondants aux transcrits ont été prédits grâce à l'annotation de CS et l'outil Mikado (compare). Les protéines des transcrits non annotés ont été traduites avec transdecoder. Les fonctions de ces protéines ont été prédites à partir de plusieurs bases de données de gènes orthologues (PFAM domains, KEGG pathways, Gene Ontology annotation) avec eggnoG-mapper (diamond). Une étude d'enrichissement en gene ontology pour les gènes non annotés a été effectuée avec R-topGO.

► Infrastructure de calcul et stockage

Les analyses ont été réalisées sur le cluster de calcul HPC2 du Mésocentre Clermont-Auvergne (UCA). Une infrastructure cloud dédiée à été déployée spécifiquement pour le projet en collaboration avec la plateforme AuBl. Les codes Ansible sont disponibles (<https://github.com/HeleneRimbert/oscar-triannot>).



► Disponibilité des données

Les données du projet (matrices de ePAVs, SNPs, annotations fonctionnelles) sont disponibles pour les partenaires du projet sur l'entrepôt national RechercheDataGouv.
DOI : <https://doi.org/10.57745/GQZF6L>

3 Résultats

► Analyses préliminaires

Sur la base de précédentes analyses, nous estimons que les trois échantillons de tige, épis et feuille devraient nous permettre d'accéder à 82% des gènes exprimés au cours du développement normal d'un plant de blé et 59% des gènes codants des protéines (Pingault *et al.* 2015). D'après l'analyse préliminaire avec Kallisto, en moyenne, pour une variété donnée, 81.3% des lectures sont alignées sur Chinese-Spring (CS) (Figure 7). Une expression supérieure à 1 TPM est détectée pour 58 430 gènes HC (« high confidence », sur -107k prédits), soit environ 54% des gènes HC annotés sur la séquence de référence. Ces résultats sont très proches de l'attendu (59%). En prenant l'ensemble des 12 variétés, une expression est trouvée dans au moins un tissu d'une variété pour 72 998 gènes, soit 68%. Il est intéressant de noter que lorsque l'on étudie la distribution des niveaux d'expression des gènes le long des chromosomes, il semble possible de détecter des introgressions. C'est notamment le cas pour la variété Solaris pour laquelle le profil de niveaux d'expression est nul sur le 1BS (Figure 8).

Ceci peut s'expliquer par la translocation 1RS-1BL présente dans cette variété, impliquant le remplacement du bras court du chromosome 1B de blé par le bras court du chromosome 1R de seigle.

► Expression différentielle du volet 1

Les gènes sont différemment exprimés entre tissus sur les 12 lignées de référence (Table 1).

Les profils d'expression des échantillons clusterisent par tissus et non par phylogénie des accessions (Figure 9, 10).

Nb gènes sur-exprimés	Épi	Feuille	Tige
Épi	-	5750	2650
Feuille	5509	-	5674
Tige	3884	6549	-

Table 1 : Nombre de gènes différemment exprimés chez les 12 lignées. Le tableau se lit des lignes vers les colonnes. Exemple : 5509 gènes sont surexprimés dans la feuille par rapport à l'épi.

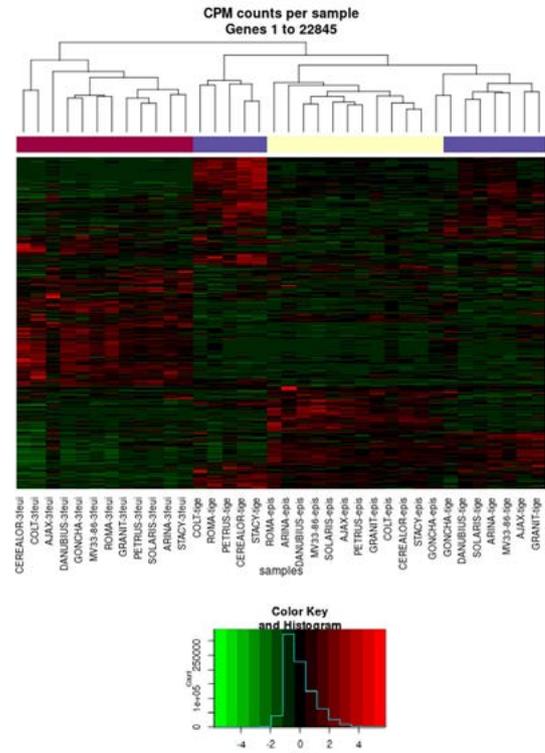


Figure 9 : Clustering des données d'expression de 22845 gènes sur 12 lignées de référence. Réalisé avec AskOR.

Les échantillons en magenta dans le dendrogramme correspondent aux feuilles, le violet aux tiges et le jaune aux épis.

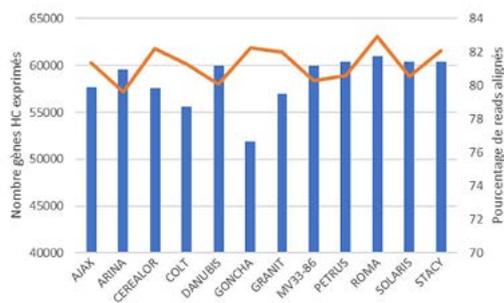


Figure 7 : Reads et gènes alignés sur le RefSeq v1.1. % de reads en orange, nombre de gènes HC exprimés (> 1 TPM) en bleu.

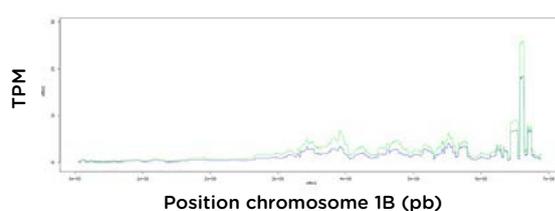


Figure 8 : Profil d'expression des gènes du chromosome 1B chez Solaris. Les deux réplicats de RNA-seq pour le tissu feuille sont représentés (moyenne sur fenêtre glissante).

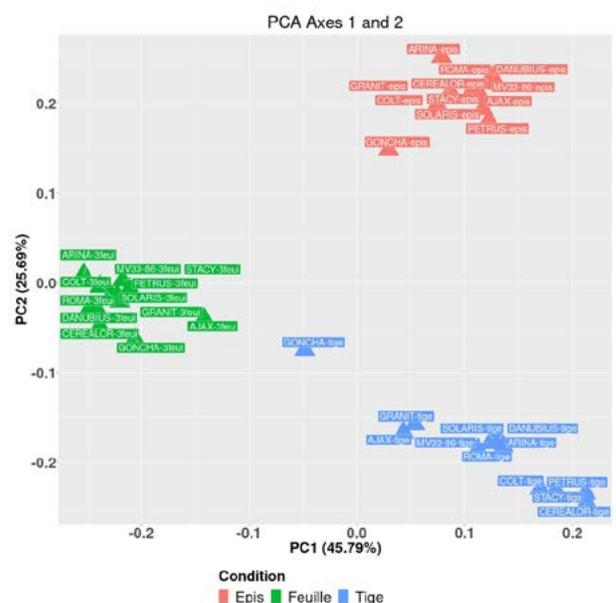


Figure 10 : ACP des données d'expression des 12 lignées de référence dans 3 tissus.

► Construction du pan-transcriptome

Au total, 331k transcrits ont été assemblés en moyenne pour chacun des 36 échantillons (Annexe 4) représentant 369 Mb.

Le clustering a permis d'obtenir un set non redondant de 7 669 122 transcrits. Ce nombre élevé s'explique par le fait que l'assemblage de novo de lectures Illumina sur transcriptome génère beaucoup de transcrits fragmentés (1 transcrit assemblé en plusieurs contigs). Par ailleurs, une part significative de transcrits correspondent à des ARN non codants, encore peu étudiés chez le blé. L'étape de re-mapping des reads sur la collection de 7M de transcrits a permis de réduire à 317 496 transcrits identifiés dans au moins 3 échantillons. Au total, 69 022 transcrits correspondent à 60 585 gènes HC prédits chez Chinese Spring, soit 56% des gènes HC prédits.

Nous avons construit un pan-transcriptome de référence en utilisant les transcrits des 12 lignées de référence :

- prédits comme gènes chez CS (IWGSC RefSeq v2.1: **110 909** transcrits) ;
- présents chez CS mais non prédits comme gène (**224 843**) ;
- absents chez CS (**46 935**).

Ce pan-transcriptome représente au total **382 687 transcrits potentiels**. Les transcrits du panel BWP3 ont été caractérisés par rapport à ces transcrits.

► Annotation fonctionnelle

Parmi les 271 778 transcrits non prédits, nous avons identifié 84741 ORFs complets d'une taille supérieure à 80 acides-aminés. Les protéines correspondantes ont été traduites avec transdecoder. Les peptides obtenus ont été comparés à une base de données de gènes orthologues. Les fonctions des protéines ont été prédites à partir des fonctions des membres du cluster d'orthologues correspondant (Table 2).

Bases de données	Nombre de protéines
PFAM	76 657
KEGG	7 321
Gene Ontology	41 955
Description littérale	78 952

Table 2 : Annotation des protéines non annotées chez Chinese Spring.

Parmi les gènes non annotés chez CS, d'après un test d'enrichissement en Gene Ontology (GO), on trouve un excès de gènes impliqués dans les processus liés à la réponse à l'environnement (stress biotiques, abiotiques, réponse à la lumière, température, stress osmotique, Annexe 6).

► Diversité des 400k pan-transcrits

Après pseudo-alignement des reads RNA-seq du panel BWP3 avec Salmon contre les 400k transcrits de référence, avec un seuil de 0.01 TPM pour définir un transcrit comme présent chez une lignée (Figure 12),

on obtient 186k transcrits exprimés en moyenne par accession et 396K transcrits exprimés dans au moins une variété (99% du 400k PAN-Transcriptome).

En fonction du caractère rare ou conservé, les transcrits ont été classés en « core » (transcrit présent chez plus de 90% des lignées), « shell » (de 10% à 90% des lignées) et « cloud » (moins de 10% des lignées). Seuls 46k transcrits sont partagés par plus de 90% des lignées (11%), 285k appartiennent au « shell » (71%) et 66k sont rares (17%). Voir Figure 11.

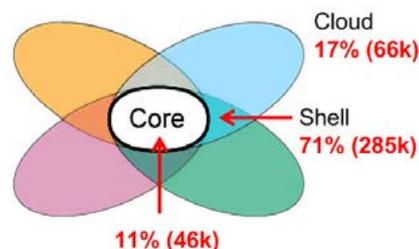


Figure 11 : Pan-transcriptome.

► Diversité génétique

Un alignement des reads RNA-seq a été réalisé sur le génome de Chinese spring v2.1 avec Salmon. Au total, 576k SNPs sont localisés dans des transcrits ayant une position physique couvrant 60k gènes annotés. Parmi eux, 83K avec une MAF > 0.01 et un nombre de données manquantes inférieur à 10% ont été conservés pour les études d'association.

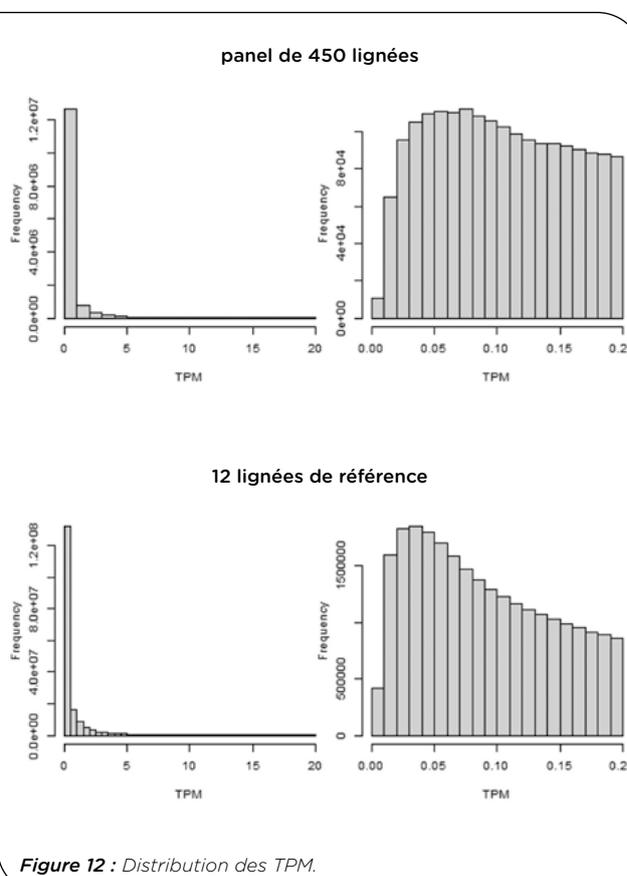


Figure 12 : Distribution des TPM.

Les Minimum Allele Frequency (MAF) sont équilibrées pour les ePAV. On observe un excès d'allèles rares pour les SNP (Figure 13). En moyenne, les SNPs comptent 8% de données manquantes, et les ePAV présentent très peu de données manquantes (au maximum 2% par marqueur).

Les SNP issus des ePAV discriminent les mêmes groupes génétiques que les SNP Breedwheat (Figure 14). Par contre les ePAV discriminent des groupes différents.

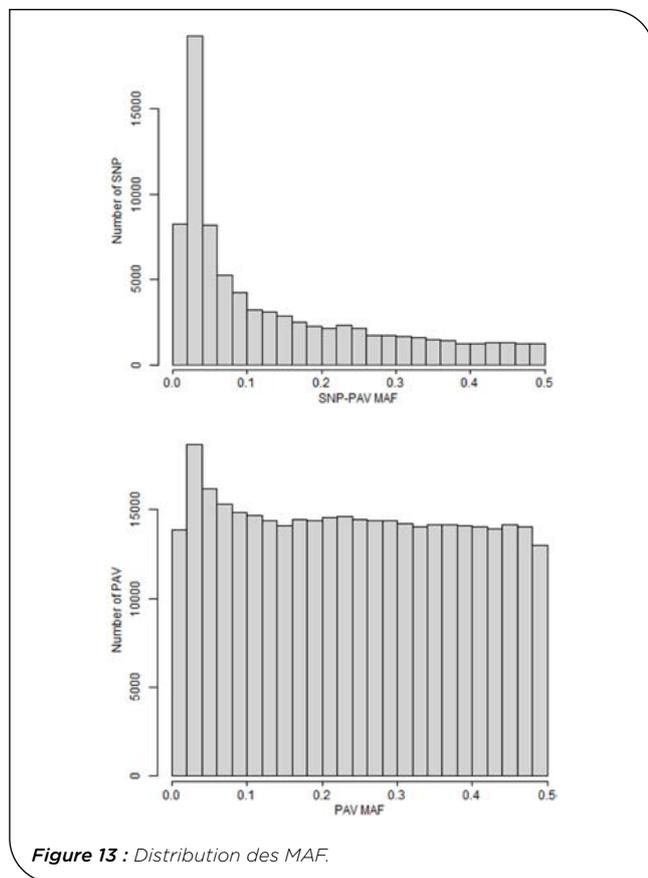


Figure 13 : Distribution des MAF.

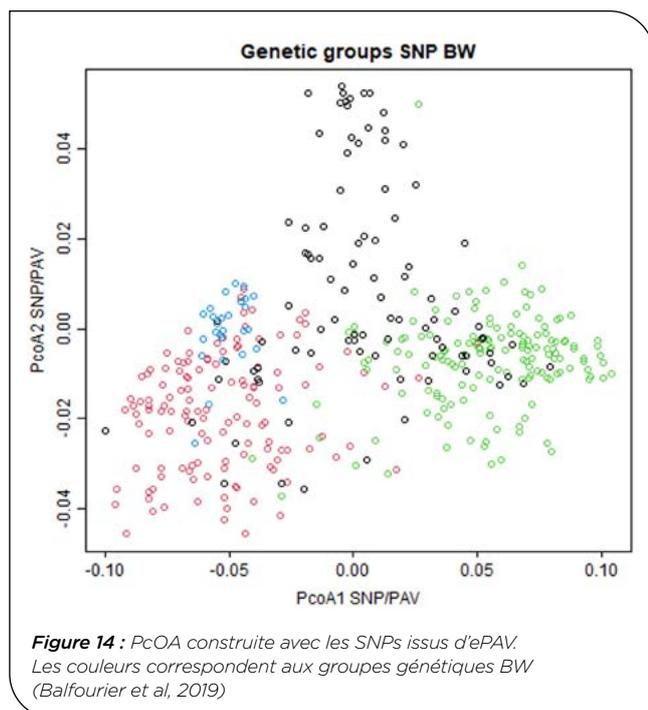


Figure 14 : PCoA construite avec les SNPs issus d'ePAV. Les couleurs correspondent aux groupes génétiques BW (Balfourier et al, 2019)

4 Discussion

Ce projet a permis de décrire la diversité d'expression dans 3 tissus (tige, feuille, épi) de 12 lignées représentatives de la diversité mondiale de blé tendre et d'identifier des protéines différemment exprimées. Pour le panel, nous avons produit une matrice de PAV de 360K transcrits. Elle a permis également de produire 83K SNP avec 8% de données manquantes.

Nous avons identifié 84K protéines non annotées chez CS dont nous avons inféré la fonction. On observe un enrichissement dans des fonctions adaptatives pour ces gènes.

► Construction du PAN-transcriptome

Nous avons développé une méthode hybride d'assemblage des reads RNA-seq en associant mapping avec STAR et assemblage de novo avec Trinity. Cette méthode permet de minimiser la création de fragments de gènes, seuls les reads non alignés étant assemblés de novo. Cependant, le volume de transcrits générés est très élevé (plus de 6,7 millions) et le clustering utilisé ne divise que par deux ce volume (3,8 millions). La nature hexaploïde du blé et le faible taux de divergence entre les 3 sous-génomes A, B et D étant faible (~2%), il nous est apparu indispensable de garder un fort taux d'identité (99%) afin de ne pas rassembler au sein d'un même cluster les transcrits issus de gènes homéologues.

► Caractérisation du pan-transcriptome

Nous avons identifié dans ces travaux une faible proportion de transcrits partagés par plus de 90% des accessions. De manière globale, seule la moitié des 400k transcrits sont exprimés pour chacune des 450 lignées. Il est possible que les paramétrages du clustering des données du volet 1 soit trop stricts et ne permettent pas de rassembler, au sein d'un même cluster, tous les isoformes d'un même gène. Cela a pour conséquence d'éclater l'information d'un même gène en autant d'isoformes portées par les différentes lignées, sous estimant alors le volume de gènes/transcrits partagés.

► GWAS

Les résultats des études d'association entre ces variants SNP et ePAV et des phénotypes de rendement, maladie et qualité protéique sont présentés dans le projet FSOV compagnon Ex-IGE.

► Détection d'introgressions

Vue la faible profondeur de séquençage, nous essayons de vérifier si les absences (très nombreuses) sont de réelles absences. Nous sommes en train de vérifier si les SNP issus des ePAV avec plus de 10% de données manquantes ne correspondent pas justement aux régions avec un réel 3^{ème} allèle « absent ». Nous comparerons la méthode de SNP calling et une méthode de fragmentation sur profil d'expression pour identifier de grosses introgressions connues. Nous utiliserons la meilleure méthode pour typer des introgressions sur l'ensemble du génome.

Nous regarderons également si parmi les reads éliminés ou « unmapped », certains correspondent à des reads d'espèces apparentées (*ventricosa*, *thinopyrum*, *dicoccoides*, *monococcum*, *speltoides*, seigle...) pour avoir une validation supplémentaire des introgressions connues identifiées par notre méthode.

Références bibliographiques

askomics/askoR. [accessed 2024 Feb 27]. <https://github.com/askomics/askoR>

Balfourier F, Bouchet S, Robert S, De Oliveira R, Rimbert H, Kitt J, Choulet F, Paux E. 2019. Worldwide phylogeography and history of wheat genetic diversity. *Sci Adv.* 5(5):eaav0536. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav0536>

Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 30(15):2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 29(1):15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>

Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, et al. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol.* 29(7):644–652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>

Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The Sequence

Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 25(16):2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>

Li W, Godzik A. 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics.* 22(13):1658–1659. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158>

Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. 2017. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods.* 14(4):417–419. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>

Pingault L, Choulet F, Alberti A, Glover N, Wincker P, Feuillet C, Paux E. 2015. Deep transcriptome sequencing provides new insights into the structural and functional organization of the wheat genome. *Genome Biol.* 16(1):29. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0601-9>

Zhu T, Wang L, Rimbert H, Rodriguez JC, Deal KR, De Oliveira R, Choulet F, Keeble-Gagnère G, Tibbits J, Rogers J, et al. 2021. Optical maps refine the bread wheat *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring genome assembly. *Plant J Cell Mol Biol.* 107(1):303–314. <https://doi.org/10.1111/tbj.15289>

DÉBAT : Analyse de diversité d'un panel de pré-breeding de blé tendre par une approche transcriptomique

Hélène RIMBERT¹, Frédéric CHOLET¹, Odile ARGILLIER², Jérôme AUZANNEAU³, Mark DAVEY⁴, Philippe DUFOUR⁵, Sylvie DUTRIEZ⁶, Pascal GIRAudeau⁷, Ellen GOUEMAND-DUGUE⁸, Gemma MOLERO⁹, Mickaël THROUDE¹⁰, Hervé DUBORJAL¹⁰, Adeline CLEMENTI¹⁰, David GRIMBICHLER¹¹, Etienne PAUX¹², Sophie BOUCHET^{1*}

1 - INRAE Université Clermont-Auvergne, UMR 1095, GDEC, 5 chemin de Beaulieu, 63100 Clermont-Ferrand, FRANCE

2 - Syngenta France SA, 2 avenue Gustave Eiffel, F-28000 Chartres, FRANCE

3 - AGRI-Obtentions, Chemin de la Petite Minière, 78280 Guyancourt, FRANCE

4 - BASF Innovation Center Gent, Technologiepark-Zwijnaarde 101, 9052 Gent, BELGIQUE

5 - RAGT, Rue Emile Singla, BP 3331 12033 Rodez Cedex 9, FRANCE

6 - Lidea Seeds, avenue Gaston Pheobus, 64230 Lescar, FRANCE

7 - Secobra Recherches, Centre de Bois-Henry, 78580 Maule, FRANCE

8 - FLORIMOND DESPREZ VEUVE & FILS, 59242 Cappelle-en-Pévèle, FRANCE

9 - KWS MOMONT SAS, 7 Rue de Martinval, 59246 Mons-en-Pévèle, FRANCE

10 - Limagrain Europe, Centre de recherche de Chappes, 63720 Chappes, FRANCE

11 - UCA, Plateforme AuBi & Mésocentre Clermont-Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, FRANCE

12 - VetAgro Sup, 89 Avenue de l'Europe, CS 82212, 63370 Lempdes, FRANCE

*Coordinatrice : Sophie BOUCHET, sophie.bouchet@inrae.fr

Introduction

Dans le cadre du projet DÉBAT, nous avons produit un catalogue de l'ensemble des gènes exprimés dans les lignées d'un panel de 450 lignées représentatives de la diversité mondiale par la méthode RNA-seq. Douze lignées représentatives ont été séquencées en forte profondeur sur 3 tissus (tige, épi et feuille). Des niveaux d'expression différentiels ont été identifiés. Le reste du panel a été séquencé sur le mélange des 3 tissus. Ceci nous a permis d'identifier la présence absence (PAV) d'isoformes de pour 60K gènes annotés High Confidence sur la séquence de référence Chinese Spring et 83K gènes absents de cette séquence. Leur fonction a été prédite. Des analyses d'association ont été conduites sur les PAV et les SNP obtenus avec les phénotypes évalués dans le cadre du projet compagneon Ex-IGE.

Echantillonnage des lignées (Figure 1)-

Volet 1 - 12 lignées représentatives du panel BWP3 du projet Breedwheat ont été sélectionnées (Figure 1B) pour un séquençage RNA-seq forte profondeur (2 x 115 millions de reads, NovaSeq6000).
Volet 2 - Le transcriptome des 450 lignées du BWP3 (Figure 1A) a été séquencé en plus faible couverture (2x25 millions de reads).

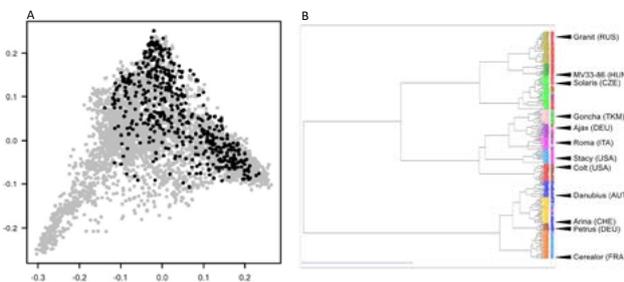


Figure 1 - (A) PCA de 4500 lignées du CRB, représentatives de la diversité mondiale. Les points noirs correspondent aux 450 lignées du projet, adaptées à une évaluation en France; (B) Dendrogramme de Ward des 450 lignées. D'après Balfourier et al. (Science Adv 2019)

Pipeline d'analyses (Figure 2)-

Volet 1 - Le transcriptome des 12 lignées de référence a été séquencé dans trois tissus (tige, feuille, épi). Un pan-transcriptome de référence avec 400K reads unique a été construit.
Volet 2 - Le transcriptome des 450 lignées du BWP3 a été séquencé en mélange. Les reads ont été mappés sur le pan-transcriptome de référence construit dans le volet 1.

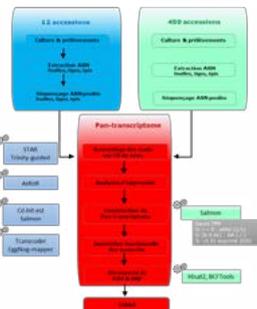


Figure 2: Pipeline d'analyses

Analyse d'expression (Figure 3)-

Volet 1 - Les gènes sont différentiellement exprimés selon les tissus.

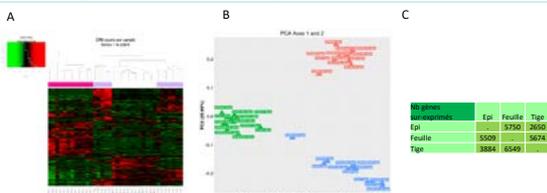


Figure 3 - Niveaux d'expression des gènes dans 12 lignées de référence et 3 tissus; (A) Dendrogramme; (B) ACP; (C) Nombre de gènes sur-exprimés dans les compartiments situés en ligne

Mapping des transcrits -

Volet 1 - Un pan-transcriptome de 400 288 transcrits a été construit à partir des 12 lignées de référence.

En moyenne, 300 millions de reads ont été séquencés par lignée de référence représentant 400K transcrits uniques. Ils correspondent à 60K gènes annotés chez CS (HC ou LC), soit 51% des gènes annotés (Figure 4A) et 84K nouvelles protéines dont nous avons prédit la fonction. Un nombre de reads équivalent est exprimé dans tous les tissus.

Volet 2 - La plupart des 400K pan-transcrits de référence (99%) sont exprimés dans au moins une des 450 lignées (Figure 3B2). En moyenne, 186K transcrits sont exprimés dans chaque lignée (Figure 4B1). Au total, 60K gènes sont exprimés en moyenne par lignée (Figure 4B2).

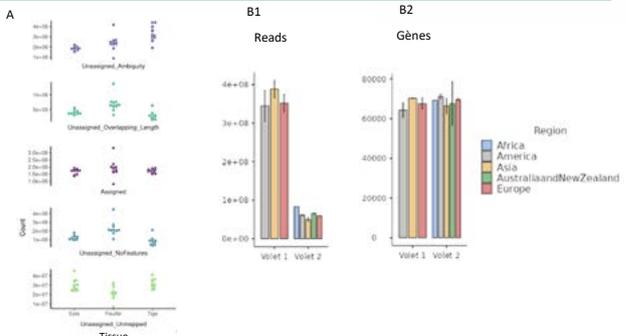


Figure 4 - (A) Assignation des reads RNA-seq "featurecount" sur le génome de référence IWGSC - Chinese spring. Unassigned_Ambiguity: les 2 paires de reads ne mappent pas sur le même chromosome; Unassigned_Overlapping_Length: les deux paires de reads se chevauchent (minimum de 100 nucléotides de séparation autorisée); Assigned: mappent sur des régions de Chinese Spring annotées; Unassigned_NoFeatures: mappent sur des régions de Chinese Spring non annotées; (B) Nombre de reads et de gènes présents par zone géographique

Pan-transcriptome (Figure 5)-

Chaque transcrit a été attribué aux compartiments "core" (plus de 90% des lignées partageant le transcrit), "shell" (entre 10 et 90%) ou "cloud" (moins de 10%). Au total, 71% des transcrits sont présents dans le "shell", 17% dans le "core" et 11% dans le "cloud". En moyenne, un transcrit est présent chez la moitié des lignées du panel.

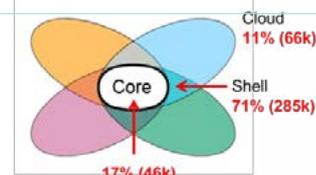


Figure 5 - Distribution du pan-transcriptome

Analyse fonctionnelle - La construction du pan-transcriptome a permis l'identification de 84714 nouvelles protéines pour lesquelles une fonction a été prédite (Transdecoder, eggNOG-mapper). L'enrichissement en GO de ces protéines (R-topGO) a montré une prévalence pour les processus adaptatifs (stress biotiques, abiotiques, lumière, température, stress osmotique ...).

ePAVs et SNP calling-

Nous avons utilisé un seuil de 0,01 TPM pour déclarer un transcrit présent dans une lignée (Figure 6). Les transcrits avec un TPM compris entre 0 et 0,01 ont été déclarés en données manquantes. Après filtre sur données manquantes (<0,1) nous avons gardé 362 899 marqueurs ePAV.

Un SNP calling a été fait parmi les 400K transcrits. Après filtre sur données manquantes, nous avons gardé 83K SNP.

Les Minimum Allele Frequency (MAF) sont équilibrées pour les ePAV. On observe un excès d'allèles rares pour les SNP (Figure 7). En moyenne, les SNPs comptent 8% de données manquantes, et les ePAV présentent très peu de données manquantes (au maximum 2% par marqueur). Les SNP issus des ePAV discriminent les mêmes groupes génétiques que les SNP Breedwheat (Figure 8). Par contre les ePAV discriminent des groupes différents.

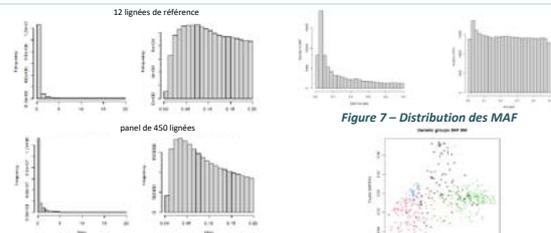


Figure 6 - Distribution des TPM

Figure 7 - Distribution des MAF

Détection automatique d'introgessions -

Une analyse est en cours pour détecter automatiquement les introgessions. Par exemple l'introgession de seigle 1BS/1R est détectée chez Solaris avec une expression nulle des gènes de blé tendre sur le bras court (Figure 9).

Perspectives -

Des études d'associations ont été conduites avec les marqueurs produits dans ce projet et les phénotypes produits de la compagneon Ex-IGE. En éliminant les marqueurs SNP avec beaucoup de données manquantes, nous avons probablement éliminé tous les marqueurs avec trois allèles (absence et présence avec SNP). Il serait intéressant d'exploiter toutes les données Breedwheat et DÉBAT pour valider notre méthode de détection sur des introgessions connues. Nous regarderons également si parmi les reads éliminés ou "unmapped", certains correspondent à des reads d'espèces apparentées (ventricos, thinopyrum, dicoccoides, monococcum, speltoides, seigle...).

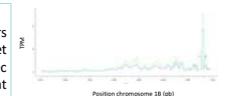
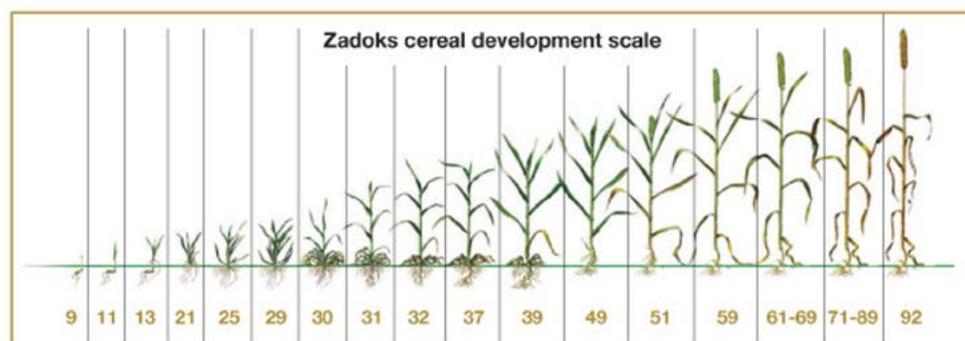


Figure 9 - Profil d'expression des gènes du chromosome 1B chez Solaris



Annexe 1 - Développement des céréales : échelle de Zadoks



Les ARNs totaux pour les 12 lignées ont été extraits aux 3 stades de développement décrits ci-dessus pour les feuilles, tige et épis: feuille au stade 3-feuilles (Z13), tige et épis lors de l'anthesis (Z65).

Leaf at three-leaf stage
(Z13)

Stem at anthesis stage
(Z65)

Spike at anthesis
(Z65)

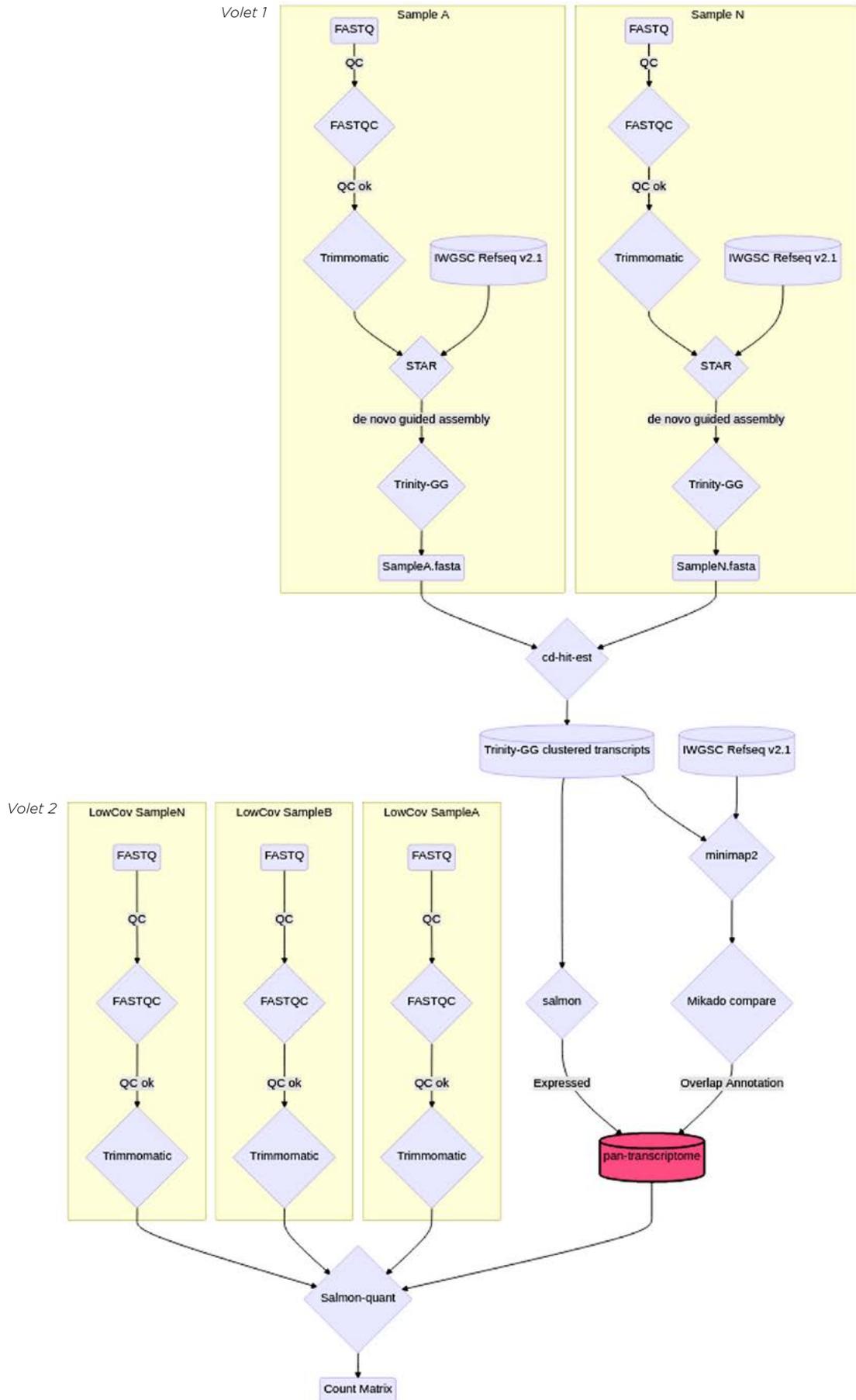
Annexe 2 - Statistiques générales sur les volets 1 et 2

Statistiques descriptives

	Volet	Region	N	Moyenne	Médiane	Ecart-type	Minimum	Maximum
reads	Volet 1	Africa	0	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
		America	6	345196942.33	321238205.00	97584054.12	244349741	491116797
		Asia	3	388500046.33	406920223	38361222.21	344402909	414177007
		AustraliaandNewZealand	0	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
		Europe	27	351918479.00	324778734	118367698.88	196754204	818399260
	Volet 2	Africa	1	83282343.00	83282343	NaN	83282343	83282343
		America	85	61225169.64	59610767	18136537.05	16578660	105053688
		Asia	21	49742318.48	53149172	24188768.87	54867	82171919
		AustraliaandNewZealand	2	65936004.00	65936004.00	1994332.45	64525798	67346210
		Europe	334	58942530.89	57438753.00	18612428.72	8404892	209096620
expressed	Volet 1	Africa	0	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
		America	6	64302.50	64302.50	8953.62	56129	72476
		Asia	3	70311.00	70311	0.00	70311	70311
		AustraliaandNewZealand	0	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
		Europe	27	67588.56	70560	14280.51	36068	85381
	Volet 2	Africa	1	69255.00	69255	NaN	69255	69255
		America	85	71162.11	72531	11396.79	39575	97949
		Asia	21	66432.05	68817	17695.02	10101	93357
		AustraliaandNewZealand	2	67604.00	67604.00	15619.99	56559	78649
		Europe	334	69673.70	69631.00	11335.62	36068	98617
ePAVs	Volet 1	Africa	0	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
		America	0	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
		Asia	0	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
		AustraliaandNewZealand	0	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
		Europe	0	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN
	Volet 2	Africa	1	175947.00	175947	NaN	175947	175947
		America	85	195055.66	194866	15449.73	162674	244703
		Asia	21	215117.14	202266	46767.86	174775	390187
		AustraliaandNewZealand	2	200009.00	200009.00	19820.20	185994	214024
		Europe	334	197342.51	194887.00	15390.23	158230	277157

Statistiques descriptives sur le séquençage des deux volets (reads), sur le nombre de gènes exprimés (expressed) et le nombre de ePAVs.

Annexe 3 - Processus bioinformatique de traitement des données RNA-seq des volets 1 et 2



Annexe 4 - Assemblage guidé Trinity-STAR

sample	tissue	raw assembly	total bp assembled
AJAX	3feu	341 287	382 Mb
AJAX	epis	329 885	354 Mb
AJAX	tige	288 368	310 Mb
ARINA	3feu	205 692	203 Mb
ARINA	epis	362 054	373 Mb
ARINA	tige	373 537	438 Mb
CEREALOR	3feu	209 924	209 Mb
CEREALOR	epis	350 777	381 Mb
CEREALOR	tige	330 445	380 Mb
COLT	3feu	275 229	264 Mb
COLT	epis	312 064	327 Mb
COLT	tige	322 559	373 Mb
DANUBIUS	3feu	343 339	405 Mb
DANUBIUS	epis	361 218	385 Mb
DANUBIUS	tige	349 607	398 Mb
GONCHA	3feu	266 205	287 Mb
GONCHA	epis	335 651	364 Mb
GONCHA	tige	250 922	260 Mb
GRANIT	3feu	327 367	390 Mb
GRANIT	epis	358 813	394 Mb
GRANIT	tige	295 902	315 Mb
MV3386	3feu	279 661	302 Mb
MV3386	epis	373 449	417 Mb
MV3386	tige	312 978	341 Mb
PETRUS	3feu	367 998	446 Mb
PETRUS	epis	403 147	448 Mb
PETRUS	tige	331 887	366 Mb
ROMA	3feu	217 222	214 Mb
ROMA	epis	422 680	494 Mb
ROMA	tige	288 848	310 Mb
SOLARIS	3feu	344 702	407 Mb
SOLARIS	epis	348 433	375 Mb
SOLARIS	tige	365 944	427 Mb
STACY	3feu	350 399	424 Mb
STACY	epis	383 251	438 Mb
STACY	tige	307 192	349 Mb

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 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

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 élités 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 élités 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 élités 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.

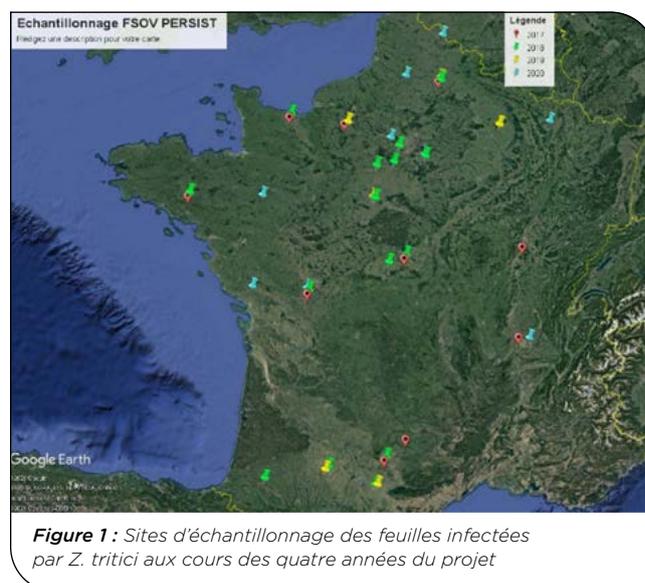
► Analyse génétique de la virulence des isolats de *Z. tritici* capables d'attaquer *Stb16q*

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.



► 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.

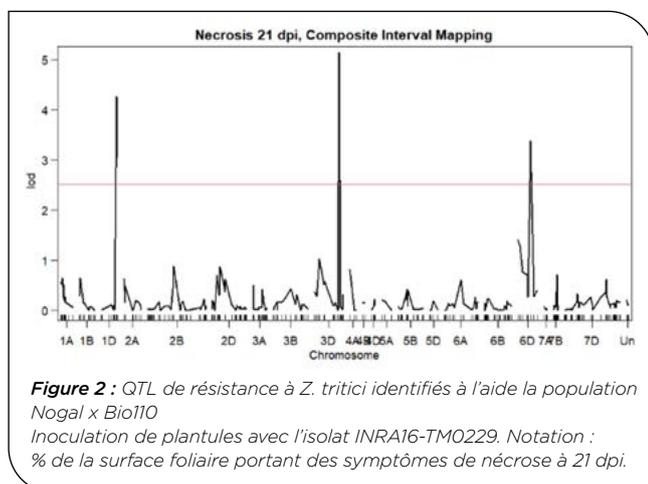
La seconde population a été phénotypée avec la souche IPO9415 prélevée en France en 2009 sur la variété Premio et la souche IPO92006 originaire du Portugal. Ces deux souches possèdent des spectres de virulence assez différents sur le groupe de variétés de blé différentielles portant les différents gènes *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 M_2 . 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 M_2 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 M_3 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 M_4 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 M_2 et M_3 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).

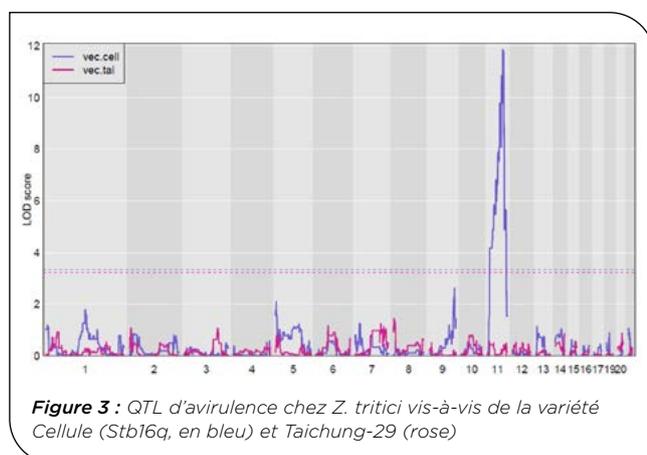


Figure 3 : QTL d'avirulence chez *Z. tritici* vis-à-vis de la variété Cellule (*Stb16q*, en bleu) et Taichung-29 (rose)

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 étayaient 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

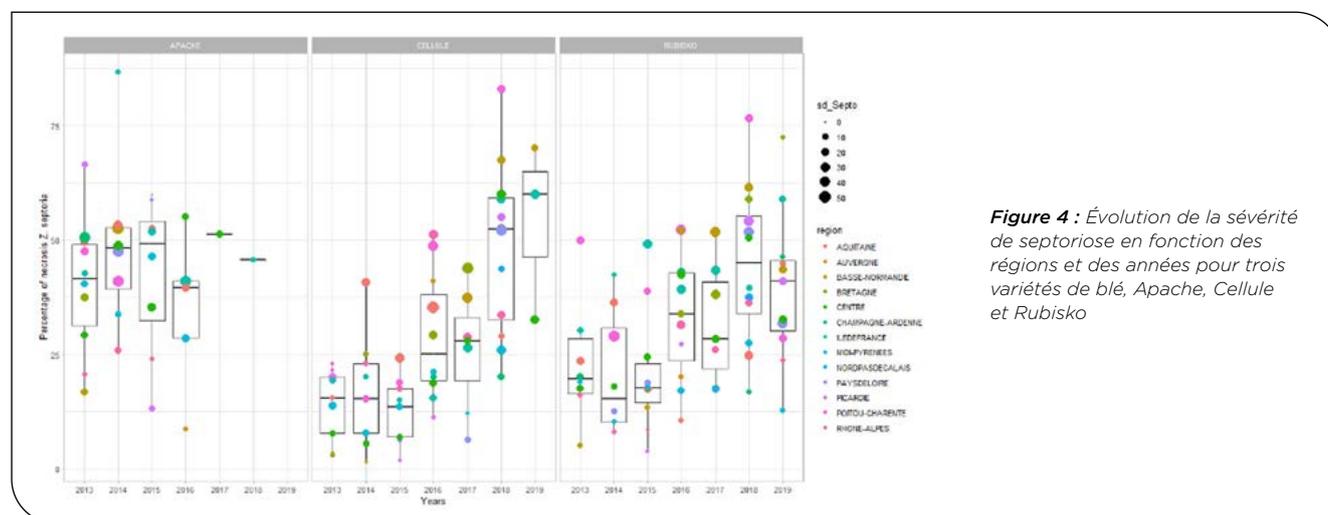


Figure 4 : Évolution de la sévérité de septoriose en fonction des régions et des années pour trois variétés de blé, Apache, Cellule et Rubisko

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 élevées 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 cals 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.

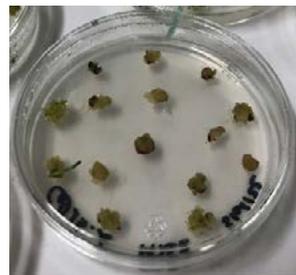


Figure 5 : Nécroses typiques des cals de la variété Cellule observées après bombardement des embryons immatures avec les 12 guides et la CAS9

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 interseasonal 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, Gaele MARLIAC¹, Florence CAMBON¹, Carolina Orellana TORREJON², Benjamin NOWAK³, Madison VAN'T KLOOSTER², Ellen 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.

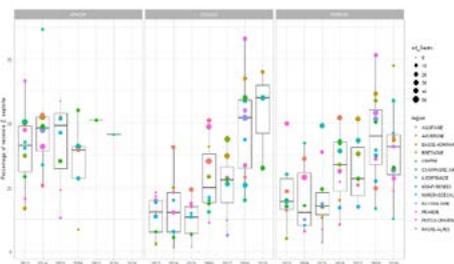


Figure 2: Evolution des sévérités de septoriose sur les variétés de blé Apache, Cellule (*Stb16q*) et Rubisko dans différentes régions de France entre 2012 et 2019

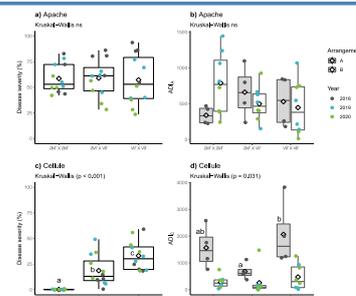


Figure 3: Impact de co-inoculation d'isolats de *Z. tritici* avirulents (avr) et/ou virulents (vir) sur le gène *Stb16q* sur la sévérité de maladies (a et c) et l'intensité de la reproduction sexuée (ADIC, b et d) sur les variétés Apache (sans *Stb16q*) et Cellule (avec *Stb16q*) sur trois années et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

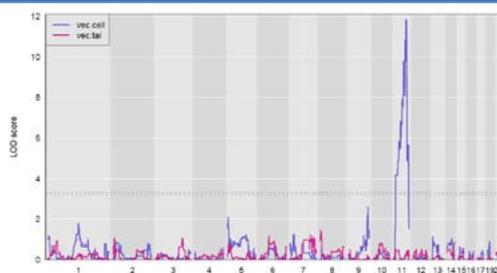


Figure 4: QTL impliqué dans la virulence *Stb16q* identifié suite au phénotypage de la variété Cellule (bleu) ou Taichung-29 (rose) avec les descendants du croisement entre l'isolat IPO323 et cfz008.

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.

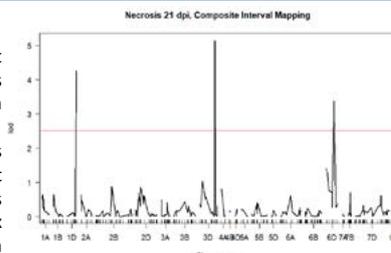


Figure 5: Un QTL sur le chromosome 1D (*Stb10*), sur le 3D (*Stb16q*) et sur le 6D (*Stb18*) ont été identifiés à partir de l'analyse de la population Nogal x Bio110.

PHENOTOL : Phénotypage variétal de la tolérance et des traits associés en céréales

Jean-Charles DESWARTE^{1*}, Marie-Odile BANCAL², Pierre BANCAL², Mélanie HEERS-MAKAROVSKY², Jérôme AUZANNEAU³, Katia BEAUCHENE⁴

1 - ARVALIS - Station de Villiers-le-Bâcle - ZA des Gravieres, Route de Châteaufort, 91190 Villiers-le-Bâcle

2 - UMR 1402 Écosys-AgroParisTech - AgroParisTech - 22 place de l'Agronomie, 91120 Palaiseau

3 - AGRI-OBTENTIONS - Chemin de la Petite Minière, 78280 Guyancourt

4 - ARVALIS - Station d'Ouzouer-le-Marché - 45 voie Romaine, Ouzouer-le-Marché, 41240 Beauce-la-Romaine

*Coordinateur : Jean-Charles DESWARTE, jc.deswarte@arvalis.fr

1 Introduction

► Impact des stress sur le rendement des céréales

Dans le contexte cultural français et européen, les stress biotiques (maladies cryptogamiques notamment) et abiotiques (stress hydrique, azoté ou thermique) peuvent pénaliser lourdement les rendements des céréales sauf intervention culturale des producteurs. Le changement climatique conduit à une augmentation des événements extrêmes de plus en plus imprévisibles aboutissant à des stress qui mettent en danger la durabilité des systèmes de production existants. Parallèlement, les enjeux économiques, environnementaux, sociétaux et réglementaires incitent à réduire l'usage d'intrants (produits phytosanitaires, fertilisants, eau d'irrigation), au risque d'amplifier les impacts négatifs des épisodes de stress sur la production quantitative et qualitative des cultures.

► Parades vis-à-vis des stress

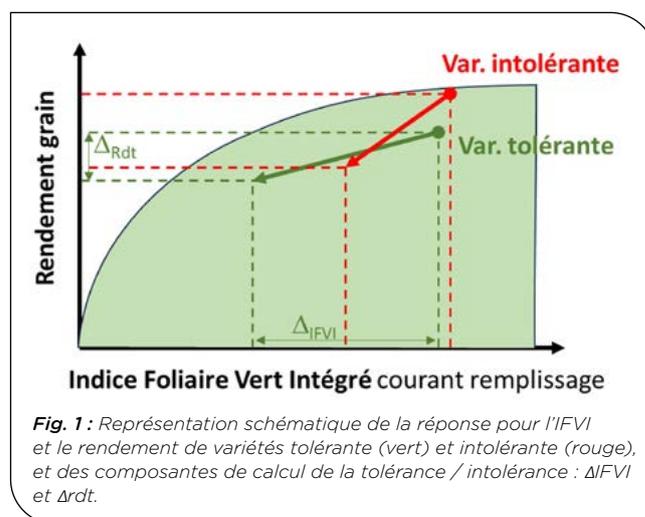
Face aux stress qui affectent les plantes, plusieurs stratégies de réponse permettent de limiter la perte de productivité. Parmi ces stratégies, on peut citer l'échappement (désynchronisation entre le facteur de stress et les périodes sensibles de la plante), la résistance (un ensemble de mécanismes qui empêche la mise en place du facteur de stress) et la tolérance (une aptitude à limiter l'impact sur la production finale malgré l'expression de symptômes).

Ces stratégies peuvent être combinables pour aboutir à des itinéraires techniques à la fois productifs et économes en intrant. Cependant, en fonction des stress envisagés, certaines stratégies sont privilégiées par rapport à d'autres : dans le cas du stress froid (céréales de printemps), les producteurs mettent en œuvre des mécanismes d'échappement, alors que la résistance est privilégiée pour les maladies foliaires, notamment pour sa facilité d'évaluation. La tolérance est particulièrement recherchée en cas de stress multiples mettant en défaut les stratégies ciblées d'échappement et de résistance. Par ailleurs, il est primordial de travailler conjointement sur ces différentes stratégies afin de s'assurer qu'elles ne soient pas antagonistes, dans le cas d'un même stress, et également entre stress.

► Définition de la tolérance

La notion de tolérance est donc liée à celle de résultat : la capacité à maintenir un niveau de production (et/ou

de qualité) élevé en présence avérée de stress (Ney *et al.*, 2013). Dans le cas des maladies foliaires des céréales à paille, Paveley *et al.* (2001) estiment la tolérance par le rapport entre perte de rendement et unité de surface symptomatique. Cette approche simplifiée, qui permet d'identifier des comportements tolérants, est généralisable à tout stress passant par une baisse de surface verte. Mais elle suppose implicitement la proportionnalité entre surface verte et rendement, alors que Gate *et al.* (2006) trouvent au contraire une relation curvilinéaire tendant vers un plateau aux fortes valeurs d'Indice Foliaire Vert Intégré (IFVI), résultant notamment de la saturation de l'interception lumineuse pour des valeurs élevées d'indice foliaire (LAI) (fig. 1).



Ainsi, il est possible de caractériser la tolérance d'un couvert à un stress selon 3 critères (Bancal *et al.*, 2022) :

- sensibilité (perte d'IFVI sous stress)
- tolérance « aspécifique », liée au rendement potentiel
- tolérance « spécifique », liée à la réponse propre à chaque culture ou variété.

La tolérance aspécifique indique que, toutes choses égales par ailleurs, un couvert à haut potentiel est plus tolérant (au sens du rendement) qu'un couvert à moindre potentiel. C'est-à-dire qu'il peut sans mécanisme particulier perdre de la surface verte sans impact sur le rendement.

Par contre, la tolérance spécifique exprime l'écart à cette tendance. Elle repose sur différents mécanismes (Ney *et al.*, 2013) dont nombre semblent valables pour

différents stress biotiques et abiotiques (Atkinson and Urwin, 2012) et apparaissent à des échelles anatomiques variables : organe atteint (compensation partielle de la photosynthèse au sein des tissus foliaires -Zuckerman *et al.*, 1997 ; Bingham *et al.*, 2009; Scholes and Rolfe, 2009-) ; plante (compensations entre organes sains et stressés tant fonctionnelles par les réserves - Gaunt and Wright, 1992; Serrago *et al.*, 2011; Bancal *et al.*, 2012- que morphogénétiques par l'émission de nouveaux organes - Pinet *et al.*, 2015-) ; couvert (répartition spatiale des symptômes sur les organes d'acquisition des ressources qui joue directement sur les pertes de croissance -Bancal *et al.*, 2007, 2008-).

La tolérance globale (spécifique + aspécifique) semble donc résulter d'une combinaison de ces très nombreux mécanismes à effets partiels faibles impliqués dans les relations sources x puits à l'échelle du couvert végétal (Parker *et al.*, 2004; Foulkes *et al.*, 2006).

► Hypothèses physiologiques derrière la tolérance

Le nombre des mécanismes impliqués, leur effet partiel faible et leur probable interaction interdisent une explication analytique en vue du pilotage de la tolérance. Une démarche corrélative par modélisation statistique a mis en évidence un lien entre l'expression de la tolérance et deux traits majeurs du blé tendre (Bancal *et al.*, 2015): la date de sénescence des parties vertes (S) et le Poids de Mille Grains (PMG). La sénescence S semble particulièrement liée aux stress de fin de cycle (pendant le remplissage) (septoriose -Bancal *et al.*, 2015, sécheresse -Christopher *et al.*, 2016-). Il est intéressant de remarquer que certains de ces traits conférant de la tolérance sont mesurables sur des cultures saines (Collin *et al.*, 2018).

► Intérêt en sélection variétale

La tolérance peut être un levier complémentaire en agriculture pour maintenir la production tout en limitant l'usage de produits phytosanitaires. Il a été démontré qu'il n'y avait pas d'antagonisme entre tolérance et potentiel de rendement (Gouache *et al.*, 2014; Van Den Bosch *et al.*, 2022). Cependant, la tolérance n'étant évaluée qu'au regard conjoint de la dynamique des surfaces vertes affectées par les symptômes et du rendement, elle ne peut être aisément prise en compte lors des processus de sélection ou même d'inscription, l'acquisition répétée des données de surface verte étant trop coûteuse en temps.

► Nécessité et limites des capteurs et du phénotypage à haut débit

Le développement de combinaisons de vecteurs et de capteurs pour la surveillance des cultures offre désormais de nombreuses opportunités de suivi des stress. Les capteurs disposent le plus souvent de canaux de mesures compatibles avec l'observation de l'état des cultures, à travers le calcul d'indices de végétation. Le recours à des couples vecteurs-capteurs doit pouvoir permettre d'évaluer en routine la dynamique de l'indice foliaire, et donc de fournir l'un des paramètres clés de la tolérance. Cependant, si un lien qualitatif entre télémétrie et indice foliaire a depuis longtemps été mis en évidence, la recherche peine à établir des prédictions quantitatives assez précises pour permettre un calcul de tolérance.

L'objectif du projet Phénotol est donc de valoriser la description du couvert permise par les outils de phénotypage à haut débit pour permettre une évaluation de la tolérance variétale sur des effectifs accrus de géotypes et d'environnements. Ceci implique de transposer des indices agronomiques issus de mesures manuelles en des combinaisons d'indices de végétation (IV) robustes, et de les acquérir en routine sur des effectifs et des dispositifs compatibles avec les besoins des sélectionneurs et des évaluateurs.

2 Matériel et méthode

Le projet a requis la mise en place d'expérimentations agronomiques au champ au cours des campagnes 2019, 2020 et 2021, conçues pour permettre un calage méthodologique en début de projet avec peu de variétés mais beaucoup de stress différents. Puis on a élargi la diversité variétale dans un cadre méthodologique moins contraignant. Chacune de ces expérimentations a été suivie avec des outils de phénotypage.

► Conduite d'essais avec environnements et variétés contrastées

Essais de calibration

Deux essais ont été conduits de telle façon à diversifier les conditions de croissance et permettre la calibration des mesures de télémétrie par des mesures de référence manuelles.

Un premier essai a été conduit à Ouzouer-le-Marché (41) sous des abris mobiles en 2018-2019 (identifiant 145482). Il regroupait 8 variétés commerciales de blé tendre, contrastées pour leur précocité à épiaison (Tab. 1), qui ont été exposées à 7 conduites culturales différentes, combinant des dynamiques de nutrition azotée, d'alimentation en eau, et une protection fongicide contre les maladies foliaires (Tab. 2).

Variété	Préc. Épiaison
Lear	4.5
Soverdo CS	5
Annecy	5.5
RGT Cyclo	6
Rebelde	7.5
Hybiza	7.5
Hydrock	7.5
Montecristo CS	8

Tab. 1 : Variétés de blé tendre d'hiver retenues pour l'essai 145482 en 2018-2019 à Ouzouer-le-Marché.

Modalité (E)	Fertilisation (N)	Irrigation	Traitement fongicide*
1	≥ X	ETM	T
2	≥ X	ETM	NT
3	X-80kg/ha ; Car. Préc.	ETM	T
4	X-80kg/ha ; Car. Tard.	ETM	T
5	≥ X	Séch. précoce sévère	T
6	≥ X	Séch tardive sévère	T
7	X-80kg/ha ; Car. Préc.	Sec tardif léger	T

Tab. 2 : Modalités environnementales mises en œuvre dans l'essai 145482. X : dose X a priori ; ETM : complémentation hydrique par irrigation pour satisfaire les besoins à l'ETM ; T/NT : traité/non traité fongicide (septoriose notamment)

Les mesures ont consisté en la détermination du rendement et de ses composantes, le suivi de la date d'épiaison, et des mesures hebdomadaires à bi-hebdomadaires de la canopée par capteurs de phénotypage haut-débit (Beauchêne *et al.*, 2019; caméras multi-spectrales (300-950nm) et RGB), des mesures manuelles d'indice foliaire repensées pour limiter au maximum l'altération des microparcelles, et de suivi non-destructif de la sénescence des limbes) (voir ci-dessous).

Un second essai conduit à Aubigny-aux-Kaisnes (02) en 2021 (identifiant 149157) s'appuyait sur 20 variétés et 3 conduites combinant la nutrition azotée (X et X-80) et la protection fongicide (avec ou sans protection contre la septoriose) : N+F+, N-F+, N+F-. Les variables mesurées étaient identiques à 2019, en ayant recours simultanément à 2 outils de phénotypage : une arche circulant à 1.5m dessus du couvert (acquisition avec caméra multispectrale), et un drone (caméra 5 canaux). Sur les essais de calibration (Id 145482 et 149157), on a déterminé, pour l'ensemble des modalités sur un seul bloc, l'Indice Foliaire Vert Intégré (IFVI) de référence par une succession de mesures manuelles et de notations visuelles : mesure d'une surface foliaire déployée (en cm²/brin), à épiaison, sur un microéchantillon représentatif du couvert, et notations non destructrices d'autre part, de densité épi permettant de passer à l'échelle du m² et de progression de la sénescence du feuillage. On obtient ainsi, avec une perturbation minimale du couvert le GLAIO (en m²/m²), et une dynamique des surfaces vertes pendant le remplissage. Les mesures par télémétrie ont sans difficulté été acquises sur la portion préservée des microparcelles (ensemble des blocs).

Essais de validation

2 essais ont été conduits en 2020 et 2021 pour permettre la validation des méthodes et proxys calculés sur les données de calibration.

L'expérimentation 2020 basée à Villers-Saint-Christophe (02)(id. 146672) s'appuyait sur 16 variétés (6 communes à 145482 et 5 communes à 149157) et 3 conduites combinant la nutrition azotée (X et X-80) et la protection fongicide (avec ou sans protection contre la septoriose) : N+F+, N-F+, N+F.

L'essai 2021 a été conduit à Orsonville (78)(id. BH-Pheno-Or), avec toutes les variétés et modalités communes à l'essai 149157. En plus de l'observation du stade épiaison, l'essai combinait mesures du rendement et phénotypage hebdomadaire par drone (voir ci-dessous), entre épiaison et maturité.

► Acquisition de données de phénotypage à haut débit, expression d'indices de végétation et estimation des composantes de l'IFVI

Les données de phénotypage haut-débit ont été pour partie acquises avec des caméras multispectrales (démarche prospective de recherche de proxy) et de caméras à 5 longueurs d'ondes (démarche de test et de validation), au plus tard à partir de l'épiaison, avec une fréquence *a minima* hebdomadaire.

Campagne	Site	Capteur/vecteur
2018-2019	Ouzouer-le-Marché (41)	Caméra multispectrale sur portique de phénotypage
2019-2020	Villers-Saint-Christophe (02)	Caméra multispectrale sur arche de phénotypage
2020-2021	Aubigny-aux-Kaisnes (02)	Caméra multispectrale sur arche de phénotypage Caméra DJI P4 (5 canaux) sur drone hexacopteur
	Orsonville (78)	Caméra Micasense (5 canaux) sur drone hexacopteur

Tab. 3 : Couples Capteurs/vecteurs de phénotypage à haut-débit utilisés dans chacune des expérimentations.

Les spectres acquis sur les parcelles par les caméras multispectrales ont été utilisés pour calculer un ensemble de 75 indices de végétation (<https://www.indexdatabase.de/>). Ceux-ci ont fait l'objet de régressions linéaires simples ou multiples pour réestimer les composantes de l'IFVI_{manuel} (GLAIO à épiaison, dynamique de sénescence), puis l'IFVI_{capteur} lui-même, en comparaison de la référence manuelle mesurée sur un bloc par essai.

Chaque camera véhiculée par drone ayant un nombre limité de bandes de mesure de réflectances, et celles-ci n'étant pas exactement en cohérence avec les longueurs requises pour le calcul d'indices de végétation dans les essais de calibration (Fig. 2), il a été nécessaire de recalculer le meilleur proxy pour chaque appareil. A partir des spécifications de réflectance de chaque capteur et des mesures de réflectance acquises avec des caméras multispectrales dans les essais de calibration, un proxy adapté à chaque drone a été redéfini, et appliqué aux essais de validation pour estimer les IFVI de chaque modalité.

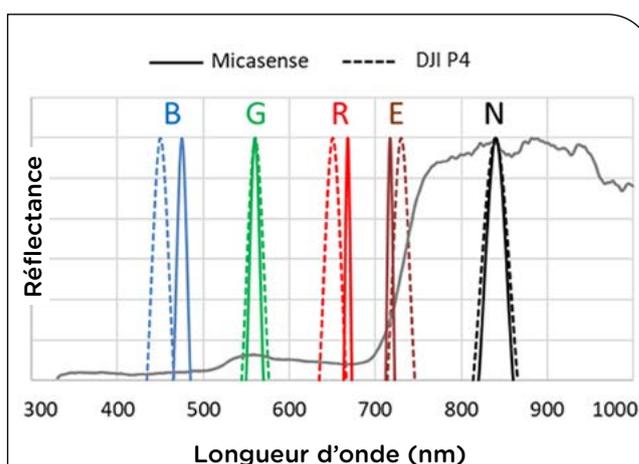


Fig. 2 : Positionnement et largeur des bandes spectrales de mesure de la réflectance pour 2 caméras utilisées pour le phénotypage haut-débit des essais Phénotol.

► Calcul d'indices d'(in)tolérance

La tolérance est définie comme le rapport entre une perte d'IFVI et celle de rendement qui en résulte. Cependant, plus une culture sera tolérante, plus sa perte de rendement sera faible ; dès lors, le calcul de

la tolérance devient délicat. On privilégie donc le calcul de l'intolérance :

$$Intolérance_i = \frac{Rendement_{témoin} - Rendement_i}{IFVI_{témoin} - IFVI_i}$$

Avec Rendement_{témoin} (respectivement IFVI_{témoin}) la valeur moyenne des répétitions du témoin non stressé, Rendement_i (respectivement IFVI_i) la valeur moyenne des répétitions de la modalité stressée d'intérêt, pour une variété considérée. Le rendement est obtenu mécaniquement (moissonneuse-batteuse) à la récolte, et l'IFVI est estimé par utilisation du phénotypage (voir ci-dessus). Si les traitements ont trop peu d'effet dans les essais ($\Delta IFVI < 5\%$), l'intolérance n'est pas calculée pour toutes les variétés testées. L'intolérance est exprimée en gMS.dj.l.m⁻², elle est d'autant plus faible que la culture est tolérante.

Afin de comparer les intolérances entre variétés et essais, elles sont normalisées essai par essai à l'aide d'un indice de tolérance normalisé (ITN) :

$$ITN_i = \frac{Intolérance_{Max\ essai} - Intolérance_i}{Intolérance_{Max\ essai} - Intolérance_{min\ essai}}$$

L'ITN (sans unité) varie donc entre un, correspondant à la valeur minimale de l'intolérance sur l'essai et zéro, sa valeur maximale. Ainsi, une valeur d'ITN_i élevée traduit une culture tolérante.

3 Résultats

► Génération de situations contrastées pour exprimer des différences de rendement et de structure de couvert

Essais de calibration

Les expérimentations 2018-2019 (Id. 145482) et 2020-2021 (149157) visaient en premier lieu à générer des conditions de culture suffisamment contrastées pour induire des pertes de rendement causées par les stress biotiques ou abiotiques, et des dynamiques d'indice foliaire variées.

L'essai 2019 d'Ouzouer-le-Marché sous Phénofield® a effectivement permis d'induire des pertes de rendement significatives (-3 à 28%) et d'exprimer des différences variétales de potentiel, sans interaction G×E. Les IFVI sont également différenciés avec des effets environnementaux et génétiques significatifs (interaction G×E non testée par manque de répétition) ; les IFVI sont issus de dynamiques différenciées de mise en place et de maintien des surfaces vertes, avec des différenciations sur le GLAI maximal (à Z55) et sur le moment de l'inflexion de la sénescence.

L'essai d'Aubigny-aux-Kaisnes a présenté des nuisibilités rendement très faibles en terme d'ampleur (nuisibilité de 5 q/ha pour la modalité N+F- ; absence d'effet sur le rendement de la modalité N-F+), malgré l'effet statistiquement significatif du facteur environnemental ($p < 0.001$). Le facteur variétal est nettement différencié ($p < 0.001$), avec 37 q/ha d'écart entre les variétés extrêmes (80.7 vs 117.9 q/ha). L'interaction G×E est nettement significative.

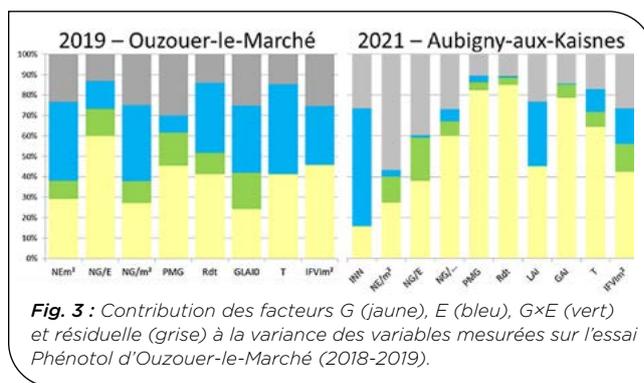


Fig. 3 : Contribution des facteurs G (jaune), E (bleu), G×E (vert) et résiduelle (grise) à la variance des variables mesurées sur l'essai Phénotol d'Ouzouer-le-Marché (2018-2019).

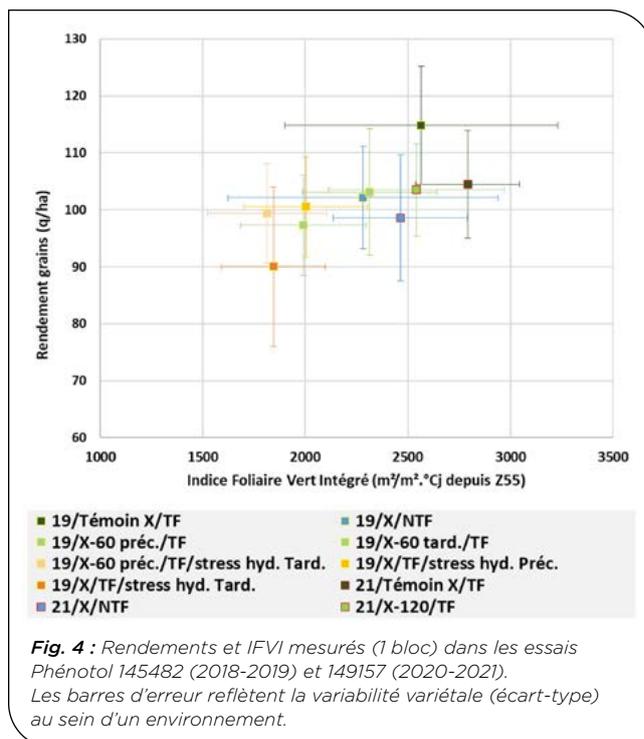


Fig. 4 : Rendements et IFVI mesurés (1 bloc) dans les essais Phénotol 145482 (2018-2019) et 149157 (2020-2021). Les barres d'erreur reflètent la variabilité variétale (écart-type) au sein d'un environnement.

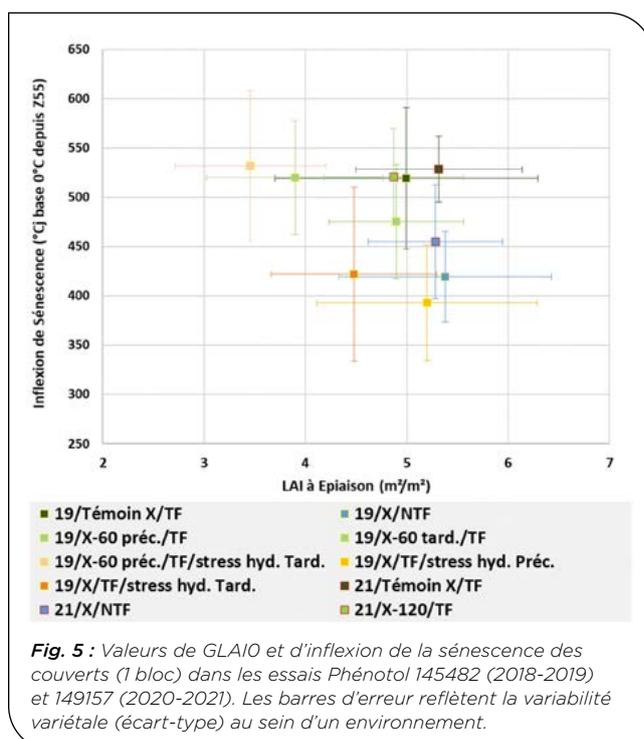


Fig. 5 : Valeurs de GLAI0 et d'inflexion de la sénescence des couverts (1 bloc) dans les essais Phénotol 145482 (2018-2019) et 149157 (2020-2021). Les barres d'erreur reflètent la variabilité variétale (écart-type) au sein d'un environnement.

Essais d'application

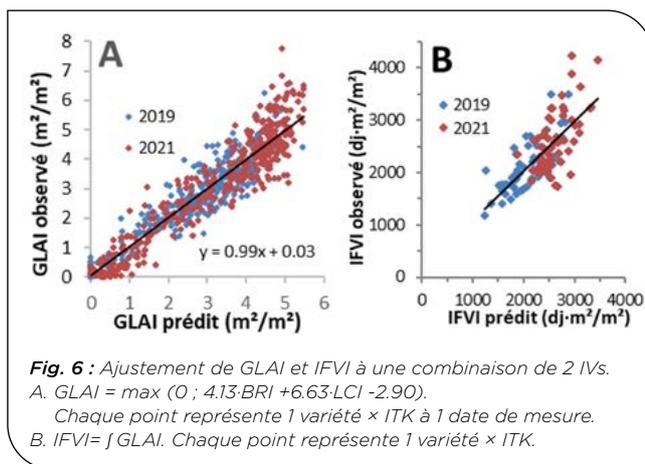
L'essai d'Orsonville (BH-Pheno-Or) a présenté des effets environnementaux très significatifs ($p < 0.001$) avec des nuisibilités de 8 et 19 q/ha respectivement pour les modalités F- et N- par rapport à la modalité N+F+ (95 q/ha en moyenne). Les variétés sont également très discriminantes ($p < 0.001$), avec des rendements moyens en modalité N+F+ s'étalant de 75 à 105 q/ha. L'interaction G×E est faiblement significative ($p = 0.06$).

L'expérimentation 2019-2020 conduite à Villers-Saint-Christophe (146672) a atteint de très hauts potentiels de rendement (témoin N+F+ à 130 q/ha en moyenne) mais s'est avérée très peu discriminante sur le rendement entre environnements ($p < 0.05$) avec moins de 2 q/ha en moyenne de nuisibilité des modalités N- et F- (très faible pression maladie, fortes fournitures d'azote du sol). L'effet variétal (16 variétés) est par contre très net ($p < 0.001$) avec une gamme de rendement s'étalant de 115 à 143 q/ha en modalité Témoin N+F+). Aucune interaction G×E n'a été détectée pour le rendement.

Calibration d'une relation $IFVI_{réf} - IFVI_{capteurs}$

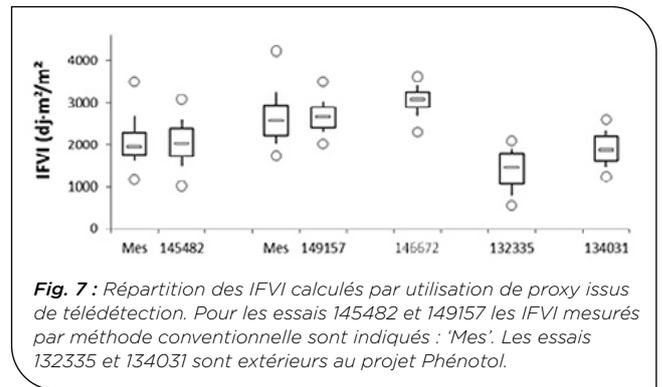
L'estimation de l'IFVI par une description dynamique de la surface foliaire verte par régression (modèles de régression testés : régression simple linéaire, simple exponentielle, multiple, multiple exponentielle) à partir d'indices de végétation connus a été réalisée. Il apparaît que GLAI corrèle assez mal à un IV unique, mais qu'une bonne linéarité peut être obtenue en combinant plusieurs IVs.

Les résultats d'identification d'un proxy du GLAI obtenus sont présentés dans la Fig. 6A. Les indices de végétation retenus sont BRI (Blue Red Pigment Index) et le LCI (Leaf Chlorophyll Index). On constate que ce proxy couvre une large gamme de GLAI, notamment les faibles GLAI impactées par la sénescence ($GLAI < 3$) ; seules les très fortes valeurs s'avèrent moins bien estimées. L'intégration du GLAI au cours du temps permet d'estimer l'IFVI. (Fig. 6B)

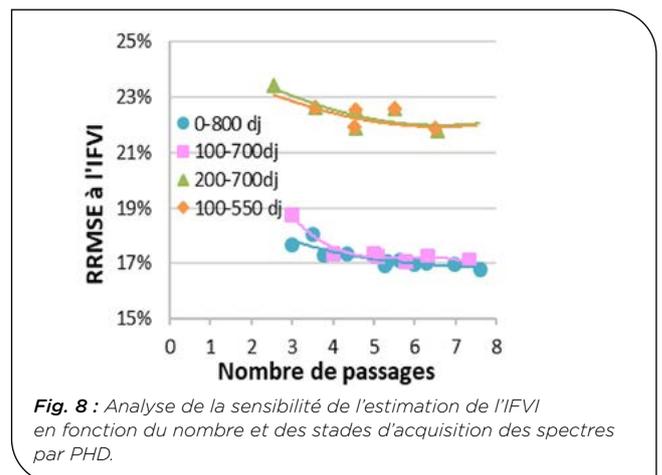


On peut noter que différentes combinaisons d'indices de végétation sont utilisables pour décrire le GLAI et l'IFVI, avec des performances comparables. Pour la suite des travaux, et l'application du proxy à différents essais suivis par des capteurs aux spécifications variées, une combinaison linéaire de 8 indices de végétation a été retenue ; l'objectif est de gagner en robustesse.

L'application de l'équation sur les essais du projet et des données externes (essais 132335, 134031) fournit des valeurs d'IFVI cohérentes avec les références existantes (Fig. 7).



Pour assurer une bonne description dynamique du développement de la sénescence et donc de l'évolution de l'IFVI, une analyse de sensibilité au nombre et à la période d'acquisitions par télémétrie a été réalisée. En effet, des acquisitions décalées dans le temps peuvent masquer le LAI maximum (autour d'épiaison-floraison), ou le maintien de la surface verte jusqu'à maturité.



Les niveaux minima de RRMSE pour l'IFVI sont atteints pour un nombre d'acquisitions supérieur à 6, étalées à minima sur la période Epiaison - Epiaison +800°C de chaque variété (Fig. 8). Réduire la fenêtre d'acquisition devient préjudiciable si le LAI maximum n'est pas capté (fenêtre 200-700°Cj) ou la sénescence mal décrite (100-550°Cj). La densité temporelle d'acquisitions semble moins impactante que leur étalement, et 4 à 5 mesures bien positionnées suffisent à estimer l'IFVI par télémétrie.

► Transposition vers des essais suivis avec des caméras à 5 canaux

Les proxys établis sur les essais d'Ouzouer-le-Marché en 2019 et Aubigny-aux-Kaisnes en 2021 ont valorisé la richesse des signaux d'une caméra multispectrale (256 canaux), et ont donc pu s'appuyer sur les indices de végétation les plus appropriés. Une adaptation du travail présenté ci-dessus est donc requise pour valoriser les outils de phénotypage s'appuyant sur un nombre restreint de canaux. Ainsi, une réestimation des meilleurs proxys (combinaisons multiples d'IVs

accessibles à partir des longueurs d'ondes mesurées par les capteurs) a été réalisée à partir de la gamme de réflectance mesurée par caméra multispectrale.

En appliquant la méthode à l'essai d'Aubigny-Aux-Kaisnes en 2021, où la référence manuelle, les acquisitions multispectrales et le survol par un drone 5 canaux ont été réalisés, il est possible de valider la cohérence de l'approche (Fig 9).

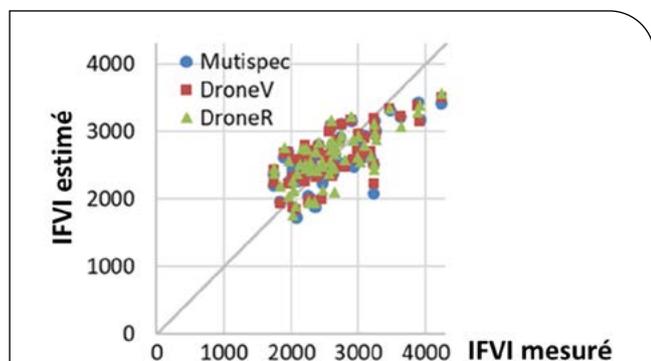


Fig. 9 : Répartition des IFVI calculés par utilisation de proxy issus de télédétection. 'Mutispec' proxy obtenu à partir des données multispectrales ; 'DroneV' proxy recalculé sur les données multispectrales pour simuler celles d'un drone ; 'DroneR' proxy obtenu directement à partir des caméras 5 canaux du drone DJI P4 d'Arvalis (essai 149157).

Ainsi, il est possible d'identifier à l'aide d'un drone virtuel et d'une base de données de terrain (observations à Aubigny-aux-Kaisnes, 2021 et Ouzouer-le-Marché, 2019) la meilleure combinaison d'IVs autorisés par les spécifications de chaque appareil pour estimer l'IFVI_{capteur}. Appliquée à l'essai d'Orsonville, où il n'y avait pas de mesures de référence, la méthode permet d'estimer le GLAI de chaque parcelle (Fig 10) et de calculer l'IFVI des différentes modalités (Fig 11).

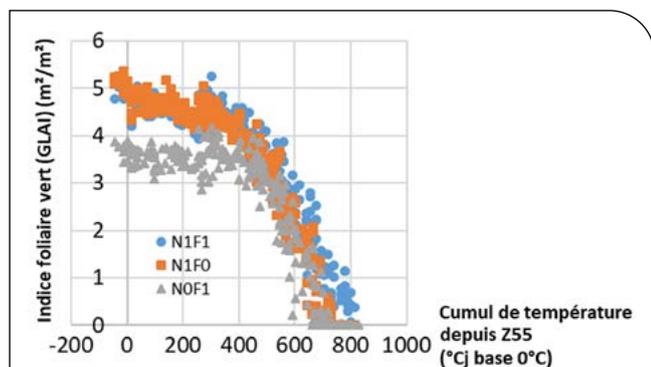


Fig. 10 : GLAI estimé par drone au cours du suivi de l'essai BH-Pheno-Or de Z55 à maturité. Les 3 modalités environnementales sont représentées par les couleurs (1 point = 1 parcelle).

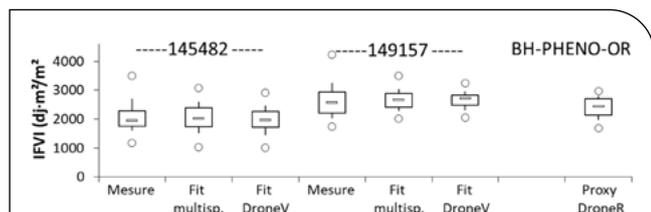


Fig. 11 : Gammes d'IFVI mesurés et calculés dans trois essais du projet Phénol. La variabilité représentée par les boxplots regroupe les facteurs environnementaux et variétaux, ainsi que de la variabilité résiduelle.

► Calculs d'indices de tolérance

On utilisera des proxys d'IFVI calculés d'après les IVs dans les essais 145482 et 149157 (où on a vérifié la validité du proxy), mais aussi 146672 et BH-PHENO-OR. Dans ces deux derniers cas, la validité du proxy n'est pas vérifiée mais paraît vraisemblable au vu de la répartition et de l'ordre de grandeur des valeurs calculées. Il est toutefois possible que les IFVI ainsi obtenus soient biaisés, ce qui jouera forcément sur la valeur d'intolérance. Par précaution, pour les comparaisons entre essais, on utilisera les valeurs d'indice de tolérance normalisé (ITN).

Variabilité inter-variétés et inter-stress de la tolérance

L'essai 145482 comprenait sept traitements et par conséquent l'ITN peut être calculé six fois par comparaison au témoin (Fig. 12).

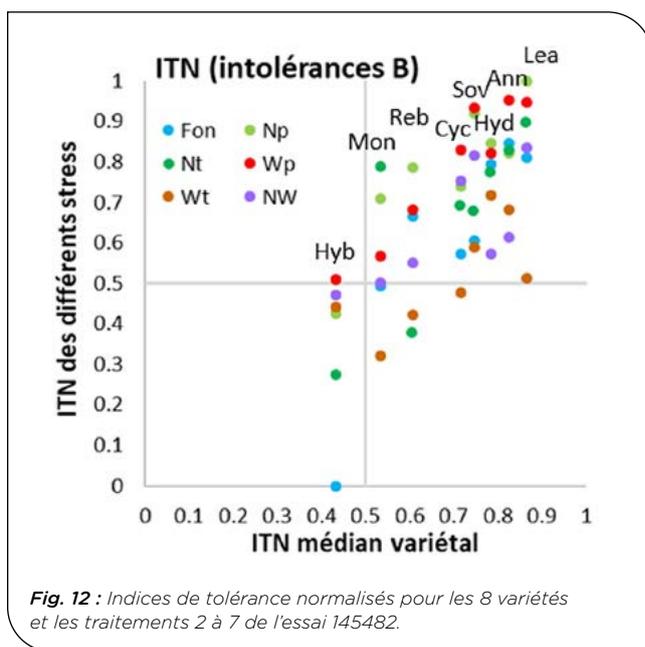


Fig. 12 : Indices de tolérance normalisés pour les 8 variétés et les traitements 2 à 7 de l'essai 145482.

L'ITN de la variété la plus tolérante, Lear, est plus fort que celui de la moins tolérante, Hybiza, pour tous les stress. Bien que nettement plus sensible (Δ_{IFVI} de 824 vs 465 g/m²/m², tous traitements confondus) Lear présente ainsi un Δ_{Rdt} moyen de 97 g/m² quand Hybiza accuse $\Delta_{Rdt} = 252$ g/m², ce qui gomme les hautes performances de cet hybride en milieu stressant. La tolérance présente donc une claire composante génétique mais aussi un certain degré de génécité inter-stress. En effet, bien que l'ITN varie selon les stress pour une même variété, cette variabilité n'est sans doute pas significative puisque l'intolérance est déterminée avec une forte variabilité (son coefficient de variation entre blocs atteint 58%, ce qui correspond à une barre d'erreur d'environ 0.3 pour l'ITN). Réciproquement, le r^2 entre ITN de deux stress atteint 0.44 en moyenne ($P = 0.07$).

Étude de la variabilité génétique

Les essais 2020 et 2021 ont exposés des listes variétales étendues à des modalités modulant la protection fongicide et la nutrition azotée. On notera cependant que si 32 variétés en tout ont été testées, seulement trois étaient présentes partout. De plus l'ITN n'est

calculable que si la nuisibilité est suffisante (plus de 5% de perte d'IFVI), ce qui exclut certaines modalités trop peu différenciées (voir plus haut). Le tableau 4 ci-dessous montre que la plupart des variétés ne sont finalement caractérisées que par une ou deux valeurs d'ITN.

Nbre d'ITN	0 ITN	1 ITN	2 ITN	3 ITN	4 ITN	Total
Sous-fertilisation	1	10	16	3	2	32
Fongicide absent	5	11	14	2	0	32

Tab. 4 : Nombre de variétés caractérisées par 0 à 4 ITN vis-à-vis du stress sous-fertilisation et du stress biotique lié à l'absence de protection fongicide.

La figure 13 permet de repérer des variétés tolérantes aux deux stress (en haut à droite) et d'autres systématiquement intolérantes (en bas à gauche). Compte tenu du grand nombre de variétés, la génécité inter-stress est significative, mais plutôt faible : le r^2 entre les deux ITN est de 0.18 ($P = 0.03$).

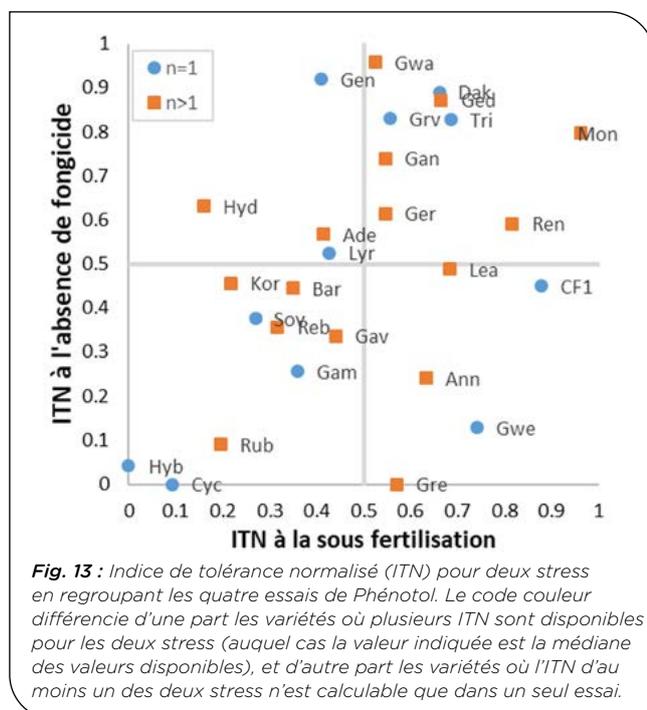


Fig. 13 : Indice de tolérance normalisé (ITN) pour deux stress en regroupant les quatre essais de Phénol. Le code couleur différencie d'une part les variétés où plusieurs ITN sont disponibles pour les deux stress (auquel cas la valeur indiquée est la médiane des valeurs disponibles), et d'autre part les variétés où l'ITN d'au moins un des deux stress n'est calculable que dans un seul essai.

Corrélation de la tolérance avec des traits variétaux

Nos travaux antérieurs avaient mis en évidence une corrélation positive entre la tolérance et deux traits du couvert mesurables en parcelle témoin : l'IFVI et le temps de sénescence des surfaces vertes (S). Dans un modèle complexe, une corrélation négative entre tolérance et Poids de Mille Grains (PMG) était suggérée. A vrai dire, ces corrélations, établies dans une très large base de données étaient faibles. Dans la base Phénol, bien plus restreinte, aucune corrélation n'est significative ni avec les traits du couvert témoin ni avec des notes de caractérisation variétale.

Cette étude mériterait d'être reprise en comparant notamment l'ITN à l'absence de fongicide avec la note de résistance au STB, ou bien l'ITN à la sous-fertilisation tardive avec la note de GPD (puisque la GPD est liée à l'absorption tardive). En effet nos travaux antérieurs avaient bien mis en évidence l'absence de corrélation

entre tolérance et rendement potentiel. Mais ils suggéraient aussi qu'une corrélation négative pourrait exister entre résistance et tolérance, non par principe mais par dérive du fait que la tolérance n'a jamais été prise en compte par les processus de sélection jusqu'ici.

	Note PMG	Note Précocité	Note STB	Note GPD	IFVI Tém	LAI Tém	S Tém
Sous-fertilisation	0.01	0.07	0.07	-0.35	-0.03	-0.09	0.10
Fongicide absent	0.33	-0.03	0.09	0.00	0.16	0.05	0.14
	9%	89%	65%	98%	43%	80%	48%

Tab. 5 : Coefficient de corrélation et probabilité d'hypothèse nulle entre ITN et notes de caractérisation variétale ou traits du couvert mesurés en parcelles témoins.

4 Discussion

► La tolérance : une forme supplémentaire d'adaptation aux stress

La tolérance constitue, en complément de la résistance et de l'échappement ou de l'évitement, une forme supplémentaire d'adaptation variétale aux stress, qu'ils soient biotiques ou abiotiques. A la différence de la résistance -qui évite l'apparition des symptômes à l'aide de différentes barrières génétiques ou physiologiques- ou de l'échappement, qui esquive une période à risque en décalant le cycle, la tolérance sous-entend que le facteur de stress entraîne effectivement une contamination ou des symptômes dans la plante, mais une décorrélation (partielle du moins) entre symptômes et conséquences finales sur le rendement. Ce mécanisme est donc peu valorisé dans la sélection variétale pour deux raisons : il ne sous-entend pas une absence de symptômes, qui est souvent recherchée pour garantir une culture saine et résiliente, et il requiert une double différence de mesures, entre un témoin sain et une situation stressée : une mesure de rendement, et une quantification des symptômes.

La tolérance -ou plus exactement l'intolérance- travaillée dans le projet Phénol cible plus particulièrement des symptômes foliaires tels qu'ils s'expriment avec une contamination de septoriose, ou un stress azoté ou hydrique, à savoir une perte de surface verte ; elle requiert donc une quantification objective des dégradations foliaires, intégrées dans le temps (Indice Foliaire Vert Intégré), et si possible avec une méthode aisée et à haut débit.

On a pu observer des différences variétales significatives dans les essais mis en place (fig. 12 et 13), différences non explicables par la précocité ou la résistance à la septoriose. La tolérance semble donc bien être complémentaire aux autres stratégies d'adaptation aux stress.

► Estimer la tolérance : des dispositifs exigeants

Les dispositifs mis en place dans le projet Phénol ont tenté d'induire des niveaux et des séquences de stress différenciés (en nature, intensité et période d'expression), en comparaison locale avec un témoin de référence, peu ou pas stressé. Plusieurs situations n'ont cependant pas donné satisfaction compte-tenu de la faible intensité

des symptômes et des pertes de rendement. En effet, le calcul de l'intolérance nécessitant de calculer le ratio entre une différence de rendements et une différence de perte de surface verte, il est nécessaire que l'impact des facteurs environnementaux aient des effets nettement supérieurs à l'incertitude méthodologique ou la variabilité spatiale. Ainsi, nous avons fixé arbitrairement la nécessité d'observer au moins 5% d'écart d'IFVI entre modalités comparées, et un impact rendement minimal de 5 q/ha semble également souhaitable. Dans nos expérimentations, certaines intolérances n'ont pu être calculées faute d'expression suffisante des carences minérales ou de contamination par un pathogène.

Outre la nécessité de pouvoir générer sur un même site des modalités contrastées à comparer (facteurs Maladie, Nutrition Azotée ou Alimentation Hydrique), il est nécessaire de pouvoir mesurer finement la perte de surface foliaire verte au cours du temps ; le Phénotypage Haut Débit par capteur, véhiculé quelques mètres au-dessus de la canopée, présente à ce titre une promesse de mesure rapide, objective et répétable, indispensable pour estimer un IFVI sur de grands effectifs et de manière répétable.

► Estimation de l'IFVI par capteur

Nos travaux ont permis de valoriser les outils de phénotypage à haut débit disponibles sur les parcelles ; cependant, la valorisation des sorties de capteurs n'est pas directe.

En premier lieu, il est important de rappeler que la quantification de référence de l'IFVI (surface foliaire par unité de surface, intégrée dans le temps) ne peut être effectivement mesurée par un IV mesuré par capteur : celui-ci intègrera systématiquement les autres organes verts du couvert : les épis et les tiges.

Ensuite, aucun indice de végétation (IV) ne permet, seul, de quantifier précisément l'indice foliaire maximal autour d'épiaison/floraison ou son évolution dans le temps. Un ensemble d'indices de végétation précédemment référencés ont été testés, et une combinaison linéaire de 8 d'entre eux a finalement été retenue comme proxy robuste pour le GLAI₀. Cependant, ce proxy étalonné sur les essais Phénotol, n'a pas pu faire l'objet d'une validation externe indépendante faute de jeux de données adaptés. Il est possible que les conditions de croissance des cultures (ratio feuilles/tiges, glaucescence des tissus, conditions d'éclairement) affecte la qualité d'estimation de l'IFVI dans d'autres expérimentations.

Par ailleurs, la nécessité de s'appuyer sur plusieurs indices de végétation, de manière répétée dans le temps requiert une mise en œuvre rigoureuse de l'étalonnage des capteurs, à chaque acquisition : les conditions d'éclairement peuvent en effet impacter les mesures. Chaque capteur requiert son étalonnage propre pour estimer l'IFVI_{capteur} ; ainsi, si plusieurs appareils sont utilisés sans précaution pour monitorer un réseau, toute la procédure peut être invalidée.

► Spécificités des caméras embarquées sur drones, et impacts sur les indices de végétation.

La comparaison de différents capteurs (caméra multispectrale, caméras 5 canaux) a mis en évidence la complexité de chercher à utiliser les mêmes indices de végétation (et donc les mêmes approximations de variables biologiques). En effet, chaque capteur peut

potentiellement avoir des spécificités propres, et en particulier des plages de mesure des longueurs d'ondes différentes. Il a ainsi pu être constaté que les deux caméras véhiculées par drone utilisées par le projet Phenotol n'exploraient pas les mêmes longueurs d'onde (Fig. 2).

Ainsi, pour certains canaux, les mesures des deux capteurs peuvent diverger fortement (Fig. 14). En fonction des longueurs d'ondes utilisées, l'impact sur les indices de végétation peut être très variable : ainsi, le NDVI apparaît très stable (même si peu sensible pour les couverts très denses), et donc assez comparable entre capteurs, à l'opposé du CCCi (Fig. 15). La méthode mise au point pour l'apprentissage des drones 'virtuels' est généralisable, et permet de diagnostiquer et de lever ce problème.

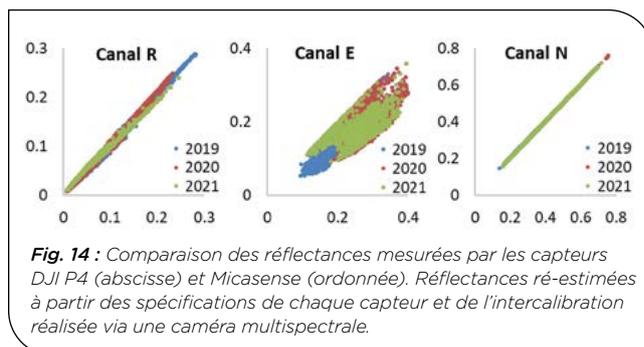


Fig. 14 : Comparaison des réflectances mesurées par les capteurs DJI P4 (abscisse) et Micasense (ordonnée). Réflectances ré-estimées à partir des spécifications de chaque capteur et de l'intercalibration réalisée via une caméra multispectrale.

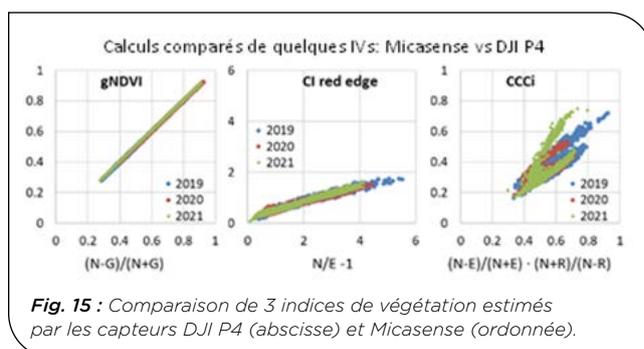


Fig. 15 : Comparaison de 3 indices de végétation estimés par les capteurs DJI P4 (abscisse) et Micasense (ordonnée).

► Dépasser les IVs : estimer le GLAIO, la sénescence ou le fIPAR à l'aide d'une représentation architecturée du couvert ?

Le concept d'IFVI tel que présenté en méthode de référence dans ce travail repose sur une mesure manuelle de l'indice foliaire et de la sénescence, ainsi qu'une mesure mécanique du rendement. A travers l'IFVI, on cherche donc à approximer le potentiel de photosynthèse et donc de croissance du couvert post-floraison. Cependant, outre des limitations expérimentales liées à l'échantillonnage, l'IFVI utilisé ici et le référentiel historique de relation IFVI-Rendement présentent des limites physiologiques. En effet, la photosynthèse n'est pas uniquement réalisée par les feuilles, mais également et de manière substantielle par les gaines et les épis ; de plus la structure du couvert et notamment le port foliaire peut modifier significativement le lien entre l'indice foliaire et l'interception lumineuse. Ainsi, le recours à des capteurs qui décrivent l'ensemble des organes photosynthétiques peut permettre de consolider la méthode de référence.

De plus, l'expression de l'IFVI par une durée thermique de la surface foliaire ne permet pas intrinsèquement d'intégrer des différences marquées de rayonnement incident ou intercepté, moteur de la photosynthèse.

Ainsi, la courbe-enveloppe historique dressée à l'aide de nombreuses données a pu être mise en défaut en 2020 avec l'atteinte de très hauts rendements, vraisemblablement atteints par des rayonnements très élevés (+10%) et un quotient photothermique favorable. Ainsi, l'approche conceptuelle de la tolérance pourrait être consolidée en exprimant un différentiel de rendement par rapport à un différentiel de rayonnement intercepté (fiPAR). Cette variable intégrant la densité du couvert, sa structure et sa dynamique ne peut être approchée par le seul usage des indices de végétation, tels qu'utilisés ici. Le recours à des interprétations plus poussées, architecturées, d'outils de phénotypage à haut débit, permettrait donc à terme d'aboutir une estimation plus intégrative de la dynamique de la canopée et donc de l'estimation de la tolérance.

► Généricité de la tolérance

Une hypothèse initiale du projet portait sur la généricité inter-stress de la tolérance. Sur la base de l'essai 145482 qui a permis d'étudier 7 environnements différents, la tolérance variétale semble bien s'exprimer de manière cohérente pour divers stress (abiotiques et biotique) (fig 12 et 13). Le mécanisme physiologique derrière cette généricité n'a pas pu être exploré ; on peut émettre l'hypothèse que les équilibres entre les sources et puits sont en jeu, permettant le maintien de la croissance et du fonctionnement des puits malgré une défaillance des sources. Cette hypothèse d'équilibre source/puits pourrait par ailleurs être explorée au cours du cycle de la culture, en fonction des différents puits en cours de formation (épi pendant la montaison, grain courant remplissage).

Références bibliographiques

- Atkinson, N. J., and Urwin, P. E.** (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J. Exp. Bot.* 63, 3523–3543. doi: 10.1093/jxb/ers100
- Bancal, M.-O., Hansart, A., Sache, I., and Bancal, P.** (2012). Modelling fungal sink competitiveness with grains for assimilates in wheat infected by a biotrophic pathogen. *Ann. Bot.* 110, 113–123. doi: 10.1093/aob/mcs094
- Bancal, M.-O., Robert, C., and Ney, B.** (2007). Modelling Wheat Growth and Yield Losses from Late Epidemics of Foliar Diseases using Loss of Green Leaf Area per Layer and Pre-anthesis Reserves. *Ann. Bot.* 100, 777–789. doi: 10.1093/aob/mcm163
- Bancal, M.-O., Roche, R., and Bancal, P.** (2008). Late Foliar Diseases in Wheat Crops Decrease Nitrogen Yield Through N Uptake Rather than Through Variations in N Remobilization. *Ann. Bot.* 102, 579–590. doi: 10.1093/aob/mcn124
- Bancal, M. O., Collin, F., Gate, P., Gouache, D., and Bancal, P.** (2022). Towards a global characterization of winter wheat cultivars behavior in response to stressful environments during grain-filling. *Eur. J. Agron.* 133, 126421. doi: 10.1016/j.eja.2021.126421
- Bancal, P., Bancal, M. O., Collin, F., and Gouache, D.** (2015). Identifying traits leading to tolerance of wheat to *Septoria tritici blotch*. *Field Crops Res.* 180, 176–185. doi: 10.1016/j.fcr.2015.05.006
- Beauchêne, K., Leroy, F., Fournier, A., Huet, C., Bonnefoy, M., Lorgeou, J., et al.** (2019). Management and Characterization of Abiotic Stress via PhenoField®, a High-Throughput Field Phenotyping Platform. *Front. Plant Sci.* 10, 904. doi: 10.3389/fpls.2019.00904
- Bingham, I. J., Walters, D. R., Foulkes, M. J., and Paveley, N. D.** (2009). Crop traits and the tolerance of wheat and barley to foliar disease. *Ann. Appl. Biol.* 154, 159–173. doi: 10.1111/j.1744-7348.2008.00291.x
- Christopher, J. T., Christopher, M. J., Borrell, A. K., Fletcher, S., and Chenu, K.** (2016). Stay-green traits to improve wheat adaptation in well-watered and water-limited environments. *J. Exp. Bot.* 67, 5159–5172. doi: 10.1093/jxb/erw276
- Collin, F., Bancal, P., Spink, J., Appelgren, P. K., Smith, J., Paveley, N. D., et al.** (2018). Wheat lines exhibiting variation in tolerance of *Septoria tritici blotch* differentiated by grain source limitation. *Field Crops Res.* 217, 1–10. doi: 10.1016/j.fcr.2017.11.022
- Foulkes, M. J., Paveley, N. D., Worland, A., Welham, S. J., Thomas, J., and Snape, J. W.** (2006). Major Genetic Changes in Wheat with Potential to Affect Disease Tolerance. *Phytopathology*® 96, 680–688. doi: 10.1094/PHYTO-96-0680
- Gate, P., Gouache, D., Robert, C., Bancal, M. O., Lannou, C., and Ney, B.** (2006). What plant variable to account for loss due to septoria leaf blotch in winter wheat?, (Tours, France: AFPP).
- Gaunt, R. E., and Wright, A. C.** (1992). Disease-yield relationship in barley. II. Contribution of stored stem reserves to grain filling. *Plant Pathol.* 41, 688–701. doi: 10.1111/j.1365-3059.1992.tb02552.x
- Gouache, D., Bancal, M. O., Bancal, P., De Solan, B., and Gate, P.** (2014). Tolérance du blé tendre aux stress biotiques et abiotiques. *Innov. Agron.*, 75–87.
- Ney, B., Bancal, M. O., Bancal, P., Bingham, I. J., Foulkes, J., Gouache, D., et al.** (2013). Crop architecture and crop tolerance to fungal diseases and insect herbivory. Mechanisms to limit crop losses. *Eur. J. Plant Pathol.* 135, 561–580. doi: 10.1007/s10658-012-0125-z
- Parker, S. R., Welham, S., Paveley, N. D., Foulkes, J., and Scott, R. K.** (2004). Tolerance of septoria leaf blotch in winter wheat. *Plant Pathol.* 53, 1–10. doi: 10.1111/j.1365-3059.2004.00951.x
- Paveley, N. D., Sylvester-Bradley, R., Scott, R. K., Craigon, J., and Day, W.** (2001). Steps in Predicting the Relationship of Yield on Fungicide Dose. *Phytopathology*® 91, 708–716. doi: 10.1094/PHYTO.2001.91.7.708
- Scholes, J. D., and Rolfe, S. A.** (2009). Chlorophyll fluorescence imaging as tool for understanding the impact of fungal diseases on plant performance: a phenomics perspective. *Funct. Plant Biol.* 36, 880. doi: 10.1071/FP09145
- Serrago, R. A., Carretero, R., Bancal, M. O., and Miralles, D. J.** (2011). Grain weight response to foliar diseases control in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Res.* 120, 352–359. doi: 10.1016/j.fcr.2010.11.004
- Van Den Bosch, F., Smith, J., Wright, P., Milne, A., Van Den Berg, F., Kock-Appelgren, P., et al.** (2022). Maximizing realized yield by breeding for disease tolerance: A case study for *Septoria tritici blotch*. *Plant Pathol.* 71, 535–543. doi: 10.1111/ppa.13509
- Zuckerman, E., Eshel, A., and Eyal, Z.** (1997). Physiological Aspects Related to Tolerance of Spring Wheat Cultivars to *Septoria tritici blotch*. *Phytopathology*® 87, 60–65. doi: 10.1094/PHYTO.1997.87.1.60

PHENOTOL : Phénotypage variétal de la tolérance et des traits associés en céréales

Jean-Charles DESWARTE^{1*}, Marie-Odile BANCAL², Pierre BANCAL², Mélanie HEERS-MAKAROVSKY², Jérôme AUZANNEAU³, Katia BEAUCHENE⁴

1 - ARVALIS - Station de Villiers-le-Bâcle - ZA des Gravieres, Route de Châteaufort, 91190 Villiers-le-Bâcle
 2 - UMR 1402 Écosys-AgroParisTech - AgroParisTech - 22 place de l'Agronomie, 91120 Palaiseau

3 - AGRI-OBTENTIONS - Chemin de la Petite Minière, 78280 Guyancourt
 4 - ARVALIS - Station d'Ouzouer-le-Marché - 45 voie Romaine, Ouzouer-le-Marché, 41240 Beauce-la-Romaine

*Coordinateur : Jean-Charles DESWARTE, jc.deswarte@arvalis.fr

Résumé

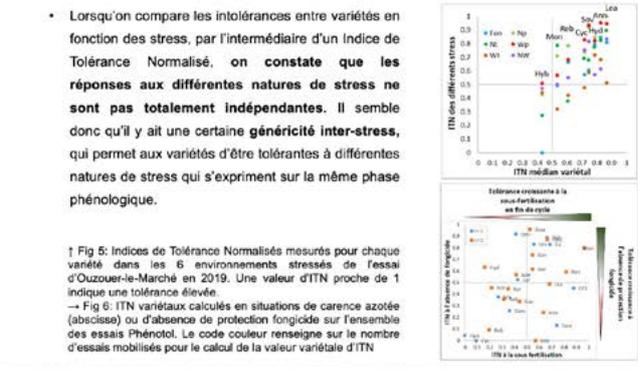
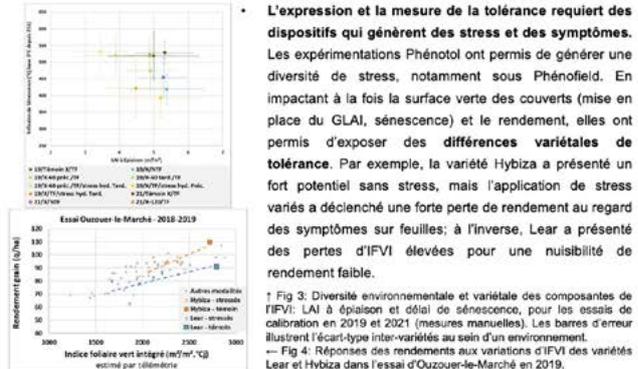
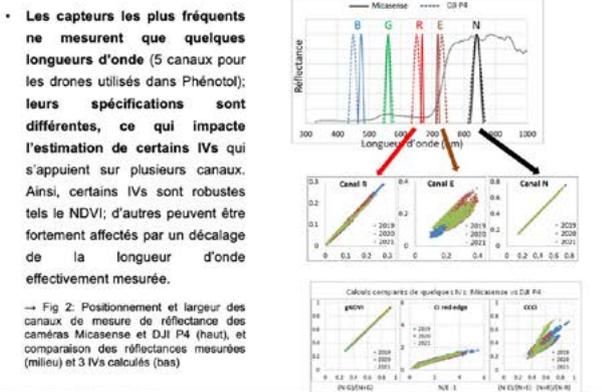
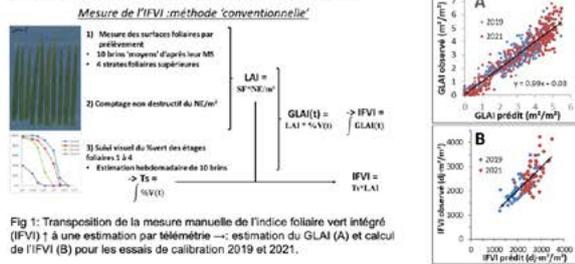
- L'intolérance (inverse de la tolérance) est définie comme le ratio d'une perte de rendement relativement à une perte de surface foliaire. Elle constitue une forme d'adaptation et de réponse aux stress, complémentaire à la résistance et à l'échappement/évitement.
- La mesure de l'intolérance requiert l'évaluation de la perte de surface verte (IFVI) des couverts, idéalement à l'aide d'outils de phénotypage à haut-débit, sur des plateformes permettant l'expression des stress d'intrêtet.
- L'estimation de l'IFVI par des Indices de Végétation (IV) a été calibrée sur des essais (2019 à 2021) avec mesures de référence au champ; seules des combinaisons multiples d'IVs permettent de retranscrire les IFVI. En fonction des spécifications des capteurs, les mesures d'IV peuvent être altérées; ainsi, l'estimation des IFVI par télémétrie dans un réseau d'essais nécessite des précautions de mise en œuvre.
- Les variétés testées ont montré des différences de tolérance vis-à-vis des stress; cette tolérance semble d'ailleurs présenter une part de généralité: la tolérance vis-à-vis d'un stress donné peut également se manifester vis-à-vis d'un autre.
- Les mécanismes sous-jacents ne sont pas élucidés. L'équilibre entre les sources et les puits pourrait être en jeu et expliquer pour partie la généralité de la tolérance pour une phase donnée du cycle.

Matériel - méthodes

- 2 essais de calibration (mesures de référence manuelles et caméras multispectrales) croisant génotypes (6 à 20 variétés) et conditions de croissance a priori contrastées (3 à 7 environnements, impliquant la fertilisation azotée et/ou l'alimentation hydrique et/ou la protection fongicide) ont été conduits en 2018-2019 (Ouzouer-le-Marché -41) et 2020-2021 (Aubigny-aux-Kaisnes -02). Ils ont permis de relier des mesures de télémétrie à des critères anatomiques.
- 2 essais supplémentaires (Villers-Saint-Christophe -02-, 2019-2020 et Orsonville -78-, 2020-2021) ainsi que des essais externes au projet ont été utilisés pour valider les proxys: des drones avec caméras à 5 capteurs ont été mobilisés.
- Une bibliothèque de 75 IVs a été utilisée pour décrire les caractéristiques du couvert: GLAI₀ et dynamique de sénescence. Des modèles de combinaison linéaires IV ont été construits et évalués selon leur RRMSE (évaluation par essai et globale inter-essai).
- Pour comparer et corriger les mesures de réflectances et les calculs d'IVs de capteurs aux spécifications hétérogènes, une démarche de « drone virtuel » a été développée à partir d'une caméra de référence multispectrale.
- Les intolérances des variétés ont été calculées en écart à la modalité environnementale témoin, pour les situations où les différences d'IFVI étaient supérieures à 5%. Pour comparer les variétés et les essais, des Indices de Tolérance Normalisés sont calculés.

Résultats

- Un proxy du GLAI entre épaisseur et maturité a été élaboré à partir de mesures de référence et de 75 IVs mesurés par télémétrie. Les meilleurs proxys développés permettent d'estimer l'IFVI sans mesure destructive pour les 2 essais utilisés. Une validation externe est néanmoins requise pour asseoir sa validité.



Conclusions

- La tolérance variétale, exprimée comme une réduction de la nuisibilité Rendement d'un stress affectant la surface verte, a pu être redémontrée au cours du projet Phénolol.
- Elle est indépendante, et donc cumulable, aux stratégies de résistance ou d'échappement aux autres stress; à ce titre, elle peut contribuer à des cultures plus résilientes. Elle semble également générique à différents stress.
- Son expression et sa mesure restent délicates: elles requièrent des conditions de croissance nettement différenciées, et une mesure dynamique de l'impact des stress sur l'état de la canopée.
- Le projet Phénolol a permis de tester la mise en œuvre du phénotypage à haut-débit pour assurer ce suivi de canopée. Il a mis en lumière la faisabilité théorique de l'estimation de l'IFVI à l'aide d'IVs multiples, mais il a également mis en évidence la sensibilité de mise en œuvre de ces outils et d'interprétation de leurs sorties.

Financé par:



ExIGE : Évaluation multi-environnementale de blé tendre « exotique » - prédictions génomiques GxE et génétique d'association

Justin BLANCON¹, Jonathan KITT¹, Pauline LASSERRE-ZUBER¹, David ALVAREZ¹, Sibille PERROCHON¹, Jean-Noël THAUVIN², Celine DUQUE³, Sylvie DUTRIEZ⁴, Pascal GIRAUDEAU⁵, Ellen GOUDEMANT-DUGUE⁶, Emmanuel HEUMEZ⁷, Christophe MICHELET², Patrice SENELLART⁸, Alexis OGER⁹, François BALFOURIER¹, Catherine RAVEL¹, Sophie BOUCHET^{1*}

1 - INRAE - Université Clermont-Auvergne, UMR 1095, GDEC, 5 chemin de Beaulieu 63100 Clermont-Ferrand, FRANCE

2 - RAGT, Rue Emile Singla, BP 3331 12033 Rodez Cedex 9, FRANCE

3 - Limagrain Europe, Centre de recherche de Chappes, 63720 Chappes, FRANCE

4 - Lidea Seeds, avenue Gaston Phoebus, 64230 Lescar, FRANCE

5 - Secobra Recherches, Centre de Bois-Henry, 78580 Maule, FRANCE

6 - FLORIMOND DESPREZ VEUVE & FILS, 59242 Cappelle-en-Pévèle, FRANCE

7 - INRAE - UE GCIE, 2 chaussée Brunehaut, Estrées Mons, BP50136, 80203 Peronne Cedex, FRANCE

8 - KWS MOMONT SAS, 7 Rue de Martinval, 59246 Mons-en-Pévèle, FRANCE

9 - Syngenta France SA, 1228 Chemin de l'Hobit, 31790 Saint-Sauveur, FRANCE

*Coordinateur : Sophie BOUCHET, sophie.bouchet@inrae.fr

I. Prédictions génomiques du rendement avec des modèles intégrant les interactions GxE

1 Introduction

Alors que la compétition pour les terres arables s'accroît, le rendement des principales céréales (blé, maïs, riz) stagne en Europe et dans près de 40 % des surfaces allouées à ces cultures (Ray *et al.* 2012). Parallèlement, l'urgence écologique et climatique conduit à de nouvelles pratiques à faibles niveaux d'intrants, qui diminuent le potentiel de rendement et la standardisation des conditions de cultures. Dans le contexte de croissance démographique et d'instabilité géopolitique actuelle, il est cependant nécessaire d'augmenter la production alimentaire. La sélection de variétés adaptées à ces nouvelles conditions environnementales pourrait donc être un levier efficace pour relever ce défi (Parent *et al.* 2018; Asseng *et al.* 2019; Dias *et al.* 2022).

L'efficacité de la sélection dépend fondamentalement de la diversité disponible (Cobb *et al.* 2019). Cependant, la diversité génétique dans le matériel moderne est limitée (Reif *et al.* 2005; Gerke *et al.* 2015) et il est donc nécessaire d'élargir la base génétique en sélection (McCouch *et al.* 2013). Cependant les ressources génétiques sont peu valorisées en sélection (Glaszmann *et al.* 2010; Wang *et al.* 2017) car il est difficile d'évaluer ce genre de matériel exotique peu adapté (Longin and Reif 2014). De plus, la multiplicité des conditions environnementales constitue un second frein à la sélection, car les génotypes les plus performants dans un environnement ne sont souvent pas les plus performants dans un autre. En effet, l'importance des interactions GxE (génotype-environnement) pour le rendement entraîne un reclassement des génotypes lorsque les conditions environnementales varient. Pour y faire face, les sélectionneurs phénotypent à plusieurs reprises les mêmes génotypes dans des réseaux d'essais multi-environnementaux afin d'estimer une performance globale pour chaque individu. Cependant, cette approche est limitée par des contraintes économiques

et techniques (quantité de semences) et l'évaluation de tous les génotypes dans tous les environnements est impossible.

La sélection génomique peut permettre de lever ce verrou en prédisant la performance d'individus sans avoir besoin de les phénotyper, à partir de leur profil génotypique. En effet, en calibrant un modèle de prédiction génomique grâce à une population d'entraînement, il est possible d'évaluer la valeur d'un individu issu d'une population de sélection rapidement et à moindre coût par rapport à une évaluation au champ. La sélection génomique permet donc d'augmenter le gain génétique par unité de temps et de coût (Bhat *et al.* 2016). Cependant, plutôt que d'estimer une valeur génétique globale, il serait plus efficace d'identifier les individus les plus performants dans chaque environnement. Pour cela, il faut identifier la base génétique et environnementale des interactions GxE pour pouvoir les prédire.

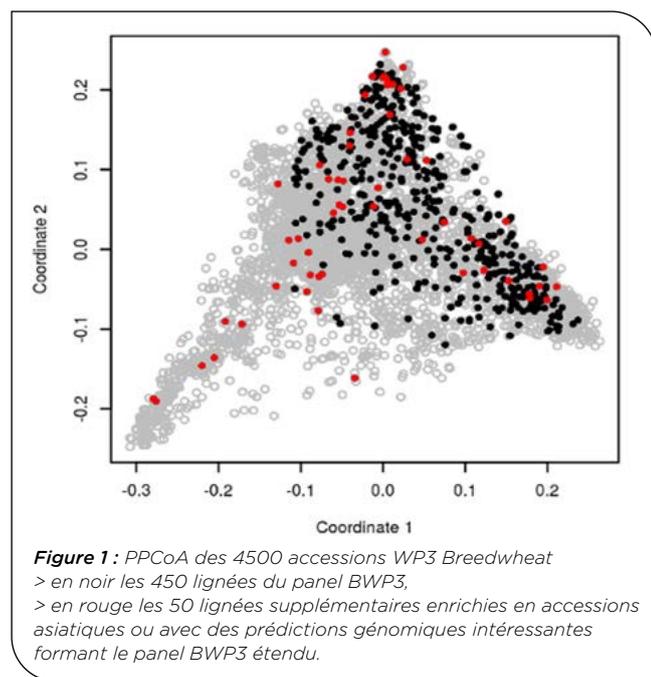
Dans cet objectif, il est nécessaire de disposer de données de génotypage et de phénotypage, mais aussi de descripteurs fins des conditions environnementales. Mais aujourd'hui, alors qu'il est facile et bon marché de génotyper des centaines de génotypes à haut-débit (Elshire *et al.* 2011), et que de nombreuses plateformes et outils de phénotypage haut débit voient le jour, la caractérisation des environnements de sélection reste rare et superficielle. Il est donc crucial d'envirotyper finement les essais de sélection. La caractérisation des conditions pédoclimatiques constitue notamment une source d'information majeure permettant d'expliquer une partie des interactions GxE (Li *et al.* 2018, 2021; Rincent *et al.* 2019; Guo *et al.* 2020; Piepho and Blancon 2023). Les modèles écophysio-logiques permettent quant à eux d'intégrer l'impact de l'ensemble des conditions environnementales mesurées sur les processus physiologiques à la base de la construction du rendement, et génèrent des indicateurs écophysio-logiques particulièrement pertinents pour prédire les interactions GxE (Ly *et al.* 2017).

Le projet ExIGE s'appuiera sur des données génotypiques et phénotypiques recueillies sur un panel de diversité large chez le blé tendre d'hiver au cours du Projet Investissement d'Avenir BreedWheat et complètera ce jeu de données grâce à 12 nouveaux essais. Les objectifs de ce projet pour la prédiction du rendement sont de i) Décrire les conditions environnementales à l'échelle du réseau d'essais ii) Calibrer un modèle original de prédiction génomique qui intègre les interactions GxE, iii) Evaluer les performances de ce modèle dans différents scénarios de prédiction, notamment pour de nouveaux génotypes dans de nouveaux environnements.

2 Matériel et méthode

► Matériel végétal

Les panels étudiés dans le projet ExIGE, nommés BWP3 et BWP3ext, sont constitués de 450 (485) accessions de blé tendre d'hiver de type landraces ou cultivars anciens, mais aussi de variétés modernes (inscription jusqu'en 2004). Ces accessions ont été choisies au sein du centre de ressources biologique « Céréales à pailles » d'INRAE Clermont-Ferrand pour être représentatives de la diversité mondiale (Fig. 1), avec une précocité, une hauteur et une qualité de multiplication adaptées.

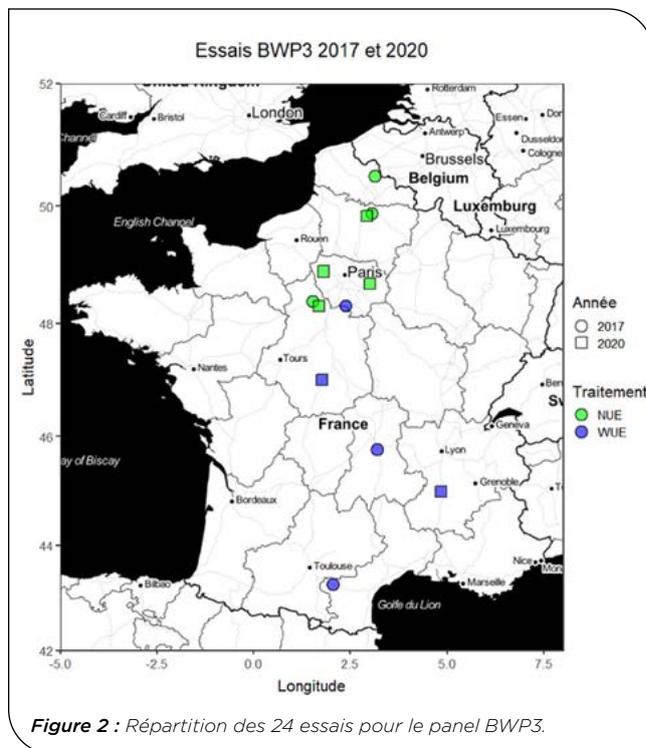


► Caractérisation phénotypique du panel

Le rendement en grain ajusté à 15% d'humidité a été mesuré dans 12 nouveaux essais (combinaison lieu x traitement) en 2020 sur le panel BWP3ext. Dans chaque lieu deux traitements ont été appliqués : un traitement pluvial et un traitement irrigué pour Chateauneuf-sur-Isère et Liniez, et un traitement faible azote et fort azote pour Estrées-Mons, Andrezel, Louville et Maule. Les essais ont été semés selon un design p-rep avec 10 à 20% de lignées répétées et 4 témoins. Dans chaque essai seule une moitié représentative du panel a été observée, sauf à Chateauneuf-sur-Isère et Estrées-Mons où l'ensemble du panel a été semé. La densité de

semis et la fertilisation azotée optimum ont été réduites d'environ 30% pour réduire le risque de verse sur ce matériel sensible.

Ces données s'ajoutent aux 12 essais (Fig. 2) réalisés en 2017 sur le panel BWP3 dans le cadre du PIA BreedWheat au sein desquels l'ensemble de ce panel avait été évalué.



► Génotypage et matrice d'apparement

L'ensemble du panel BWP3ext a été génotypé sur la puce BreedWheat 410K (Axiom TaBW410k (Rimbert *et al.* 2018 ; Kitt *et al.* 2021). Après élimination des marqueurs présentant plus de 20% de données manquantes ou une fréquence de l'allèle mineur inférieur à 5%, la corrélation entre paires de marqueurs a été analysée de manière à ne conserver que les marqueurs présentant une corrélation inférieure à 0.9. Une matrice d'apparement a ensuite été estimée grâce aux marqueurs restant selon la méthode de VanRaden (2008).

► Simulation d'indices environnementaux à l'aide du modèle écophysique CHN

Le développement du couvert a été simulé à l'aide du modèle écophysique CHN (Soenen *et al.* 2016) pour chacun des 24 essais (12 essais du projet ExIGE et des 12 essais du projet BreedWheat) grâce aux données climatiques, à la description du sol et de l'itinéraire technique. Grâce à ces simulations et à la date d'épiaison moyenne du panel, des indices environnementaux décrivant les conditions environnementales perçues par le panel ont été générés. Ces 192 indices, calculés sur différentes périodes de développement (semis-stade épi 1 cm, tallage-épiaison, remplissage-maturité, par exemple) résument soit des variables agroclimatiques (températures, ETP, etc...), soit des variables écophysiques (confort hydrique ou azoté) dans chaque environnement.

	$Y_{ij} = \mu + e_j + G_i + (G \times E_{ij}) + \epsilon_{ij}$
Modèle E+G [1]	-
Modèle E+G+GxE [2]	$G \times E_{ij} - N(0, \sigma_{ge}^2 - K \otimes I_e)$
Modèle E+G+GxW _{all} [3]	$G \times E_{ij} - N(0, \sigma_{ge}^2 - K \otimes W_{all})$
Modèle E+G+GxW _{selpred} [4]	$G \times E_{ij} - N(0, \sigma_{ge}^2 - K \otimes W_{selpred})$
Modèle E+G+G _{AMMI} xW _{all} [5]	$G \times E_{ij} - N(0, \sigma_{ge}^2 - K_{AMMI} \otimes W_{all})$
Modèle E+G+GxW _{AMMI} [6]	$G \times E_{ij} - N(0, \sigma_{ge}^2 - K \otimes W_{AMMI})$
Modèle E+G+(GxW) _{AMMI} [7]	$G \times E_{ij} - N(0, \sigma_{ge}^2 - K_{AMMI} \otimes W_{AMMI})$
Modèle E+G+ (GxW) _{AMMIpred} [8]	$G \times E_{ij} - N(0, \sigma_{ge}^2 - K_{AMMIpred} \otimes W_{AMMIpred})$

Table 1 : Liste des 8 modèles comparés et modélisation de la variance d'interaction GxE correspondante. Le modèle de référence est le GBLUP (Modèle [1]).

► Prédiction génomique des interactions GxE

Un modèle de prédiction génomique prenant en compte les interactions GxE a été calibré sur le panel BWP3 (commun aux deux années) pour le rendement. L'approche utilisée est celle proposée par Rincet *et al.* (2019), qui se base sur une analyse AMMI (Additive Main Effects and Multiplicative Interaction, (Gollob 1968)) pour modéliser les interactions GxE. Cette approche tire parti d'une matrice de kinship pour prédire les scores génétiques de l'AMMI par GBLUP et d'une matrice de covariables environnementales pour prédire les scores environnementaux par régression Partial Least Squares. Ces scores permettent ensuite respectivement l'estimation d'une matrice de covariance d'interactivité génétique et environnementale.

Plusieurs modèles de prédiction génomique ont été comparés dans différents scénarios de cross-validation : un scénario oGoE (old Genotype & old Environment, 5 folds et 10 répétitions), un nGoE (new Genotype & old Environment, 5 folds et 10 répétitions), un oGnE (old Genotype & new Environment, 12 folds et 10 répétitions) et un nGnE (new Genotype & new Environment, 5x12=60 folds et 10 répétitions).

Le modèle de référence est le GBLUP (modèle [1]). Les différents modèles prenant en compte les interactions GxE sont présentés en **Table 1**. Différentes matrices ont été utilisées pour modéliser la variance d'interaction GxE :

- Pour la matrice d'interactivité génétique :
 - K : matrice de Kinship,
 - K_{AMMI} : matrice de covariance calculée à partir des 8 premiers vecteurs singuliers gauches de l'AMMI sur le jeu de données entier,
 - K_{AMMIpred} : identique à K_{AMMI} mais calculée à partir du jeu de données de calibration seulement et prédite pour les nouveaux individus.
- Pour la matrice d'interactivité environnementale :
 - I : matrice identité pour le modèle GxE classique, ne permettant pas de prédire de nouveaux environnement,
 - W_{all} : matrice de covariance calculée à partir de l'ensemble des indices environnementaux,
 - W_{selpred} : matrice de covariance calculée à partir d'un sous-ensemble d'indices environnementaux, sélectionné pour maximiser la corrélation avec W_{AMMI}, sur le jeu de calibration uniquement,

- W_{AMMI} : matrice de covariance calculée à partir des 8 premiers vecteurs singuliers droits de l'AMMI sur le jeu de données entier,
- W_{AMMIpred} : identique à W_{AMMI} mais calculée à partir du jeu de données de calibration seulement et prédite pour les nouveaux environnements.

Dans chaque scénario et pour chaque modèle, la predictive ability a été estimée comme la moyenne du coefficient de corrélation entre les données observées et prédites dans chacun des environnements.

3 Résultats

► Caractérisation phénotypique du panel

La diversité des conditions environnementales et les différents traitements appliqués au sein du réseau d'essais BreedWheat (année 2017) et ExIGE (année 2020) a permis d'observer une gamme de rendement variant de 37 à 81 q.ha⁻¹ (**Fig. 3**). La qualité des données collectées est satisfaisante avec une héritabilité généralisée (Cullis *et al.* 2006) entre 0.54 et 0.95.

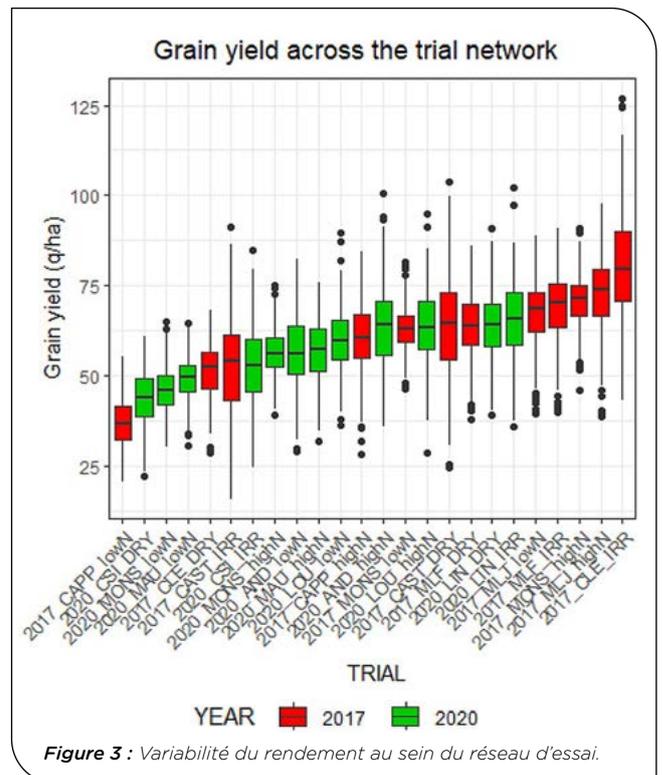


Figure 3 : Variabilité du rendement au sein du réseau d'essai.

► Caractérisation environnementale

Les données climatiques, la description du sol et de l'itinéraire technique ont permis d'utiliser le modèle écophysologique CHN pour estimer des indices agroclimatiques sur chaque phase de développement du couvert, ainsi que des cinétiques de confort hydrique et azoté. L'analyse du confort hydrique (Fig. 4) montre que la plupart des essais a subi un stress hydrique nul, faible ou tardif, à l'exception de CLE_2017_DRY, MAU_2020 et étonnamment MONS_2017 et MONS_2020, ce qui est malgré tout cohérent avec les observations de l'expérimentateur. Le stress azoté a également été très limité dans le réseau et principalement présent sur les essais MONS_2017_lowN et MONS_2020_lowN. La classification des environnements sur la base des cinétiques de confort hydrique et/ou azoté n'a pas permis de révéler d'effets clairs sur le rendement, ce qui pourrait s'expliquer soit par l'effet complexe de plusieurs facteurs limitants au sein du réseau, soit par une imprécision de l'estimation des indices environnementaux.

► Analyse des interactions GxE

Les données de rendement issues des 24 essais considérés ont fait l'objet d'une analyse conjointe des interactions GxE. Les corrélations entre environnements sont toutes positives (r de 0,13 à 0,88, Fig. 5), avec un r^2 d'environ 0,25 en moyenne. L'analyse des corrélations semble montrer des interactions GxE prépondérantes mais peu structurées. Ceci est confirmé par l'analyse de la variance (Table 2, méthode proposée par Smith *et al.* (2001)) avec une variance GxE près de deux fois plus importante que la variance génétique, et du même ordre que la variance environnementale. De même, une classification des environnements sur la base de la matrice GxE n'explique que 10% de la variance GxE, ce qui va dans le sens d'un réseau peu structuré globalement.

	Variance	Erreur standard
Génotype	136.52	10.22068
Environnement	321.3613	140.98888
GxE	300.9044	4.73078

Table 2 : Analyse de variance du rendement dans le réseau de 24 essais.

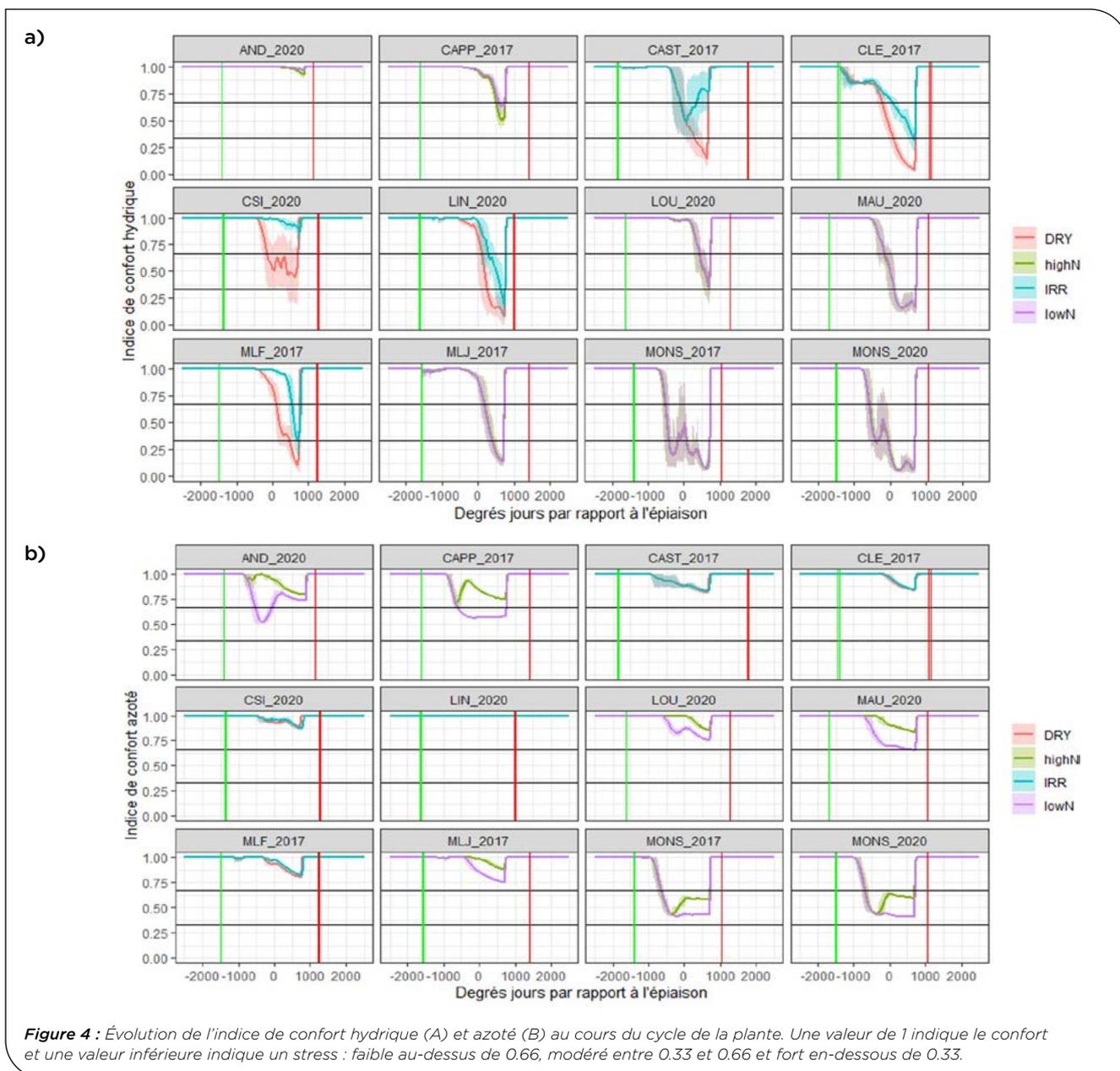


Figure 4 : Évolution de l'indice de confort hydrique (A) et azoté (B) au cours du cycle de la plante. Une valeur de 1 indique le confort et une valeur inférieure indique un stress : faible au-dessus de 0.66, modéré entre 0.33 et 0.66 et fort en-dessous de 0.33.

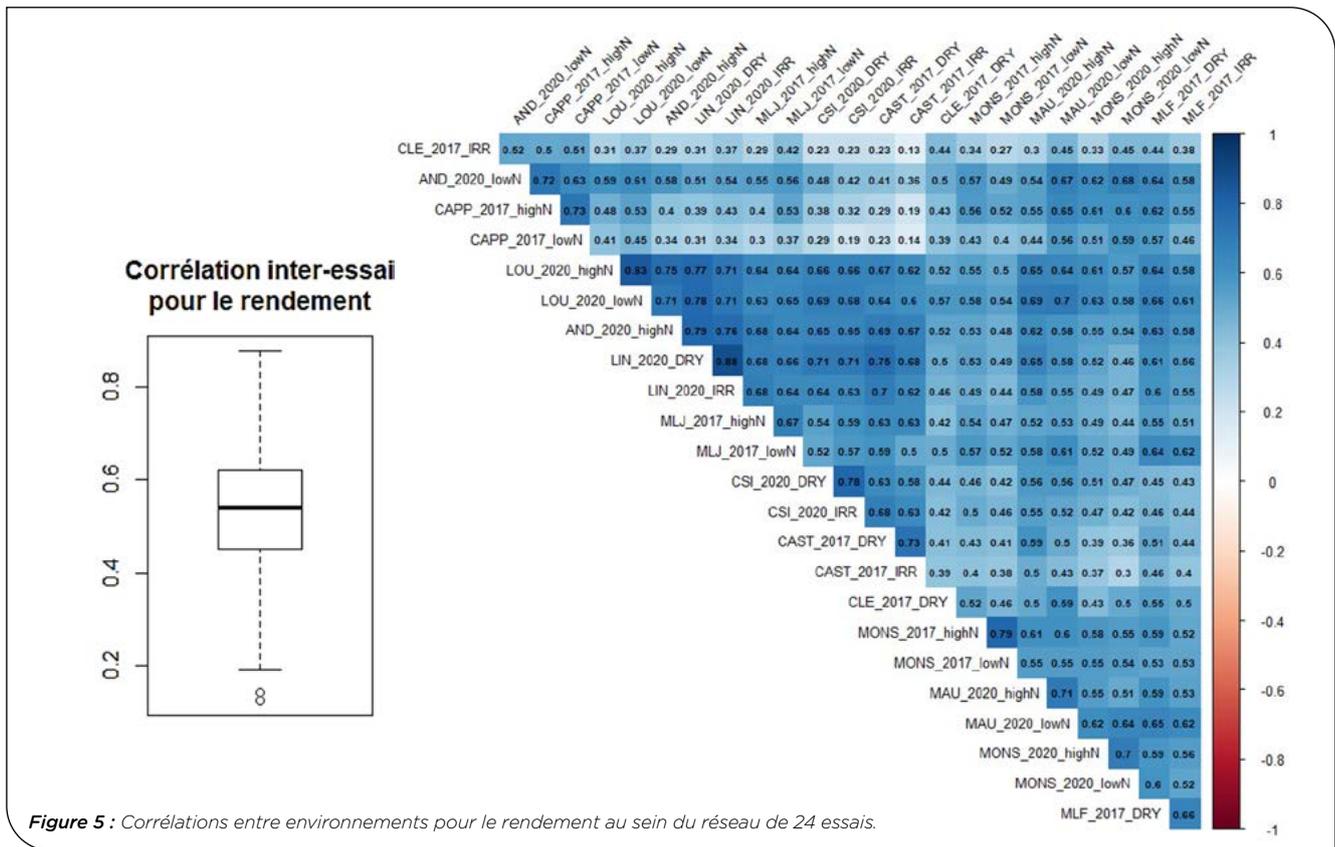


Figure 5 : Corrélations entre environnements pour le rendement au sein du réseau de 24 essais.

► Prédiction génomique GxE

Analyse AMMI

Les 8 premiers axes de l'AMMI captent 73% de la variance résiduelle dans l'effet d'interaction GxE. Les 8 premières colonnes de la matrice des scores environnementaux permettent de calculer la matrice de covariance de l'interactivité environnementale W_{AMMI} et celles de la matrice des scores génétiques permettent de calculer la matrice de covariance de l'interactivité génétique K_{AMMI} . Une comparaison entre la matrice de kinship et la matrice K_{AMMI} montre que l'information portée par K_{AMMI} est différente (Fig. 6), et qu'il semble pertinent de tirer parti de cette information lors de la modélisation des interaction GxE dans le modèle de prédiction génomique.

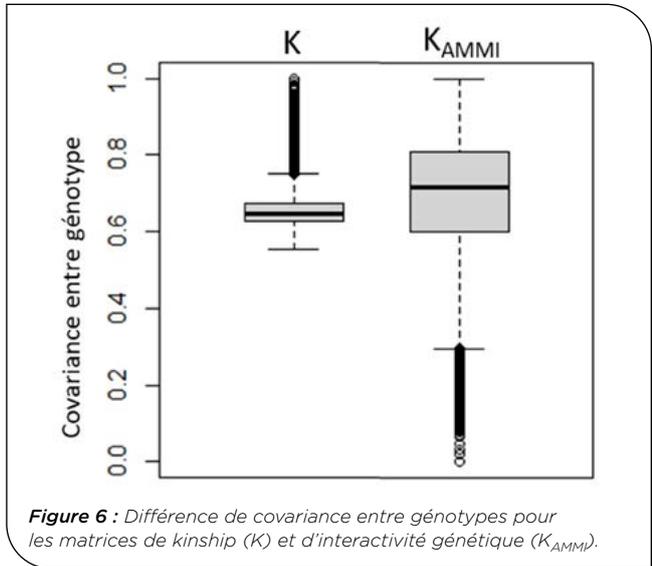


Figure 6 : Différence de covariance entre génotypes pour les matrices de kinship (K) et d'interactivité génétique (K_{AMMI}).

La corrélation entre la matrice d'interactivité environnementale et une matrice de covariance environnementale calculée à partir de tous les indices environnementaux disponibles (W_{all}) est également faible ($r=0.38$, Fig. 7). Une sélection séquentielle d'un sous-ensemble de covariables environnementales permet d'améliorer la corrélation entre la matrice de covariance ainsi construite (W_{sel}) et W_{AMMI} pour atteindre $r=0.83$ avec 6 indices dont 5 indices agroclimatiques et 1 indice écophysio-logique. Les indices écophysio-logiques apportent donc une information complémentaire à celle des indices agroclimatiques. Un point important à noter, qui diffère de l'étude de Rincet *et al.* (2019), est que les indices agroclimatiques sont plus informatifs que les indices écophysio-logiques. Cela pourrait indiquer une moins bonne qualité de la modélisation écophysio-logique dans ce projet.

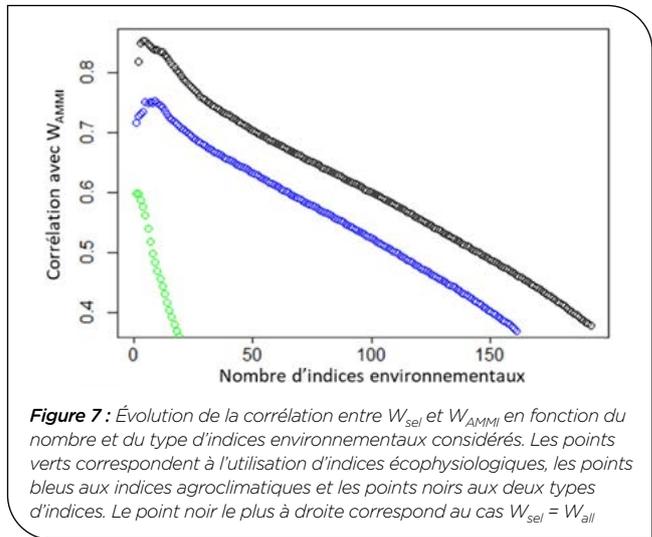


Figure 7 : Évolution de la corrélation entre W_{sel} et W_{AMMI} en fonction du nombre et du type d'indices environnementaux considérés. Les points verts correspondent à l'utilisation d'indices écophysio-logiques, les points bleus aux indices agroclimatiques et les points noirs aux deux types d'indices. Le point noir le plus à droite correspond au cas $W_{sel} = W_{all}$.

Prédiction génomique de l'AMMI

Les résultats de la cross-validation montrent une predictive ability allant de 0.46 à 0.67 pour le GBLUP (modèle [1], **Table 3**). La prise en compte des interactions GxE permet une amélioration de la predictive ability dans tous les scénarios. Le modèle [3] permet une amélioration seulement dans les scénarios oGoE et nGoE, un peu plus importante que celle du modèle [2]. Le modèle [4] en revanche présente de moins bonnes performances malgré une plus forte corrélation avec W_{AMMI} de $W_{selpred}$ comparé à W_{all} . Ceci montre que la sélection du sous-ensemble de covariables environnementales n'est pas robuste. Le modèle [7], basé sur les matrices d'interactivité de l'AMMI sur le jeu de données complet, est le plus performant. Il permet une nette amélioration de la predictive ability avec un gain de r de +0.13 à +0.28 suivant les scénarios. Ce modèle ne permet pas de prédiction en pratique puisqu'il utilise l'ensemble du jeu de calibration et de validation pour ajuster le modèle, cependant il permet d'estimer la borne supérieure de performance atteignable avec ce type d'approche. De même les modèles [5] et [6] ne permettent pas de prédiction dans la pratique, mais confirment respectivement que la matrice d'interactivité génétique issue de l'AMMI est pertinente pour améliorer la qualité des prédictions dans les scénarios avec de nouveaux génotypes, et la matrice d'interactivité environnementale dans ceux avec de nouveaux environnements. Le modèle [8], basé sur la prédiction de ces deux matrices d'interactivité présente des performances similaires au modèle [3], les matrices prédites ne sont donc pas plus informatives que la matrice de kinship et que la matrice W_{all} .

Modèles	Scénarios de Cross-Validation			
	oGoE	nGoE	oGnE	nGnE
E+G [1]	0.671	0.461	0.656	0.439
E+G+GxE [2]	0.726	0.522	-	-
E+G+Gx W_{all} [3]	0.753	0.532	0.650	0.435
E+G+Gx $W_{selpred}$ [4]	0.750	0.514	0.626	0.396
E+G+G $_{AMMI}$ x W_{all} [5]	0.871	0.740	0.642	0.481
E+G+Gx W_{AMMI} [6]	0.762	0.501	0.732	0.487
E+G+(GxW) $_{AMMI}$ [7]	0.871	0.740	0.788	0.662
E+G+(GXW) $_{AMMipred}$ [8]	0.753	0.530	0.644	0.432

Table 3 : Qualité de prédiction pour les 8 modèles testés dans 4 scénarios de cross-validation.

4 Discussion

Le projet ExIGE a permis l'évaluation d'une large diversité de blé tendre d'hiver au champ dans des conditions de stress abiotiques variées. La caractérisation de ces conditions environnementales à l'aide d'un modèle écophysologique a nécessité la collecte de données météorologiques, de composition

du sol ainsi que le suivi précis des itinéraires techniques appliqués. L'expérience acquise lors du projet montre que cette description des conditions d'expérimentation est fastidieuse et souvent lacunaire. Malgré ces difficultés nous avons pu décrire plus finement les conditions environnementales à l'aide du modèle écophysologique CHN ce qui nous a permis une meilleure compréhension du réseau expérimental.

L'approche utilisée pour prédire le rendement dans chaque environnement n'a pas permis un gain de performance important par rapport à l'approche standard (GBLUP). Nos résultats sont similaires à ceux de Rincent *et al.* (2019) pour $W_{AMMipred}$ mais pas pour $K_{AMMipred}$, pour laquelle ils avaient obtenu un gain par rapport à K . Nous explorons cependant une diversité génétique beaucoup plus large car ils ont travaillé sur un panel élite de 156 variétés alors que nous avons utilisé un panel de diversité de 450 individus, ce qui est peut-être la raison de la difficulté à prédire K_{AMMI} . Il apparaît d'ailleurs plus difficile de prédire de nouveaux génotypes que de nouveaux environnements avec tous les modèles, sauf le modèle [5] qui tire parti de la matrice GAMMI mais pas de W_{AMMI} . De même, ce sont dans les scénarios nGoE et nGnE que les gains de prédiction sont les plus importants avec le modèle [7], ce qui montre l'intérêt majeur d'améliorer l'estimation de $K_{AMMipred}$. Les scores génétiques permettant le calcul de $K_{AMMipred}$ ont été prédits par GBLUP pour les nouveaux génotypes, l'utilisation de modèles bayésiens supposant une architecture génétique plus complexe comme le BayesA ou BayesB permettrait peut-être une meilleure estimation. En effet, des résultats intermédiaires semblent montrer la prédominance d'un nombre restreint de déterminants génétiques pour la prédiction de certains scores génétiques. Concernant $W_{AMMipred}$, il est possible que la composante environnementale de l'interactivité ne soit pas suffisamment forte dans notre réseau d'essai pour quelle puisse être précisément estimée, avec notamment une faible structuration du réseau d'essai. Il est aussi possible que la qualité de la modélisation écophysologique permettant l'estimation des indices environnementaux ne soit pas suffisante. Enfin, la taille du réseau d'essai et sa diversité peuvent également être limitantes avec un réseau composé de seulement 24 essais répartis sur 2 années et 11 lieux majoritairement au Nord de la France.

La modélisation des interactions GxE en prédiction génomique par l'approche AMMI semble prometteuse (modèle [7]), bien qu'au cours de ce projet, la précision de prédiction des matrices d'interactivité génétique et environnementale n'a pas été suffisante pour permettre un gain de predictive ability notable. Dans le futur, l'augmentation de la taille et de la diversité du jeu de calibration environnementale, une meilleure qualité de modélisation écophysologique, et une meilleure prise en compte de l'architecture génétique de l'interactivité pourrait cependant permettre d'améliorer les capacités de prédictions du rendement. De même, la méthode utilisée dans ce travail consiste en de multiples étapes de prédictions qui entraînent des pertes d'information successives, une méthode single-step permettrait peut-être de mieux exploiter le potentiel prédictif de ce genre d'approche.

II. Études d'association pour les caractères agronomiques

1 Introduction

Le changement climatique conduit à une stagnation des rendements du blé tendre en Europe (Brisson *et al.* 2010). Pour augmenter la production alimentaire, il est nécessaire d'optimiser l'efficacité des schémas de sélection. L'apport d'une nouvelle diversité pourrait permettre d'augmenter le gain génétique et ainsi de limiter l'effet négatif des aléas environnementaux dus au changement climatique.

Dans ce cadre, le réservoir constitué par les allèles originaux présents dans les ressources génétiques est une source de diversité susceptible de permettre de relever ces défis. On peut en effet intégrer rapidement une nouvelle diversité dans le matériel élite par sélection assistée par marqueurs. Pour cela, il est nécessaire d'identifier de nouveaux allèles favorables pour les caractères agronomiques majeurs (rendement et composantes, précocité, hauteur, teneur en protéines) dans les ressources génétiques.

L'objectif de ce projet est d'identifier de nouveaux allèles favorables dans des ressources exotiques, absents du matériel élite. Nous utiliserons une approche de génétique d'association afin de détecter les déterminants génétiques des caractères agronomiques majeurs au sein d'un panel de 485 lignées représentatives de la diversité génétique mondiale.

2 Matériel et méthode

► Caractérisation phénotypique

Le réseau d'essai est celui décrit dans la partie « I. Prédiction génomique du rendement avec des modèles intégrant les interactions GxE ». Différents caractères agronomiques ont été mesurés dans chaque essai (**Table 1**) sur le panel BWP3 en 2017 (projet BreedWheat) et sur le panel BWP3ext en 2020 (projet ExIGE) : la date d'épiaison (HD), la hauteur de plante (PH), le rendement ajusté à 15% d'humidité (GY15) Le nombre d'épis par m² (SA), le nombre de grains par épi (GPS), le nombre de grains par m² (GPA), le poids de mille grains ajusté à 15% d'humidité (TKW15), la surface, la longueur et la largeur d'un grain (GA, GL, GW), la teneur en protéine (GPC) et l'écart à la régression rendement protéine (GPD).

► Génétique d'association

Pour identifier les déterminants génétiques associés à chaque caractères, l'effet de chaque marqueur de la puce TaBW410K a été testé dans chaque environnement à l'aide du modèle K (Yu *et al.* 2006) selon la méthode LOCO (Rincent *et al.* 2014).

Les marqueurs présentant une p-value inférieure à 10⁻⁶ ont été déclarés significatifs puis agrégés en QTL pour chaque caractère au sein de chaque essai sur la base du déséquilibre de liaison, d'après l'approche de Cormier *et al.* (2014). Chaque QTL a été décrit par son marqueur le plus significatif et sa part de variance expliquée estimée par la méthode de Sun *et al.* (2010).

	HD	PH	GY15	SA	GPS	GPA	TKW15	GA	GL	GW	GPC	GPD
2017_CAPP_highN	448	447	452	441	452	451	0	0	0	0	449	445
2017_CAPP_lowN	450	450	449	442	451	449	0	0	0	0	448	450
2017_CAST_DRY	454	452	453	445	448	450	452	0	0	0	450	451
2017_CAST_IRR	454	453	454	448	451	452	452	0	0	0	449	448
2017_CLE_DRY	310	310	310	306	303	307	306	302	300	304	311	311
2017_CLE_IRR	309	312	308	240	239	306	304	300	300	306	309	306
2017_MLF_DRY	450	450	447	0	0	446	444	444	441	439	443	446
2017_MLF_IRR	450	421	442	0	0	445	447	445	443	439	438	446
2017_MLJ_highN	449	445	446	449	450	446	450	0	0	0	447	445
2017_MLJ_lowN	449	445	449	444	450	448	448	0	0	0	444	450
2017_MONS_highN	454	452	451	438	449	450	450	0	0	0	450	452
2017_MONS_lowN	454	452	451	440	449	451	452	0	0	0	450	451
2020_AND_highN	275	274	277	0	0	0	277	0	0	0	271	273
2020_AND_lowN	275	274	277	0	0	0	276	0	0	0	274	275
2020_CSI_DRY	242	239	480	0	0	0	478	0	0	0	479	477
2020_CSI_IRR	239	238	478	0	0	0	475	0	0	0	472	474
2020_LIN_DRY	239	241	240	0	0	0	238	0	0	0	240	240
2020_LIN_IRR	239	241	238	0	0	0	240	0	0	0	240	237
2020_LOU_highN	263	262	258	0	0	0	256	0	0	0	241	243
2020_LOU_lowN	263	261	245	0	0	0	247	0	0	0	243	242
2020_MAU_highN	261	261	261	0	0	0	263	0	0	0	259	260
2020_MAU_lowN	238	238	233	0	0	0	239	0	0	0	238	239
2020_MONS_highN	485	480	480	0	0	0	479	0	0	0	476	478
2020_MONS_lowN	484	475	483	0	0	0	480	0	0	0	479	482

Table 1 : Effectif phénotypé pour chaque caractère dans chaque essai du réseau.

3 Résultats

Au total, 272 QTL ont été détectés, répartis sur l'ensemble des chromosomes (Fig. 1). Des QTL ont été détectés pour chacun des 12 caractères analysés, avec un maximum pour HD et PH (75 et 90 QTL respectivement) et un minimum pour les caractères de taille de grains GW, GL et GA (3, 5 et 7 QTL). Pour le rendement, 9 QTL ont été identifiés.

► Colocalisation avec PPD-D1

Sur le chromosome 2D (Fig. 2), on observe une colocalisation très importante de QTL, principalement pour HD (65 QTL), dont l'emplacement correspond au gène de précocité PPD-D1. Ces QTL de précocité sont détectés dans les 24 essais. Ces associations sont particulièrement fortes, avec un $-\log_{10}(p\text{-value})$ et un PEV (Proportion of Explained Variance) moyen (maximum) de 18 (48) et 20% (43%) respectivement. L'effet moyen associé à l'allèle minoritaire est de 39 degrés-jour.

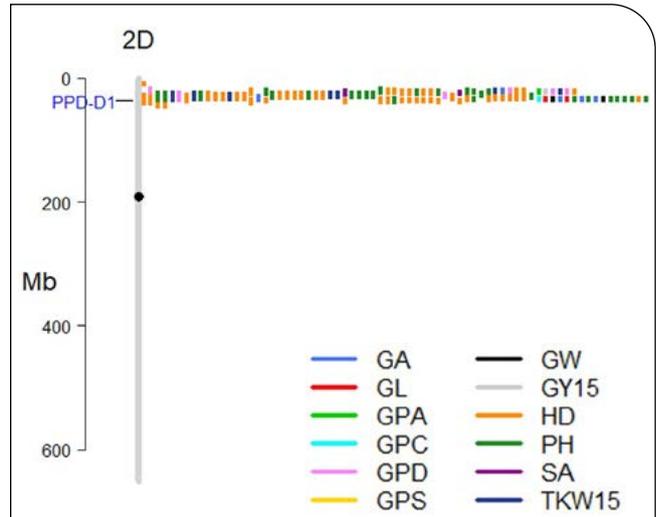


Figure 2 : Colocalisation de QTL de précocité sur le chromosome 2D.

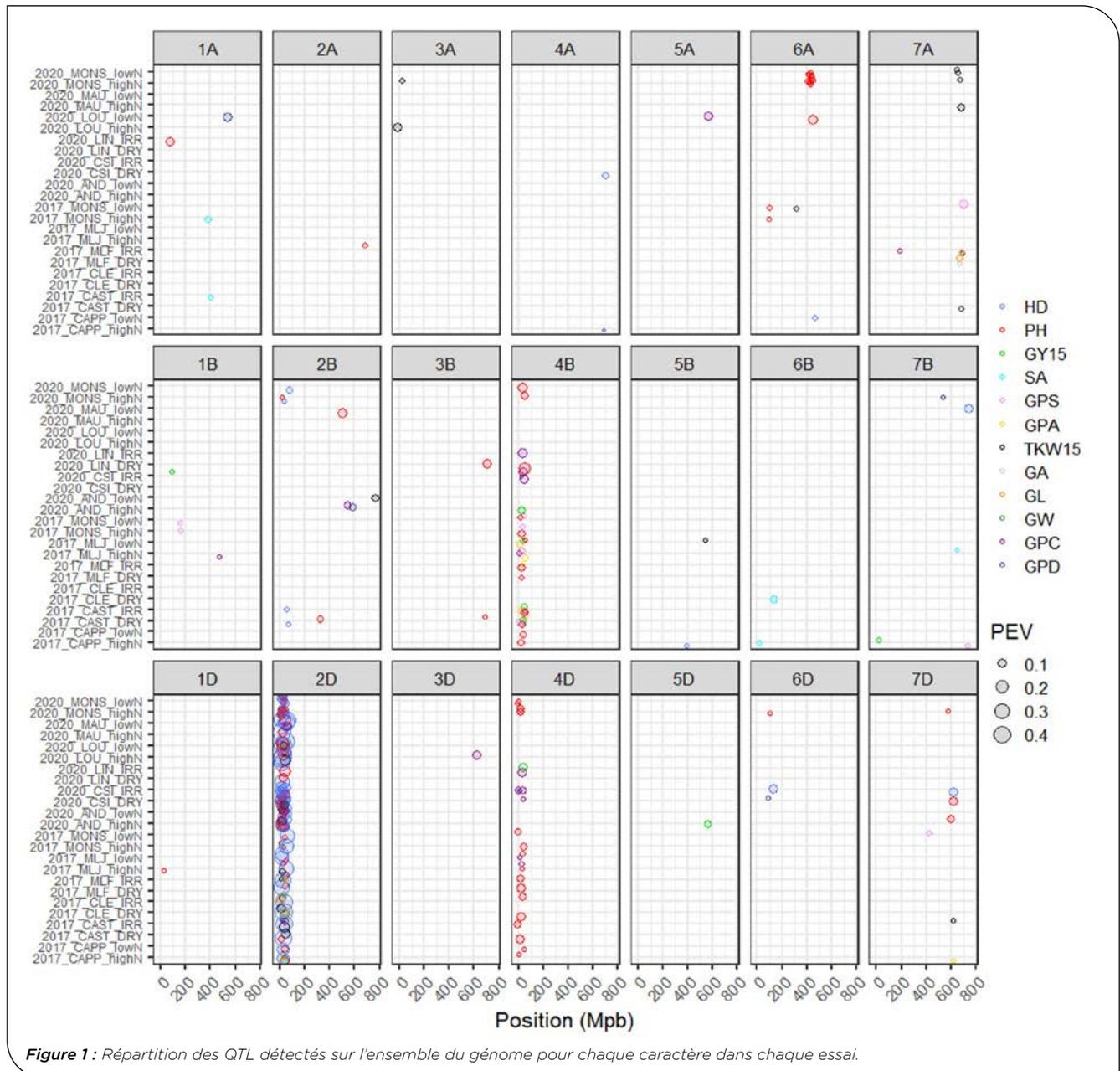


Figure 1 : Répartition des QTL détectés sur l'ensemble du génome pour chaque caractère dans chaque essai.

► Colocalisation avec RHT-D1

On observe également une importante colocalisation de QTL avec le gène de hauteur RHT-D1 sur le chromosome 4D (**Fig. 3**). Ce pic regroupe 16 QTL de hauteur, ainsi que 6 QTL de GPC, 1 QTL de GPD et 1 QTL de rendement. Pour la hauteur, la moyenne et le maximum sont de 8.5 et 11.7 pour $-\log_{10}(p\text{-value})$ et de 7.8% et 10.8% pour le PEV, avec un effet moyen de 31 cm pour l'allèle minoritaire.

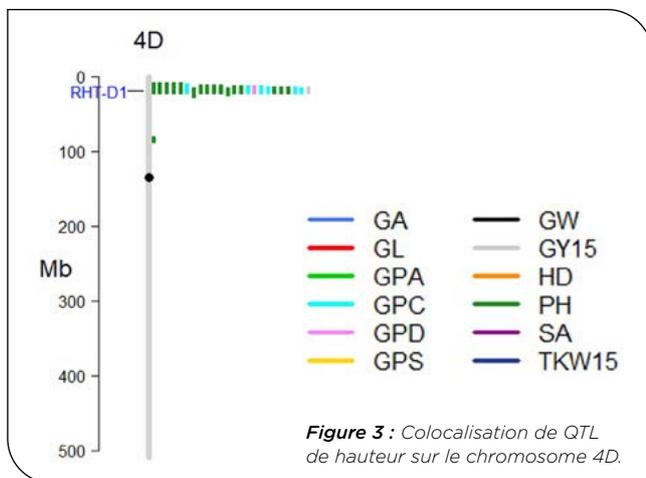


Figure 3 : Colocalisation de QTL de hauteur sur le chromosome 4D.

► Colocalisation de QTL de composantes du rendement

Sur le chromosome 7A, on observe une colocalisation de QTL de composantes du rendement, sans QTL liés à la précocité, à la hauteur ou à la teneur en protéines (**Fig. 4**). Ce pic est composé de 5 QTL de TKW15, de 2 QTL de longueur de grain, de 2 QTL de surface de grain et d'un QTL de nombre de grains par épi. Ces QTL ont été détectés dans 5 essais différents, regroupant 3 lieux, 2 années et les 4 traitements expérimentés (highN, lowN, IRR et DRY), et expliquent en moyenne 6.7% de la variance. L'allèle minoritaire diminue le nombre de grains et augmente leur taille et leur poids.

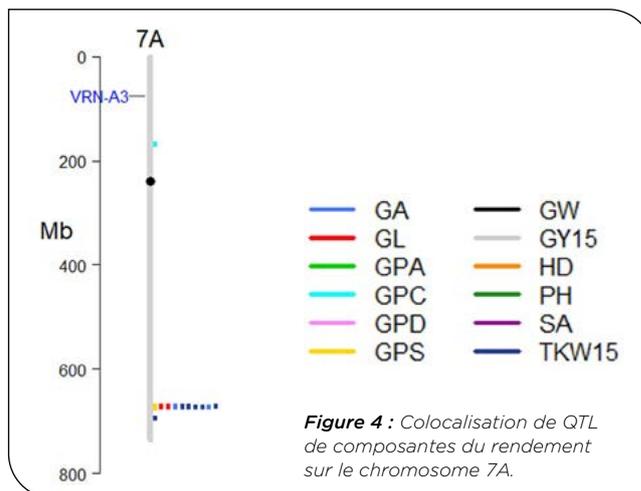


Figure 4 : Colocalisation de QTL de composantes du rendement sur le chromosome 7A.

4 Discussion

L'objectif était d'identifier de nouveaux allèles favorables dans ce matériel exotique pouvant être intéressants à introduire dans le matériel en sélection. L'analyse de génétique d'association réalisée est de bonne qualité car on retrouve d'importante colocalisation sur des gènes connus pour la précocité et la hauteur de plante. D'autres QTL pourrait se révéler intéressants et mériteraient d'être analysés plus en détails, comme les QTL de rendement, de ses composantes, ou de teneur en protéines. La région la plus prometteuse semble être la colocalisation de QTL de composantes de rendement sur le chromosome 7A. Il serait intéressant d'étudier les allèles présents à ce locus dans le matériel élite pour déterminer s'il existe un nouvel allèle dans le matériel exotique et si oui, déterminer quel est son effet dans un fond élite.

Enfin, à l'issu du projet FSOV Débat, de nouvelles données de génotypage de type présence-absence, issu de RNAseq, sont disponibles pour ce panel. Cette description différente de la diversité pourrait permettre de découvrir de nouvelles zones associées.

III. Séquençage gluténines et qualité boulangère

1 Introduction

Le blé est à la base de l'alimentation humaine. Consommé généralement sous forme de produits transformés et essentiellement sous forme de pain pour le blé tendre (*Triticum aestivum*), il couvre environ 1/5 de nos besoins en énergie et en protéines. Les principaux constituant du grain de blé sont l'amidon (80-85%) et les protéines (15-20%). Les protéines de

réserve (ou protéines du gluten) sont majoritaires et représentent 80-85% des protéines totales du grain. Elles sont constituées par les gluténines et les gliadines, ces deux fractions étant subdivisées en plusieurs sous-classes (**Figure 1**). On distingue les gluténines de hauts et faibles poids moléculaires, respectivement HMWG qui représentent environ 10% des protéines de réserve, et LMWG qui elles représentent 1/3 des protéines du grain et environ 60% des gluténines totales. Les gliadines comprennent les α/β , γ - et ω -gliadines.

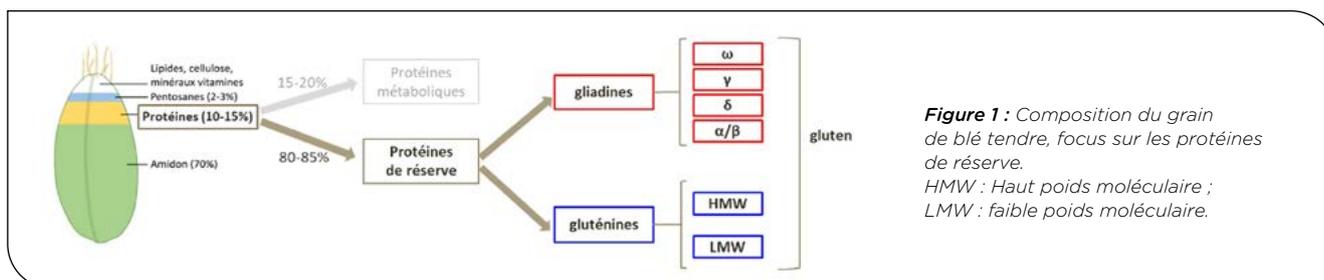


Figure 1 : Composition du grain de blé tendre, focus sur les protéines de réserve. HMW : Haut poids moléculaire ; LMW : faible poids moléculaire.

Après hydratation et pétrissage de la farine, les protéines de réserve s'agrègent en un réseau tridimensionnel, le gluten. Rapidement, les gluténines se lient par des ponts disulfures et forment le squelette du gluten sur lequel se fixent par des liaisons faibles les gliadines (Johansson *et al.* 2013). Le gluten est à l'origine des propriétés de viscoélasticité des pâtes. Les gluténines apportent la ténacité, les HMWG contrôlent l'élasticité (Johansson *et al.* 2013), les gliadines sont responsables de la viscosité. La qualité boulangère résulte elle d'un équilibre entre viscosité, élasticité et ténacité.

Le déterminisme génétique des protéines de réserve est aujourd'hui bien établi. Les gènes codant pour ces protéines font partie de familles multigéniques organisées en clusters et s'héritant en blocs. Les HMWG sont codées par trois *loci* homéologues (*Glu-A1*, *Glu-B1* et *Glu-D1*) situés sur le bras long des chromosomes du groupe 1 (Payne 1987). Chaque locus comprend 2 gènes liés (*Glu-A1-1* et *Glu-A1-2* au locus *Glu-A1* par exemple) qui codent pour les sous-unités x et y de la protéine. (<http://www.aaccnet.org/initiatives/definitions/Pages/Gluten.aspx>). Les clusters de LMWG et de gliadines comprennent de nombreux gènes. Les *loci* de LMW, *Glu-A3*, *Glu-B3* et *Glu-D3*, sont situés sur le bras court des chromosomes 1 ; les gliadines sont-elles codées par des clusters sur les bras courts des chromosomes des groupes 1 et 6.

Les protéines de réserve sont connues pour leur niveau important de polymorphisme. Les allèles de gluténines ont été classés d'après leur effet sur la qualité boulangère (Branlard and Dardevet 1985; Payne *et al.* 1987). L'allèle d de *GluD1-1* qui donne l'haplotype protéique Dx5 + Dy10 et l'allèle b de *Glu-B1* (haplotype protéique Bx7 + Bx8) ont été associés à une très bonne qualité boulangère (Pirozi *et al.* 2008). C'est ce qui explique la prédominance de l'haplotype Dx5 + Dy10 observée dans les variétés élites qui expliquerait leur forte ténacité et leur manque d'élasticité que le meunier doit corriger par des mélanges avec des blés améliorants élastiques.

Disposer d'outils facilitant l'amélioration de la qualité boulangère est un enjeu majeur pour le sélectionneur. Développer de tels outils implique de déterminer le polymorphisme des gluténines, principales responsables de la qualité boulangère, au niveau du génome, puis de mettre au point des marqueurs moléculaire associés aux qualités de la farine. Cependant une difficulté de ce travail provient de la structure des gènes de protéines de réserve qui sont riches en motifs répétés que l'on retrouve non seulement au niveau d'un même gène mais aussi entre les différents gènes. Cette particularité explique la faible qualité de l'assemblage des génomes dans ces régions, expliquant que les gènes de protéines de réserve soient incomplets sur la pseudo-molécule de Chinese-Spring V2.1. Un séquençage long-read de ces régions pourraient corriger cette situation.

2 Matériel et méthode

► Matériel Végétal

Nous avons échantillonné 73 lignées représentatives du panel BWP3 (Figure 2A) pour séquencer les gènes de protéines de réserve. Certains gènes de gluténines pour ces 73 lignées ont été séquencés.

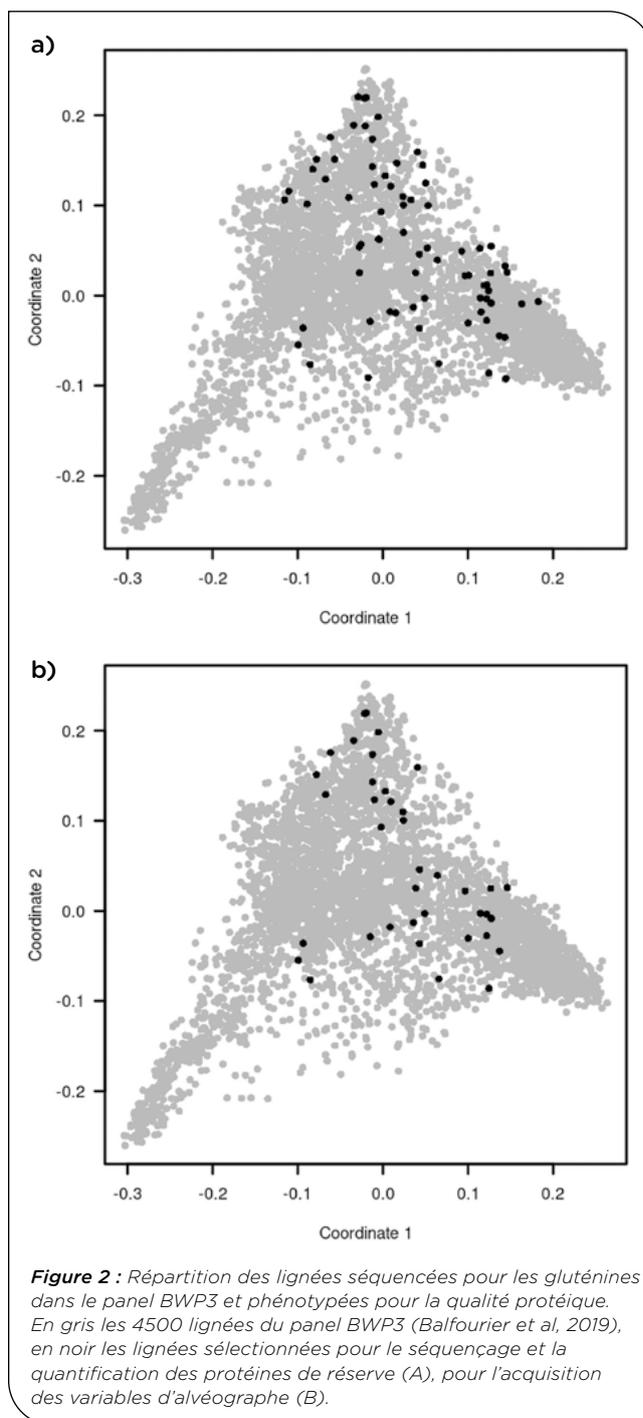


Figure 2 : Répartition des lignées séquencées pour les gluténines dans le panel BWP3 et phénotypées pour la qualité protéique. En gris les 4500 lignées du panel BWP3 (Balfourier *et al.*, 2019), en noir les lignées sélectionnées pour le séquençage et la quantification des protéines de réserve (A), pour l'acquisition des variables d'alvéographe (B).

► Phénotypage

Une mouture complète a été obtenue à partir des grains récoltés à pour chaque condition de culture à Estrées-Mons et à Chateaneuf sur Isère (récolte 2020) pour les 73 lignées provenant du panel BWP3 étendu. Les protéines totales de ces échantillons ont été mesurées selon la méthode Dumas avec un analyseur élémentaire. Après extraction séquentielle des protéines des farines complètes, chaque classe de protéines de réserve a été dosée par RP-HPLC.

Quarante-cinq lignées représentatives de ces 73 lignées, ont été échantillonnées (Figure 2B) pour mesurer les variables de l'alvéographe de Chopin (Qualtech).

La liste des variables liées aux protéines de réserve est décodée dans la **Table S1**.

► Séquençage

L'annotation de 18 gènes de gluténines et 44 gènes de gliadines a été faite chez Chinese-Spring V2.1 (Table 1) et Renan.

Des amorces ont été développées sur Chinese-Spring pour amplifier des régions d'une longueur allant de 4500 à 8500 pb. Seules les amorces de gluténines ont fonctionné en PCR long range. Au final, 18 gènes de gluténines ont été séquencés (6 gènes HMWG et 12 gènes de LMWG) avec la technologie PACBIO HiFi.

Gène (1 ^{er} SNP)	Chr	CS V2.1 (pb)
Omega_gli_A-1	1A	4 012 862
Gamma_gli_A-1	1A	4 764 891
LMW1A_i_1_159	1A	5 085 939
LMW1A_m_3_7545	1A	7 714 484
Omega_gli_A-2	1A	17 808 422
HMW1Ax_60	1A	510 222 163
HMW1Ax_7073	1A	510 229 176
HMW1Ay_0	1A	510 416 929
HMW1Ay_9706	1A	510 426 635
Gamma_gli_B-1	1B	5 300 534
Omega_gli_B-1	1B	5 727 410
LMW1B_m_4_1	1B	6 886 293
Omega_gli_B-2	1B	22 656 686
LMW1B_m_5_10767	1B	23 030 274
HMW1Bx_12	1B	562 457 564
HMW1Bx_8030	1B	562 465 582
HMW1By_6	1B	562 634 324
HMW1By_8511	1B	562 642 829
Omega_gli_D-1	1D	2 740 455
Gamma_gli_D-1	1D	2 886 542
LMW1D_m_1_68	1D	3 171 203
LMW1D_m_8_7034	1D	7 592 250
HMW1Dx_222	1D	414 602 943
HMW1Dx_6232	1D	414 608 953
HMW1Dy_34	1D	414 658 794
HMW1Dy_7404	1D	414 666 164

Table 1 : Principaux gènes sur les chromosomes 1A, B, D. Seul le premier gène et le premier SNP d'un cluster de gènes est référencé

Pour chaque gène amplifié, des séquences consensus ont été produites avec SMRTTools (css) pour les amplicons présentant 3 lectures minimum. Les lignées ont été démultiplexées avec SMRTTools (lima). Puis les gènes ont été clusterisés avec pbaa en utilisant la séquence de Chinese-Spring comme guide, avec un seuil de 1000 lectures minimum par individu et par gène. Un alignement multiple a été obtenu avec ClustalOmega v1.2.4 pour chaque gène. Un calling de SNP a ensuite été produit sur les 18 alignements multiples (outil msa2vcf de jvarkit).

► Associations

Les études d'associations ont été effectuées avec le même modèle que celui décrit dans la partie I rendement. Elles ont été effectuées sur les données TaBW410K, les données d'exome de 2000 gènes candidats Breedwheat et les SNP de gluténines produites dans ce projet.

3 Résultats

► Données de phénotypage

Comme attendu, les rendements étaient supérieurs dans les essais en condition optimale (DRY ou N) et les taux de protéine étaient supérieurs dans les essais stressés (IRR ou NO). Nous n'avons pas observé de différence significative pour les poids de mille grains ou le rapport gliadines/gluténines du grain (Figure 3).

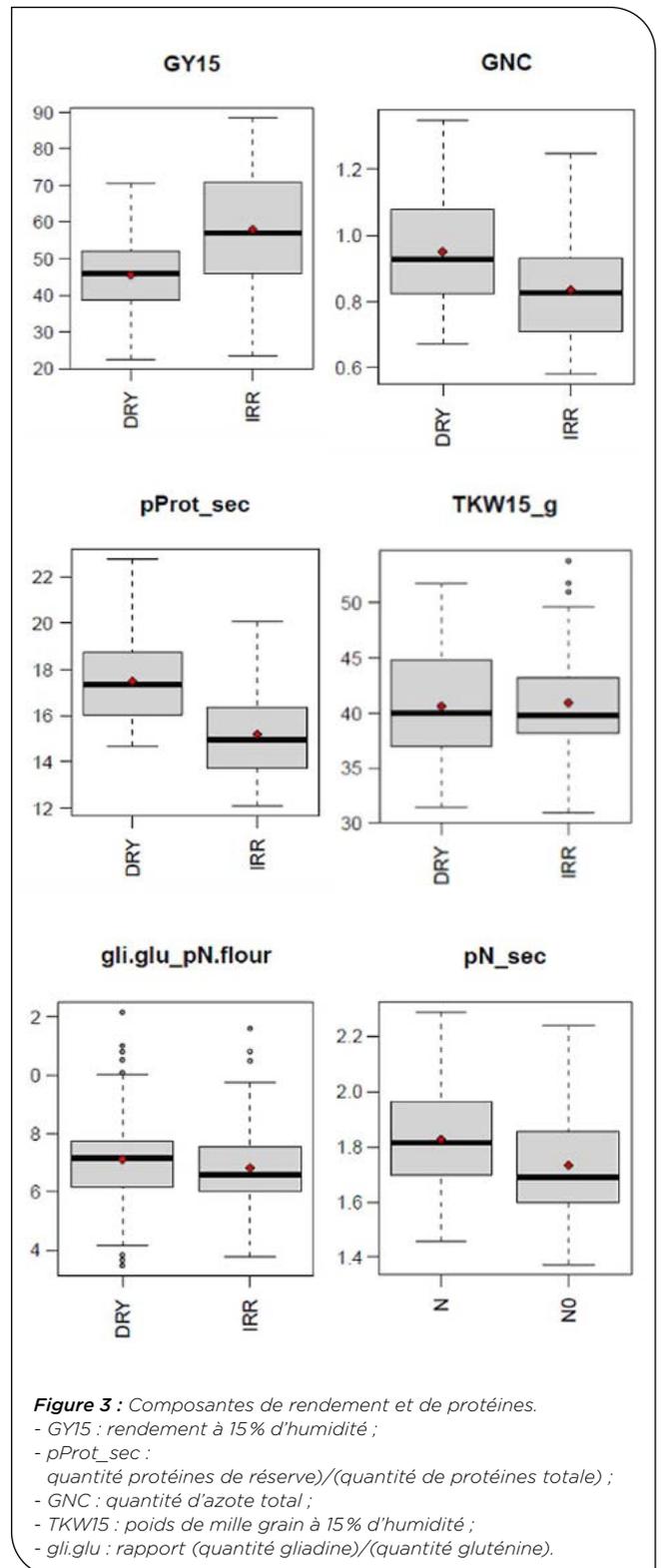


Figure 3 : Composantes de rendement et de protéines.

- GY15 : rendement à 15% d'humidité ;
- pProt_sec : quantité protéines de réserve/(quantité de protéines totale) ;
- GNC : quantité d'azote total ;
- TKW15 : poids de mille grain à 15% d'humidité ;
- gli.glu : rapport (quantité gliadine)/(quantité gluténine).

Les quantités de gliadines et de gluténines sont corrélées à la quantité d'azote total (GNC) et à la quantité de protéines de réserve (Figure 4).

La force boulangère est très corrélée pour les essais d'un même lieu, en condition optimale et stressée (DRY vs IRR ou N vs NO). Elle est significativement corrélée entre essais d'environnements différents (DRY/IRR vs N/NO) (Figure 5).

► Données de séquençage

Parmi les 2102 SNP, 1309 ont une MAF>0.05 et 53 sont en équilibre de liaison.

On remarque que l'allèle « absent » est un allèle fréquent à considérer dans les associations avec les phénotypes (Table 2).

On observe du DL intra-gène. Au total, 25 marqueurs permettent de résumer la diversité des HMW et 29 pour les LMW. Chaque gène possède en moyenne 4 haplotypes.

Gène	#SNP	#hap	PAV
HMW1Ax	2	3	0
HMW1Ay	2	4	1
HMW1Bx	9	4	0
HMW1By	5	3	1
HMW1Dx	2	3	0
HMW1Dy	5	5	1
LMW1Ai1	2	4	1
LMW1Am3	7	5	1
LMW1Bm4	7	6	1
LMW1Bm5	2	4	1
LMW1Dm1	1	2	0
LMW1Dm3	4	5	1
LMW1Dm4	3	5	1
LMW1Dm7	1	3	1
LMW1Dm8	2	3	0

Table 2 : SNP permettant de résumer la diversité nucléotidique des gluténines.

#SNP : nombre de SNP en équilibre de liaison dans le gène.

#hap : nombre d'haplotypes dans le gène.

PAV : absence du gène chez certains individus constituant un allèle supplémentaire.

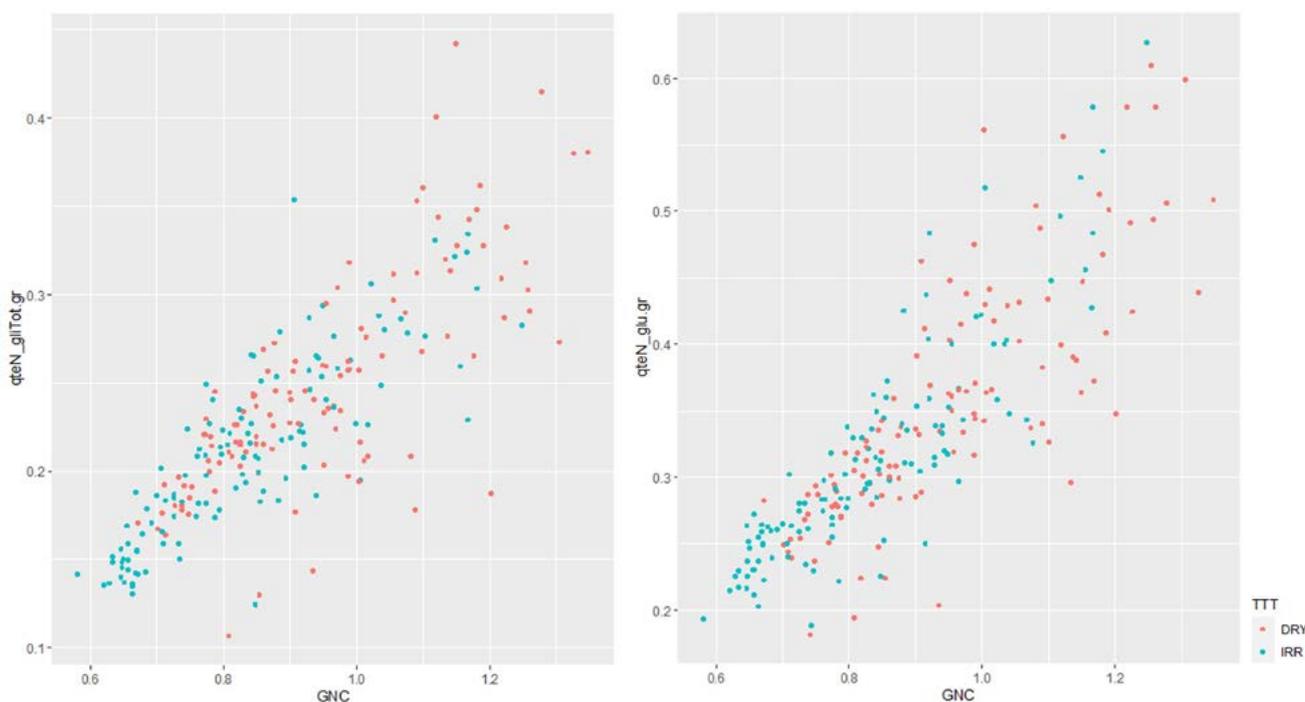


Figure 4 : Corrélation quantité gliadines et gluténines / quantité d'azote total.

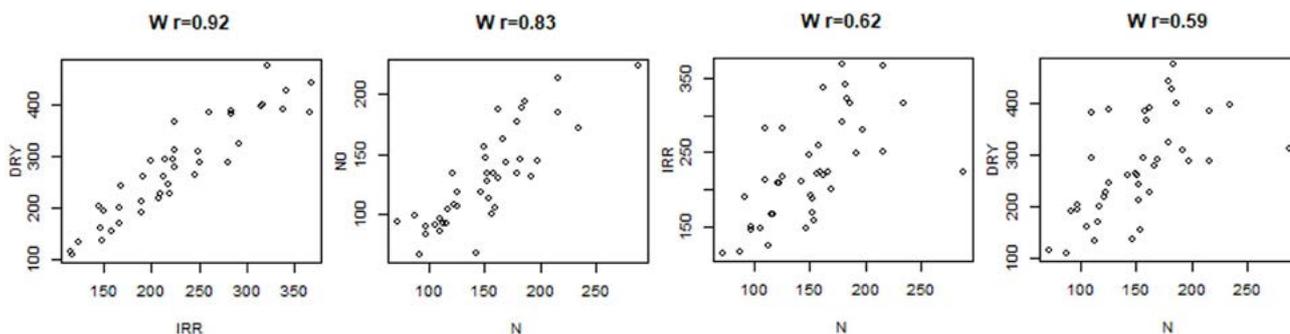


Figure 5 : Corrélation de la force boulangère (W) entre essais.

► Associations

On trouve des QTL impliqués dans le taux de protéine au début des chromosomes 1A, 1B et 1D (gliadines et gluténines HMW) (Annexe 1). Les associations les plus fortes ne se situent pas au niveau des marqueurs développés intra-gènes pour ce projet mais sur des marqueurs TaBW410K.

Des associations sur l'ensemble du bras court du chromosome 1B signent la présence de l'introggression 1RS/1BL dans le panel.

Les QTL impliqués dans les protéines expliquent entre 30 et 50% de la variance du caractère (**Table 3**). Ils sont en général associés à plusieurs variables/ environnements.

Quelques manhattan plots sont disponibles en Annexe 1 pour chaque caractère.

4 Discussion

L'objectif est d'établir une correspondance entre allèles PAGE et SNP et d'identifier des marqueurs liés aux

variables de l'alvéographe, l'élasticité en particulier. Les QTLs détectés restent à être confirmés sur des panels plus grands. La puissance de détection est en effet très faible pour des panels de 45 accessions (variables d'alvéographes) ou 73 accessions (variables liées aux protéines de réserve). Le jeu de données le plus complet dont nous disposons avec ces phénotypes est une core collection de 366 lignées génotypées sur TaBW410K. Nous allons typer les allèles PAGE sur les 75 lignées de ce projet, imputer les SNP et PAV obtenus dans les gènes de gluténines séquencés dans ce projet sur la core collection et associer les haplotypes obtenus avec les phénotypes.

La région des gliadines étant très complexe, il nous faut poursuivre nos efforts de séquençage long fragments de la région avec la technologie adaptive sampling pour développer des marqueurs pour ces gènes.

Nous ferons un répertoire de l'ensemble des allèles, même rares, du panel BWP3. Nous effectuerons une correspondance entre allèles SNP et PAGE. Nous proposerons ensuite un kit de marqueurs Kaspar pour faire un génotypage en routine des SNP associés aux variables liées à la qualité boulangère.

Trait	#Chr	Chr	Position (CS V2.1, bp)	Pvalue	R2LR	QTL
le	1	1A	509 017 352	9.40E-07	0.49	Glu_HMW-A
L	5	2B	745 716 941	2.19E-07	0.56	
L	15	5D	548 216 820	4.84E-07	0.52	CWI-5D
pPR.ProtTot_IRR	2	1B	94 458 186	6.01E-09	0.37	1RS/1BL(gli/LMW)
pPR.ProtTot_IRR	2	1B	105 538 550	6.01E-09	0.37	1RS/1BL(gli/LMW)
part.w5_DRY	3	1D	578 541	3.33E-09	0.39	gli/LMW
pN_gluTot.flour1_DRY	7	3A	724 660 462	6.02E-07	0.29	TGW6
pN_g.Nflour1_NO	8	3B	373 613 528	4.50E-07	0.32	TaLyc-B1
pN_g.Nflour1_NO	8	3B	774 409 784	4.32E-07	0.32	Red-3B
pN_g.Nflour1_NO	10	4A	263 086 190	4.72E-07	0.32	introggression dicoccoides
part.w5_DRY	11	4B	1 135 117	6.22E-09	0.38	Lox-B1
part.W1.2_IRR	13	5A	476 434 666	6.77E-07	0.30	nac27
pN_w5.Nflour1_N	14	5B	641 046 239	8.76E-07	0.30	SHP
part.w5_DRY	14	5B	703 647 253	7.25E-09	0.38	
part.w5_DRY	17	6B	10 754 025	7.96E-09	0.39	
qteN_w5.gr1_DRY	17	6B	514 027 602	4.38E-07	0.30	SAD

Table 3 : QTL liés aux protéines de réserve.
R2LR : part de variance du phénotype expliquée par le SNP.
Les caractères sont décodés dans la **Table S1**.

IV. Études d'association phénologie/maladies

1 Introduction

Les maladies les plus impactantes en France sont la rouille, la septoriose et la fusariose. Deux types de gènes de résistance ont été mis en évidence, les gènes de résistance plantule (SR : seedling resistance) et les gènes de résistance stade adulte (APR : adult plant resistance). Les gènes SR confèrent une résistance qualitative (monogénique) à une ou quelques souches par une réponse d'hypersensibilité (mort cellulaire). Les gènes APR confèrent une résistance quantitative à de nombreuses souches et sont par nature plus durables.

La pression de rouille jaune (*Puccinia striiformis f. Tritici*; Pst) (Bouvet *et al.*, 2022a, 2022b) augmente depuis 2011 en France avec l'apparition du pathotype d'origine exotique Warrior 1. Les contournements sont rapides et on ne connaît pas les QTLs/gènes responsables des résistances actuelles.

Les attaques de rouille brune (*Puccinia triticina*) sont plus tardives que la rouille jaune au champ et elle peut être difficile à noter sur des plantes sensibles à la rouille jaune. A ce jour, 80 gènes Lr ont été identifiés dans le blé (Aktar-Uz-Zaman *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2021) dont la plupart sont des SR contournés (Babayants *et al.*, 2015; Safavi and Afshari, 2013). Au moins 14 gènes Lr sont présents dans les variétés cultivées en France, seuls ou en combinaison (Goyeau and Lannou, 2011).

La fusariose (FHB; *Fusarium head blight*) causée par *Fusarium graminearum* affecte le rendement ainsi que la qualité du grain par l'accumulation de mycotoxines dans les grains non infectés (Dweba *et al.*, 2017). Plusieurs centaines de QTLs distribués sur tous les chromosomes ont été reportés (Bai *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2009; Löffler *et al.*, 2009).

Pour la septoriose (*Septoria tritici blotch*, STB), depuis quelques années, quelques variétés comme Cheignon,

LG_Absalon, KWS_Extase, RGT_Cesario se démarquent par leur très bon niveau de résistance durable. Mais même si les contournements sont plus progressifs que pour les rouilles, on observe une érosion du niveau de résistance relativement rapide pour certaines variétés (Mutic, Filon, Unik, Cellule, Rubisko) contournés quelques années après leur déploiement. La plupart des souches décrites actuellement sont virulentes sur les 23 gènes Stb connus (Battache *et al.*, 2022; Saintenac *et al.*, 2021, 2018). Certaines sont avirulentes sur un seul gène. Ceci suggère que la résistance due à un ou plusieurs gènes Stb est rapidement contournée (Brown *et al.*, 2015).

Mais la résistance peut aussi être due à l'accumulation d'allèle à effet faible. En effet, des centaines de QTLs ont été identifiés en population bi-parentale ou panel de diversité pour la rouille brune (Azzimonti *et al.*, 2014, 2013; Dweba *et al.*, 2017; Goyeau *et al.*, 2010; Niks *et al.*, 2015; Rollar *et al.*, 2021), la septoriose (Brown *et al.*, 2015) et la fusariose (Zheng *et al.*, 2021).

Le moyen de détection de sources résistantes le plus sûr actuellement reste la notation de la maladie au champ. Et la détection d'allèles favorables la plus solide se fait dans des descendances de croisements entre parents sensibles et résistants aux souches actuelles. Les études d'association sont intéressantes pour améliorer la résolution des QTLs par rapport aux populations bi-parentales mais peuvent produire une grosse proportion de faux positifs. Et elles ne permettent pas de détecter un effet significatif au niveau d'allèles rares, ce qui est limitant.

2 Matériel et méthode

Les maladies majeures ont été évaluées dans plusieurs essais répartis entre partenaires (Table 1).

Afin de différencier les QTL d'évitement des QTL de résistance, les études d'association ont été conduites sur le phénotype et les résidus du phénotype d'un modèle qui inclut précocité et hauteur. Le modèle utilisé est le même que celui décrit dans la partie I rendement.

3 Résultats

► Présence de barbe

Le QTL de la présence de barbe explique 87% du phénotype sur le chromosome 5A.

► Date d'épaison/Hauteur de plante

A part Ppd-D1 qui explique 36% de la date d'épaison, les autres QTL expliquent entre 8 et 10% de la variance (Table 2). Les QTL de hauteur expliquent entre 9 et 15% de la variance (Rht-B1, Rht-D1 et Rht8).

► Maladies

Pour la fusariose, la septoriose et la rouille jaune, le QTL le plus fort correspond à la région impliquée dans la photosensibilité et la hauteur Ppd-D1/Rht8 sur le chromosome 2D.

Lorsqu'on utilise un modèle avec la hauteur et la précocité en covariables, les QTL les plus intéressants ont été trouvés pour la rouille jaune, sur les chromosomes 6A et 2B. Il semble qu'il y ait une introgression sur le 2B présente dans le panel visible sur le bras court.

Les QTL maladie expliquent entre 4 et 11% de la variance du caractère (Table 3).

La plupart des QTL septoriose Ex-IGE colocalisent avec des QTLs publiés. Le QTL le plus important n'est pas décrit dans la littérature. Il se situe sur le chromosome 3A.

La plupart des QTL de fusariose ont été trouvés dans l'essai Limagrain 2019.

Quelques manhattan plots sont présentés en Annexe 1.

4 Discussion

Les données de génotypage seront imputées pour augmenter la puissance des études d'association.

Une méta-analyse des QTL de septoriose est en cours dans l'équipe INRAE GDEC MDC (Maladies Des Céréales). Il serait intéressant de faire une méta-analyse pour la rouille jaune également.

	Programme			Notations réalisées			Inoc. SEP	Inoc. FUS
	R17	R19	R20	2016-2017	2018-2019	2019-2020		
BASF								
Limagrain				SEP, YR, LR, PM			17	
Lidea	SEP	LR		SEP, LR, PM	BR		17	
Florimond Desprez		SEP	SEP		(SEP), YR	SEP, YR, BR		
Limagrain		FUS			FUS, YR			19
INRAE						YR (hors programme)		
KWS	FUS	SEP		FUS, PM	SEP, YR			17
R2N		SEP		SEP, YR	YR		17	
Secobra	FUS	YR	SEP	FUS	X	SEP		17
Syngenta		YR	YR		X	YR		

Table 1 : Liste des essais maladie.

Trait	#Chr	Chr	Position	Pvalue	R2LR	QTL
AWN	13	5A	698 508 163	6.70E-240	0.87	
HD	2	1B	676 950 510	3.73E-10	0.08	
HD	4	2A	576 652 403	9.31E-10	0.08	
HD	5	2B	52 122 752	5.98E-09	0.07	Ppd-B1
HD	6	2D	34 676 118	1.33E-50	0.36	Ppd-D1
HD	8	3B	52 457 571	9.37E-12	0.10	
HD	14	5B	511 291 951	9.91E-11	0.09	

Trait	#Chr	Chr	Position	Pvalue	R2LR	QTL
HD	15	5D	561 638 264	4.62E-10	0.08	
HD	20	7B	50 358 038	6.48E-11	0.09	
HD	20	7B	633 843 543	5.69E-11	0.09	
PH	6	2D	34 676 118	1.14E-18	0.15	Ppd-D1, Rht8
PH	11	4B	40 214 576	1.26E-11	0.09	Rht-B1
PH	12	4D	18 738 996	6.90E-14	0.11	Rht-D1

Table 2 : QTL phénologie. AWN : présence de barbes, HD : date d'épaison, PH : hauteur de plante

Une approche bi-parentale qui croise un parent résistant avec un parent récemment contourné semble la meilleure approche pour détecter les QTL importants pour résister aux races actuelles pour la rouille jaune et la septoriose. Il serait intéressant de faire un croisement entre deux parents possédant des allèles sensibles et résistants sur le QTL de septoriose du chromosome 3A par exemple pour le valider et les deux QTL rouille jaune 2B et 6A.

D'après le caractère très quantitatif de la fusariose, une approche de prédiction génomique devrait être testée.

Un jeu de données de qualité de génotypes et de phénotypes a été produit sur un large panel de diversité (485). Des analyses poussées ont été faites sur les données rendement. Les analyses sont encore en cours pour les

autres caractères. Un travail d'imputation et de méta-analyses avec d'autres jeux de données sera nécessaire pour valider les QTL, en particulier pour les caractères où nous avons évalué seulement 45 (alvéographe) ou 75 (protéines de réserve) individus. L'objectif est de détecter des géniteurs intéressants et de constituer un set de marqueurs diagnostiques pour optimiser le pre-breeding.

Accessibilité des données

Toutes les données de génotypage, de phénotypage et les résultats d'études d'association sont disponibles sur ce dépôt :

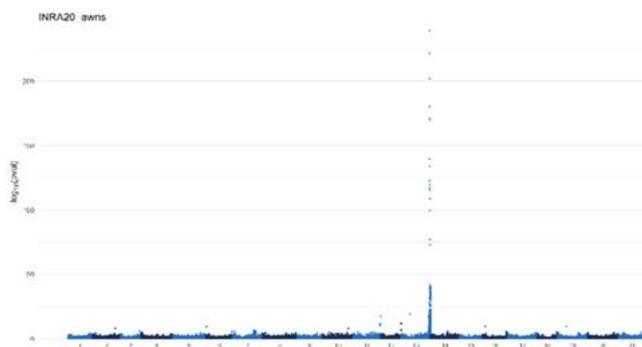
<https://entrepot.recherche.data.gouv.fr/dataset.xhtml?persistentId=doi:10.57745/VA8HMV>

Trait	#Chr	Chr	Position	Pvalue	R2LR	QTL
FUS	2	1B	587 089 444	1.29E-12	0.11	
FUS	5	2B	52 122 856	4.25E-13	0.11	
FUS	6	2D	34 676 118	1.30E-23	0.20	Ppd-D1, Rht8
FUS	8	3B	545 047 717	7.24E-11	0.09	
FUS	10	4A	600 976 627	8.78E-12	0.10	
FUS	14	5B	511 291 951	9.95E-13	0.11	
FUS	16	6A	551 943 682	2.89E-12	0.11	
FUS	17	6B	90 568 781	1.80E-12	0.11	
FUS	17	6B	717 891 974	4.32E-11	0.10	
FUS	20	7B	633 677 649	8.69E-12	0.10	
PM	1	1A	502 825 832	1.04E-12	0.11	
PM	13	5A	472 169 023	3.73E-12	0.10	
RJ	1	1A	468 407 947	5.65E-07	0.05	
RJ	3	1D	3 228 464	2.96E-07	0.06	Lr21
RJ	5	2B	68 374 877	3.13E-08	0.06	Ppd-B1
RJ	5	2B	137 932 382	1.95E-08	0.06	
RJ	5	2B	423 910 387	1.47E-07	0.04	Sr36
RJ	5	2B	692 714 733	1.94E-08	0.05	Yr7
RJ	5	2B	715 969 646	1.16E-08	0.05	YrSP
RJ	6	2D	33 955 687	1.54E-09	0.08	Ppd-D1
RJ	6	2D	547 423 316	3.29E-07	0.05	
RJ	9	3D	43 023 115	5.36E-07	0.05	
RJ	11	4B	521 608 690	2.12E-07	0.06	
RJ	13	5A	19 176 283	6.30E-07	0.06	
RJ	13	5A	487 696 937	9.77E-07	0.05	
RJ	13	5A	623 378 074	6.93E-07	0.05	
RJ	14	5B	43 638 059	2.74E-08	0.06	
RJ	14	5B	381 077 636	9.88E-07	0.05	Ne1
RJ	14	5B	440 210 891	7.08E-07	0.07	
RJ	16	6A	526 369 232	4.86E-08	0.06	Sr26
RJ	16	6A	613 075 235	6.10E-10	0.08	Sr13
RJ	18	6D	23 360 660	4.93E-08	0.06	
ST	2	1B	146 004 631	6.22E-07	0.08	wmc0626, Kollers <i>et al.</i> (2013)
ST	3	1D	361 475 043	9.15E-07	0.05	TraesCS1D01G265800, TraesCS1D01G266000, Brennan <i>et al.</i> (2020)
ST	5	2B	589 099 322	7.87E-07	0.05	QStb.ihar-2B.5, Piaszkowska <i>et al.</i> (2021)
ST	5	2B	681 047 323	4.23E-08	0.07	QStb.teagasc-2B.1, Stadlmeier <i>et al.</i> (2019)
ST	5	2B	756 026 847	1.77E-08	0.10	Stb9
ST	6	2D	34 676 118	3.04E-09	0.07	Ppd-D1
ST	7	3A	146 598 677	5.59E-07	0.08	QSTB.16, Mekonnen <i>et al.</i> (2021)
ST	7	3A	467 773 523	5.53E-07	0.05	QStb.wai.3A.2, Yang <i>et al.</i> (2022)
ST	7	3A	534 986 495	5.05E-10	0.08	
ST	7	3A	653 840 752	4.84E-08	0.07	
ST	9	3D	395 007 366	3.27E-08	0.10	
ST	13	5A	472 485 773	7.81E-07	0.06	QStb.cim-5AL-1, Dreisigacker <i>et al.</i> (2015)
ST	14	5B	439 993 368	2.63E-07	0.06	QTL-5BL, Mergoum <i>et al.</i> (2013), PGV_25, Yates <i>et al.</i> (2019)
ST	14	5B	596 724 405	2.24E-07	0.07	QStb.teagasc-5B.1, Riaz <i>et al.</i> (2020)
ST	16	6A	14 301 074	4.26E-08	0.10	QStb.ihar-6A, Radecka-Janusik <i>et al.</i> (2014)
ST	17	6B	77 872 165	5.99E-08	0.06	MQTL21, Goudemand <i>et al.</i> (2013)
ST	19	7A	76 126 109	2.82E-07	0.09	MQTL24, Goudemand <i>et al.</i> (2013)
ST	19	7A	729 488 814	3.80E-07	0.08	pQStb.wai.7A.2, Yang <i>et al.</i> (2022)
ST	20	7B	625 716 792	1.50E-08	0.10	QTL_7B_2 Karlstedt <i>et al.</i> (2019)
ST	20	7B	711 287 379	9.06E-07	0.05	Stb8? 721-753Mb, Adhikari <i>et al.</i> (2003); Qstb.renan-7B, Langlands-perry <i>et al.</i> (2022); wPt-2356, Arraiano et Brown (2017)
ST	21	7D	113 154 201	2.57E-07	0.09	Stb5? 50-98Mb, Arraiano <i>et al.</i> (2001)
ST	21	7D	636 138 983	1.25E-07	0.06	MQTL27, Goudemand <i>et al.</i> (2013)

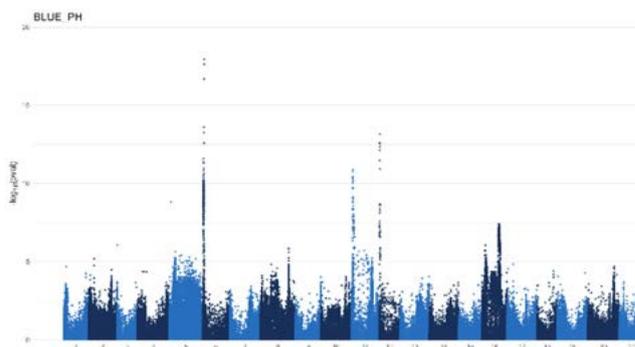
Table 3 : QTL maladies. FUS : fusariose, RJ : rouille jaune, ST : septoriose, PM : oïdium.

Annexe 1 : Manhattan plots

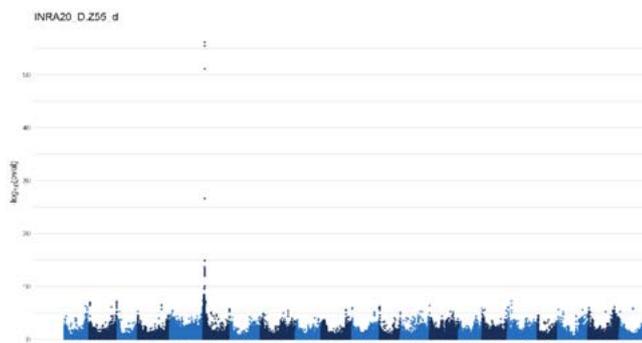
Présence de barbes



Hauteur de plante

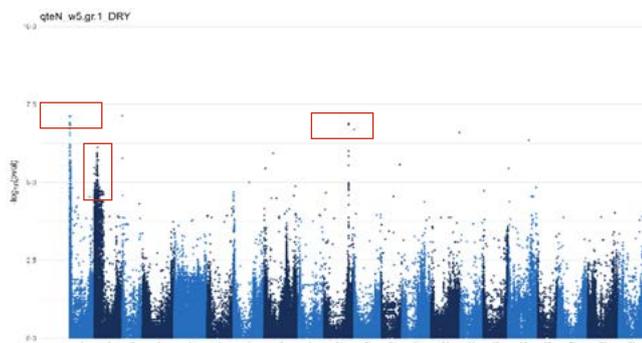


Date d'épiaison

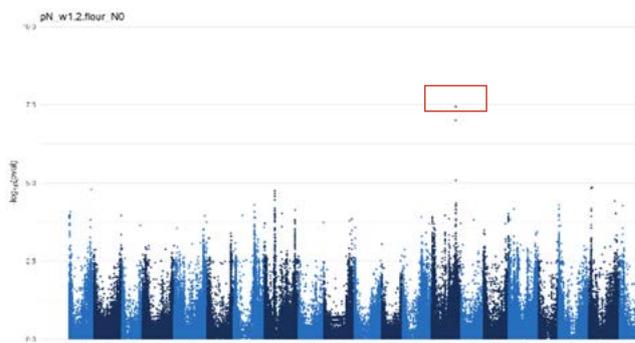


Protéines de réserve

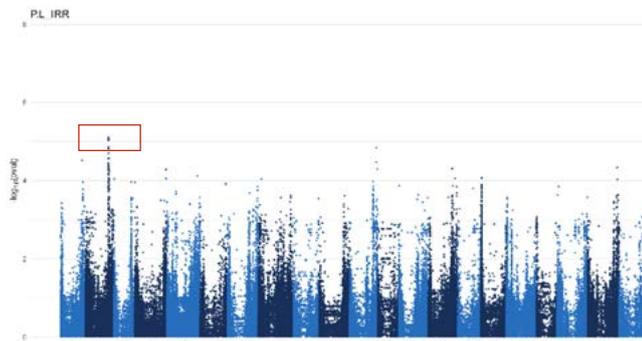
quantité de gliadines omega5 dans le grain



quantité de gliadines omega 1.2 dans le grain

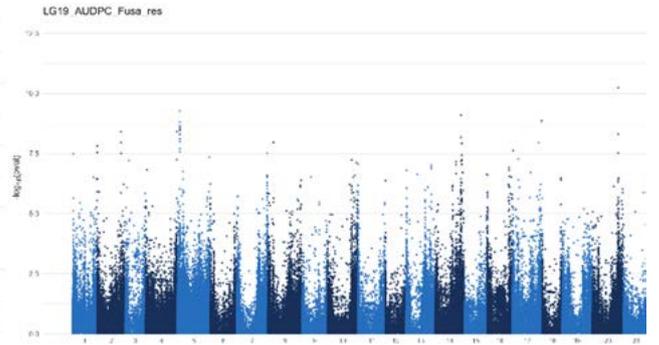
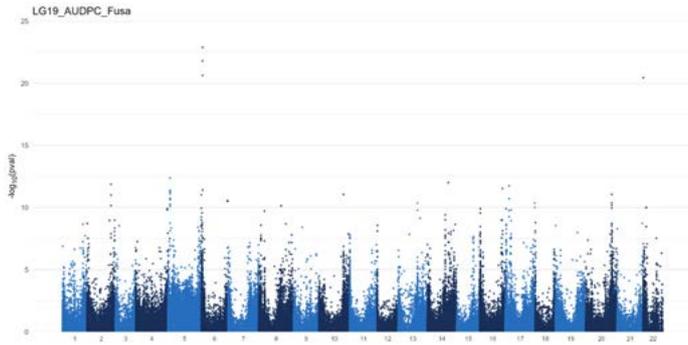


rapport P/L

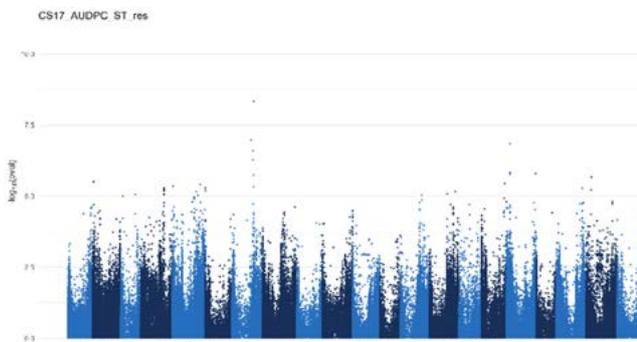
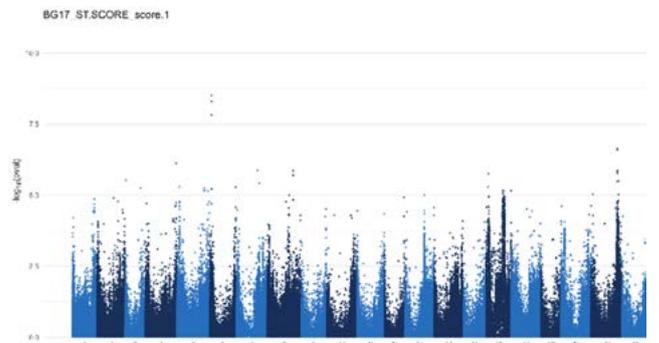
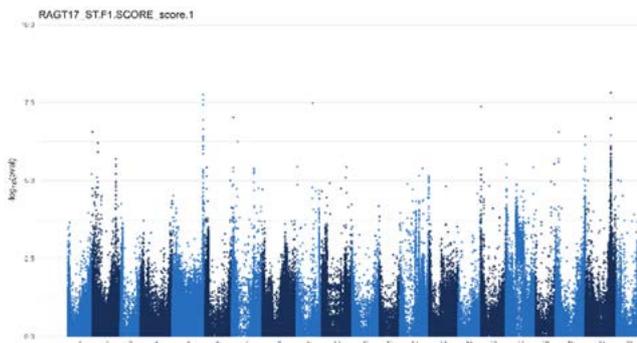


Fusariose

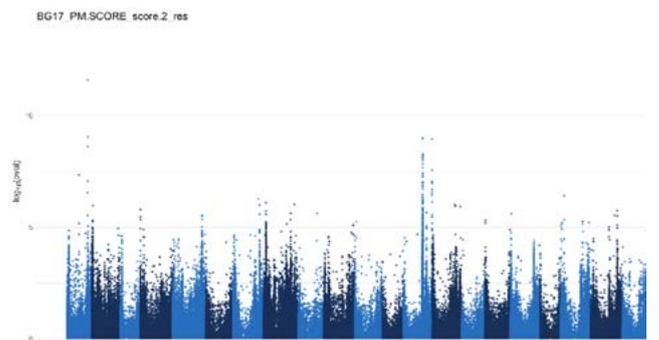
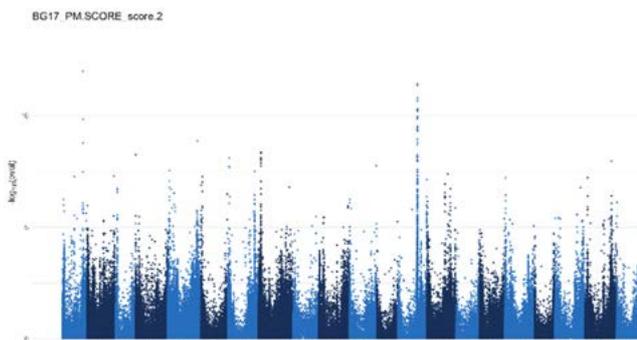
res : résidus d'un modèle avec hauteur et précocité en covariables



Septoriose



Oïdium



Rouille jaune

Ppd-D1 sur chromosome 2D

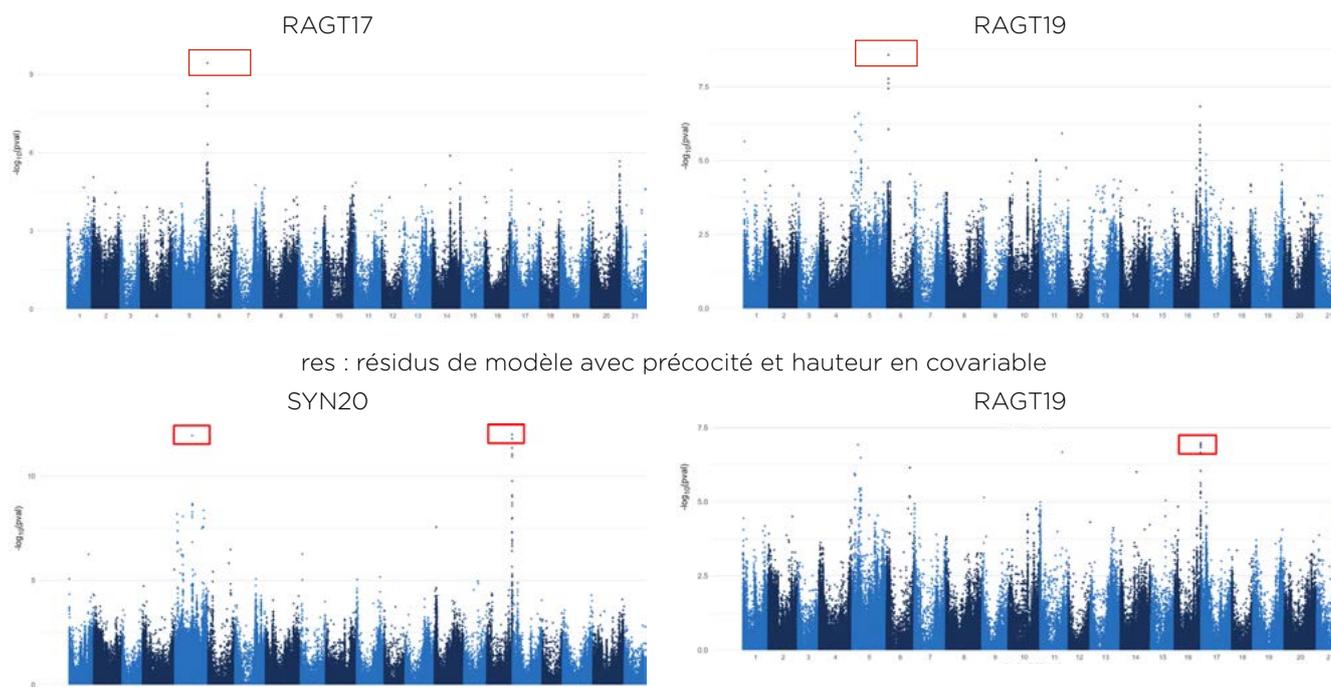


Table S1 : Variables liées aux protéines de réserve mesurées par RP-HPLC

Abbréviation	Caractère
HMW-LMW	rapport HMW/LMW
part.HMW	pourcentage de l'air des HMW sur l'air total des Glu
part.LMW	pourcentage de l'air des LMW sur l'air total des Glu
pN_HMW.flour	pourcentage d'azote correspondant aux HMW dans la farine
pN_LMW.flour	pourcentage d'azote correspondant aux LMW dans la farine
pN_gluTot.flour	pourcentage d'azote correspondant aux gluténines dans la farine
pN_HMW.Nflour	pourcentage d'azote de HMW par rapport à l'azote total de la farine
pN_LMW.Nflour	pourcentage d'azote de LMW par rapport à l'azote total de la farine
pN_gluTot.Nflour	pourcentage d'azote de gluténines par rapport à l'azote total de la farine
qteN_HMW.gr	quantité d'azote allouée aux HMW dans un grain moyen
qteN_LMW.gr	quantité d'azote allouée aux LMW dans un grain moyen
qteN_glu.gr	quantité d'azote allouée aux gluténines dans un grain moyen
part.w5	pourcentage de l'air des w5 sur l'air total des Gli
part.w1.2	pourcentage de l'air des w1,2 sur l'air total des Gli
part.ab	pourcentage de l'air des ab sur l'air total des Gli
part.g	pourcentage de l'air des g sur l'air total des Gli
pN_w5.flour	pourcentage d'azote de w5 par rapport à l'azote total de la farine
pN_w1-2.flour	pourcentage d'azote de w1,2 par rapport à l'azote total de la farine
pN_ab.flour	pourcentage d'azote de α par rapport à l'azote total de la farine
pN_g.flour	pourcentage d'azote de γ par rapport à l'azote total de la farine
pN_gliTot.flour	pourcentage d'azote de gliadines par rapport à l'azote total de la farine

Abbréviation	Caractère
pN_w5.Nflour	pourcentage d'azote correspondant aux w5 dans la farine
pN_w1-2.Nflour	pourcentage d'azote correspondant aux w1,2 dans la farine
pN_ab.Nflour	pourcentage d'azote correspondant aux α dans la farine
pN_g.Nflour	pourcentage d'azote correspondant aux γ dans la farine
pN_gliTot.Nflour	pourcentage d'azote correspondant aux gliadines dans la farine
qteN_w5.gr	quantité d'azote allouée aux w5 dans un grain moyen
qteN_w1-2.gr	quantité d'azote allouée aux w1,2 dans un grain moyen
qteN_ab.gr	quantité d'azote allouée aux α dans un grain moyen
qteN_g.gr	quantité d'azote allouée aux γ dans un grain moyen
qteN_gliTot.gr	quantité d'azote allouée aux gliadines dans un grain moyen
gli-glu_pN.flour	rapport Gli/Glu calculé avec les données de pN.flour
gli-glu_pN.Nflour	rapport Gli/Glu calculé avec les données de pN.Nflour
gli-glu_qteN.gr	rapport Gli/Glu calculé avec les données de qteN.gr
pPR.ProtTot	pourcentage des protéines de réserve en fonction des protéines totales corrigé par les rendement d'extraction
pGlu.PR	pourcentage des Gluténines en fonction des protéines de réserve corrigé par les rendement d'extraction
pGli.PR	pourcentage des Gliadines en fonction des protéines de réserve corrigé par les rendement d'extraction
L	extensibilité
W	force boulangère
P/L	ténacité/extensibilité
le	élasticité

Références bibliographiques

Diversité blé tendre

Balfourier, F., Bouchet, S., Robert, S., De Oliveira, R., Rimbart, H., Kitt, J., Choulet, F., Paux, E., 2019. Worldwide phylogeography and history of wheat genetic diversity. *Sci Adv* 5, eaav0536. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav0536>

Prédictions génomiques et GxE

Asseng S, Martre P, Maiorano A, et al (2019) Climate change impact and adaptation for wheat protein. *Global Change Biology* 25:155-173.

Bhat JA, Ali S, Salgotra RK, et al (2016) Genomic Selection in the Era of Next Generation Sequencing for Complex Traits in Plant Breeding. *Frontiers in Genetics* 7:221

Cobb JN, Juma RU, Biswas PS, et al (2019) Enhancing the rate of genetic gain in public-sector plant breeding programs: lessons from the breeder's equation. *Theor Appl Genet* 132:627-645.

Cullis BR, Smith AB, Coombes NE (2006) On the design of early generation variety trials with correlated data. *JABES* 11:381.

Dias KOG, dos Santos JPR, Krause MD, et al (2022) Leveraging probability concepts for cultivar recommendation in multi-environment trials. *Theor Appl Genet* 135:1385-1399.

Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, et al (2011) A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLOS ONE* 6:e19379.

Gerke JP, Edwards JW, Guill KE, et al (2015) The Genomic Impacts of Drift and Selection for Hybrid Performance in Maize. *Genetics* 201:1201-1211.

Glaszmann J, Kilian B, Upadhyaya H, Varshney R (2010) Accessing genetic diversity for crop improvement. *Current Opinion in Plant Biology* 13:167-173.

Gollob HF (1968) A statistical model which combines features of factor analytic and analysis of variance techniques. *Psychometrika* 33:73-115.

Guo T, Mu Q, Wang J, et al (2020) Dynamic effects of interacting genes underlying rice flowering-time phenotypic plasticity and global adaptation. *Genome Research* 30:gr.255703.119.

Kitt J, Danguy Des Déserts A, Bouchet S, et al (2021) Genotyping of 4,506 bread wheat accessions with the TaBW410K SNP array. Zenodo.

Li X, Guo T, Mu Q, et al (2018) Genomic and environmental determinants and their interplay underlying phenotypic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115:6679-6684.

Li X, Guo T, Wang J, et al (2021) An integrated framework reinstating the environmental dimension for GWAS and genomic selection in crops. *Molecular Plant* 14:874-887.

Longin CFH, Reif JC (2014) Redesigning the exploitation of wheat genetic resources. *Trends in Plant Science* 19:631-636.

Ly D, Chenu K, Gauffreteau A, et al (2017) Nitrogen nutrition index predicted by a crop model improves the genomic prediction of grain number for a bread wheat core collection. *Field Crops Research* 214:331-340.

McCouch S, Baute GJ, Bradeen J, et al (2013) Feeding the future. *Nature* 499:23-24.

Parent B, Leclere M, Lacube S, et al (2018) Maize yields over Europe may increase in spite of climate change, with an appropriate use of the genetic variability of flowering time. *PNAS* 201720716.

Piepho H-P, Blancon J (2023) Extending Finlay-Wilkinson regression with environmental covariates. *Plant Breeding* 142:621-631.

Ray DK, Ramankutty N, Mueller ND, et al (2012) Recent patterns of crop yield growth and stagnation. *Nature Communications* 3:1293.

Reif JC, Zhang P, Dreisigacker S, et al (2005) Wheat genetic diversity trends during domestication and breeding. *Theor Appl Genet* 110:859-864.

Rimbart H, Darrier B, Navarro J, et al (2018) High throughput SNP discovery and genotyping in hexaploid wheat. *PLOS ONE* 13:e0186329.

Rincent R, Malosetti M, Ababaei B, et al (2019) Using crop growth model stress covariates and AMMI decomposition to better predict genotype-by-environment interactions. *Theor Appl Genet* 132:3399-3411.

Smith A, Cullis B, Gilmour A (2001) Applications: The Analysis of Crop Variety Evaluation Data in Australia. *Australian & New Zealand Journal of Statistics* 43:129-145.

Soenen B, Le Bris X, Laberdesque M, et al (2016) « CHN », a crop model to jointly manage water and nitrogen on winter wheat

VanRaden PM (2008) Efficient Methods to Compute Genomic Predictions. *Journal of Dairy Science* 91:4414-4423.

Wang C, Hu S, Gardner C, Lübberstedt T (2017) Emerging Avenues for Utilization of Exotic Germplasm. *Trends in Plant Science* 22:624-637.

GWAS - caractères agronomique

Cormier F, Le Gouis J, Dubreuil P, et al (2014) A genome-wide identification of chromosomal regions determining nitrogen use efficiency components in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 127:2679-2693. <https://doi.org/10/f6qgfm>

Rincent R, Moreau L, Monod H, et al (2014) Recovering Power in Association Mapping Panels with Variable Levels of Linkage Disequilibrium. *Genetics* 197:375-387. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.159731>

Sun G, Zhu C, Kramer MH, et al (2010) Variation explained in mixed-model association mapping. *Heredity* 105:333-340. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.11>

Yu J, Pressoir G, Briggs WH, et al (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat Genet* 38:203-208. <https://doi.org/10/d8npfr>

Qualité boulangère

Bordes J, Branlard G, Oury FX, Charmet G, Balfourier F (2008) Agronomic characteristics, grain quality and flour rheology of 372 bread wheats in a worldwide core collection. *J Cereal Sci* 48 : 569-579.

Bordes J, Ravel C, Le Gouis J, Lapierre A, Charmet G, Balfourier F (2011) Use of a global wheat core collection for association analysis of flour and dough quality traits. *Journal of Cereal Science* 54 : 137-147.

Branlard G, Dardevet M (1985) Diversity of grain protein and bread wheat quality .2. Correlation between high molecular-weight subunits of glutenin and flour quality characteristics. *J Cereal Sci* 3:345-354

Branlard G, Dardevet M, Saccomano R, Lagoutte F, Gourdon J (2001) Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. *Euphytica* 119 : 59-67.

Charmet G, Robert N, Branlard G, Linossier L, Martre P, Triboui E (2005) Genetic analysis of dry matter and nitrogen accumulation and protein composition in wheat kernels. *Theoretical and Applied Genetics* 111 : 540-550.

Johansson E, Malik AH, Hussain A, Rasheed F, Newson WR, Plivelic T, Hedenqvist MS, Gällstedt M, Kuktaite R (2013). Wheat Gluten Polymer Structures: The Impact of Genotype, Environment, and Processing on Their Functionality in Various Applications. *Cereal Chemistry*, 90:367–376. <https://doi.org/10/f22djp>

Payne PI, Nightingale MA, Krattiger AF, Holt LM (1987) The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. *J Sci Food Agric* 40 (1):51-65

Pirozi M, Margiotta B, Latiandra D, MacRitchie F (2008) Composition of polymeric proteins and bread-making quality of wheat lines with allelic HMW-GS differing in number of cysteines. *J Cereal Sci* 48: 117-122

Plessis A, Ravel C, Duchateau N, Dardevet M, Bordes J, Rhazi L, Balfourier F, Martre P (2013) Association study of wheat grain protein composition reveals that gliadin and glutenin composition are trans-regulated by different chromosome regions. *J Exp Bot*

Oury, F.-X., Chiron, H., Faye, A., Gardet, O., Giraud, A., Heumez, E., Rolland, B., Rousset, M., Trottet, M., Charmet, G., et al. (2010). The prediction of bread wheat quality: joint use of the phenotypic information brought by technological tests and the genetic information brought by HMW and LMW glutenin subunits. *Euphytica* 171, 87-109.

Ravel C, Faye A, Ranoux M, Dardevet M, Dupuits C, Exbrayat F, Poncet C, Sourdille P, Branlard G 2020 SNP markers for early identification of high molecular weight glutenin subunits (HMW-GSs) in bread wheat. *Theor Appl Genet* 133: 751-770. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03505-y>

GWAS - Maladies

Adhikari T. B., Anderson J. M., et Goodwin S. B., « Identification and molecular mapping of a gene in wheat conferring resistance to *Mycosphaerella graminicola* », *Phytopathology*, vol. 93, no 9, p. 1158-1164, 2003, doi: <https://doi.org/10.1094/PHTO.2003.93.9.1158>.

Arraiano L. S. et Brown J. K., « Sources of resistance and susceptibility to *Septoria tritici* blotch of wheat », *Mol. Plant Pathol.*, vol. 18, no 2, p. 276-292, 2017, doi: <https://doi.org/10.1111/mp.12482>.

Aktar-Uz-Zaman, M., Tuhina-Khatun, M., Hanafi, M.M., Sahebi, M., 2017. Genetic analysis of rust resistance genes in global wheat cultivars: an overview. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 31, 431-445. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1304180>

Azzimonti, G., Lannou, C., Sache, I., Goyeau, H., 2013. Components of quantitative resistance to leaf rust in wheat cultivars: diversity, variability and specificity. *Plant Pathology* 62, 970-981. <https://doi.org/10.1111/ppa.12029>

Azzimonti, G., Marcel, T.C., 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 Breeding* 34, 549-567. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0057-8>

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. *Chilean journal of agricultural research* 75, 443-450. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392015000500009>

Bai, G., Su, Z., Cai, J., 2018. Wheat resistance to *Fusarium* head blight. *Canadian Journal of Plant Pathology* 40, 336-346. <https://doi.org/10.1080/07060661.2018.1476411>

Battache, M., Lebrun, M.-H., Sakai, K., Soudière, O., Cambon, F., Langin, T., Saintenac, C., 2022. Blocked at the Stomatal Gate, a Key Step of Wheat Stb16q-Mediated Resistance to *Zymoseptoria tritici*. *Front Plant Sci* 13, 921074. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.921074>

Bouvet, L., Holdgate, S., James, L., Thomas, J., Mackay, I.J., Cockram, J., 2022a. The evolving battle between yellow rust and wheat: implications for global food security. *Theor Appl Genet* 135, 741-753. <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03983-z>

Bouvet, L., Percival-Alwyn, L., Berry, S., Fenwick, P., Mantello, C.C., Sharma, R., Holdgate, S., Mackay, I.J., Cockram, J., 2022b. Wheat genetic loci conferring resistance to stripe rust in the face of genetically diverse races of the fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Theoretical and Applied Genetics* 1-19.

Brennan et al. 2020 <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00433>

Brown, J.K.M., Chartrain, L., Lasserre-Zuber, P., Saintenac, C., 2015. Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genetics and Biology, Septoria tritici* blotch disease of wheat: Tools and techniques to study the pathogen *Zymoseptoria tritici* 79, 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.017>

Dreisigacker S., Wang X., Martinez Cisneros B. A., Jing R., et Singh P. K., « Adult-plant resistance to *Septoria tritici* blotch in hexaploid spring wheat », *Theor. Appl. Genet.*, vol. 128, no 11, p. 2317-2329, 2015. Dweba, C.C., Figlan, S., Shimelis, H.A., Motaung, T.E., Sydenham, S., Mwadzingeni, L., Tsilo, T.J., 2017. *Fusarium* head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. *Crop Protection* 91, 114-122. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.002>

Goudemand E. et al., « Association mapping and meta-analysis: two complementary approaches for the detection of reliable *Septoria tritici* blotch quantitative resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) », *Mol. Breed.*, vol. 32, no 3, p. 563-584, 2013, doi: <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9890-4>. 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, 45-62. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0261-5>

Goyeau, H., Lannou, C., Pariaud, B., Azzimonti, G., Du Cheyron, P., Couleaud, G., Maumené, C., 2010. Blé et résistance variétale, le cas de la rouille brune. La résistance génétique du blé à la rouille brune causée par *Puccinia triticina* : comment évaluer sa durabilité pour mieux la gérer ?

- Karlstedt F., Kopahnke D., Perovic D., Jacobi A., Pillen K., et Ordon F.**, « Mapping of quantitative trait loci (QTL) for resistance against *Zymoseptoria tritici* in the winter spelt wheat accession HTRI1410 (*Triticum aestivum* subsp. *spelta*) », *Euphytica*, vol. 215, no 6, p. 1 15, 2019, doi: <https://doi.org/10.1007/s10681-019-2432-3>. Kollers *et al.*, « Genetic architecture of resistance to *Septoria tritici* blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in European winter wheat », *Mol. Breed.*, vol. 32, no 2, p. 411 423, 2013, doi: <https://doi.org/10.1007/s11032-013-9880-6>.
- Langlands-Perry C. et al.**, « 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*, vol. 13, p. 100, 2022, doi: <https://doi.org/10.3390/genes13010100>.
- Kumar, S., Bhardwaj, S.C., Gangwar, O.P., Sharma, A., Qureshi, N., Kumaran, V.V., Khan, H., Prasad, P., Miah, H., Singh, G.P., Sharma, K., Verma, H., Forrest, K.L., Trethowan, R.M., Bariana, H.S., Bansal, U.K.**, 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, 849–858. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03735-5>
- Liu, S., Hall, M.D., Griffey, C.A., McKendry, A.L.**, 2009. Meta-Analysis of QTL Associated with Fusarium Head Blight Resistance in Wheat. *Crop Science* 49, 1955–1968. <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.03.0115>
- Löffler, M., Schön, C.-C., Miedaner, T.**, 2009. Revealing the genetic architecture of FHB resistance in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) by QTL meta-analysis. *Mol Breeding* 23, 473–488. <https://doi.org/10.1007/s11032-008-9250-y>
- Mergoum et al.** (2013) <https://doi.org/10.1556/CRC.2013.0005>
- Mekonnen T. et al.**, « Genome-wide association study reveals novel genetic loci for quantitative resistance to *septoria tritici* blotch in wheat (*Triticum aestivum* L.) », *Front. Plant Sci.*, p. 1970, 2021, doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.671323>.
- Niks, R.E., Qi, X., Marcel, T.C.**, 2015. Quantitative Resistance to Biotrophic Filamentous Plant Pathogens: Concepts, Misconceptions, and Mechanisms. *Annual Review of Phytopathology* 53, 445–470. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-115928>
- Piaskowska et al.** (2021) <https://doi.org/10.3390/agronomy11061108>
- Radecka-Janusik M. et Czembor P. C.** « Genetic mapping of quantitative trait loci (QTL) for resistance to *Septoria tritici* blotch in a winter wheat cultivar Liwilla », *Euphytica*, vol. 200, no 1, p. 109 125, 2014, doi: <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1157-6>.
- Riaz et al.** « Genetic analysis using a multi-parent wheat population identifies novel sources of *septoria tritici* blotch resistance », *Genes*, vol. 11, no 8, p. 887, 2020, doi: <https://doi.org/10.3390/genes11080887>.
- 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, 37–51. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03657-2>
- Safavi, S.A., Afshari, F.**, 2013. Virulence factors of *Puccinia triticina* on wheat and effectiveness of Lr genes for leaf rust resistance in Ardabil. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 46, 1246–1254. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.764055>
- 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. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20685-0>
- 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.**, 2018. Wheat receptor-kinase-like protein *Stb6* controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Nature genetics* 50, 368.
- Stadlmeier M., Jørgensen L. N., Corsi B., Cockram J., Hartl L., et Mohler V.** « Genetic dissection of resistance to the three fungal plant pathogens *Blumeria graminis*, *Zymoseptoria tritici*, and *Pyrenophora tritici-repentis* using a multiparental winter wheat population », *G3 Genes Genomes Genet.*, vol. 9, no 5, p. 1745 1757, 2019, doi: <https://doi.org/10.1534/g3.119.400068>.
- Yang N., Ovenden B., Baxter B., McDonald M. C., Solomon P. S., et Milgate A.** « Multi-stage resistance to *Zymoseptoria tritici* revealed by GWAS in an Australian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) diversity panel », *bioRxiv*, 2022, doi: <https://doi.org/10.1101/2022.06.29.498182>.
- Yates S. et al.**, « Precision phenotyping reveals novel loci for quantitative resistance to *septoria tritici* blotch », *Plant Phenomics*, vol. 2019, 2019, doi: <https://doi.org/10.34133/2019/3285904>.
- Zheng, T., Hua, C., Li, L., Sun, Z., Yuan, M., Bai, G., Humphreys, G., Li, T.**, 2021. Integration of meta-QTL discovery with omics: Towards a molecular breeding platform for improving wheat resistance to *Fusarium* head blight. *The Crop Journal* 9, 739–749. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2020.10.006>

ExIGE : Evaluation multi-environnementale de blé tendre « exotique » - prédictions génomiques GxÉ et génétique d'association

Justin BLANCON¹, Jonathan KITT¹, Pauline LASSERRE-ZUBER¹, David ALVAREZ¹, Sibille PERROCHON¹, Jean-Noël THAUVIN², Céline DUQUE³, Sylvie DUTRIEZ⁴, Pascal GIRAudeau⁵, Ellen GOUEMAND-DUGUE⁶, Emmanuel HEUMEZ⁷, Christophe MICHELET², Patrice SENELLART⁸, Alexis OGER⁹, François BALFOURIER¹, Catherine RAVEL¹, Sophie BOUCHET^{1*}

1 - INRAE Université Clermont-Auvergne, UMR 1095, GDEC, 5 chemin de Beaulieu, 63100 Clermont-Ferrand, FRANCE

2 - RAGT, Rue Emile Singla, BP 3331 120333 Rodez Cedex 9, FRANCE

3 - Limagrain Europe, Centre de recherche de Chappes, 63720 Chappes, FRANCE

4 - Lidea Seeds, avenue Gaston Phoebus, 64230 Lescar, FRANCE

5 - Secobra Recherches, Centre de Bois-Henry, 78580 Maule, FRANCE

6 - FLORIMOND DESPREZ VEUVE & FILS, 59242 Cappel-en-Pévèle, FRANCE

7 - INRAE UE GCIE, 2 chaussée Brunehaut, Estrées Mons, BP50136,80203 Peronne Cedex, FRANCE

8 - KWS MOMONT SAS, 7 Rue de Martinval, 59246 Mons-en-Pévèle, FRANCE

9 - Syngenta France SA, 1228 Chemin de l'Hobit, 31790 Saint-Sauveur, FRANCE

*Coordonateur : Sophie BOUCHET, sophie.bouchet@inrae.fr

Introduction

Face à l'instabilité et la stagnation des rendements de blé tendre, il est nécessaire de réintroduire une diversité utile en sélection pour améliorer la tolérance aux stress biotiques et abiotiques mais aussi la qualité boulangère. En raison de l'impact majeur des interactions Génotype x Environnement, ces réintroductions doivent s'opérer dans les environnements adéquats pour maximiser le gain génétique. Dans le projet ExIGE, nous avons caractérisé un panel de diversité mondiale enrichi en accessions asiatiques (Figure 4), au champ (rendement, maladies, variables liées à la qualité boulangère) et au laboratoire (SNP Breedwheat, RNaseq DeBAT). L'objectif principal était de calibrer un modèle de prédiction génomique GxÉ permettant de prédire de nouveaux individus dans de nouveaux environnements pour le rendement. Le deuxième objectif est d'identifier les déterminants génétiques des caractères d'intérêt majeur du blé tendre (rendement, maladies, qualité boulangère).

Réseau d'essais

Au cours de ce projet nous avons complété un jeu de données phénotypiques issu de 12 essais menés lors du projet PIA BreedWheat en conditions fort vs faible azote ou pluvial vs irrigué, avec 12 nouveaux essais dans des conditions similaires (Figure 1). Le réseau constitué a permis d'observer une large gamme de rendement, avec des essais assez peu corrélés, mais sans structure d'interaction marquée.

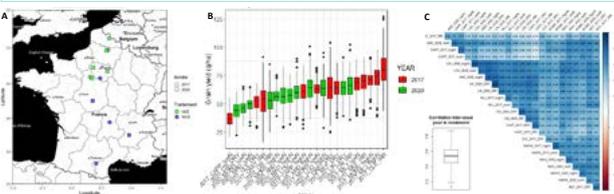


Figure 1 - (A) Répartition du réseau d'essais en France. La forme des points indique l'année et la couleur la contrainte abiotique appliquée ; (B) Gamme de variation pour le rendement. La couleur indique l'année ; (C) Matrice de corrélation entre chaque essai pour le rendement. Le boxplot montre la gamme de corrélation (r)

Caractérisation environnementale

Les données météorologiques, de description du sol et d'itinéraire technique ont été utilisées pour simuler 192 des indices environnementaux à l'aide du modèle éco-physiologique CHN (Arvalis). Ces indices ont été estimés par phase de développement à l'aide des données mesurées pour l'épave. L'évolution du confort hydrique et azoté a été estimée tout au long du cycle (Figure 2) et montre que la plupart des essais a subi un stress hydrique nul, faible ou tardif, à l'exception de GLE_2017_DRY, MAU_2020, MONS_2017 et MONS_2020. Le stress azoté a également été très limité dans le réseau et principalement présent sur les essais MONS_2017_lowN et MONS_2020_lowN.

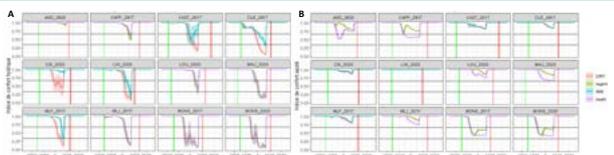


Figure 2 - Evolution de l'indice de confort hydrique (A) et azoté (B) au cours du cycle de la plante. Une valeur de 1 indique le confort et une valeur inférieure indique un stress : faible au-dessus de 0,66, modéré entre 0,66 et 0,33 et fort en-dessous

Prédictions génomiques GxÉ

Une approche de prédiction génomique basée sur un modèle AMMI (Additive Main effect and Multiplicative Interaction, (Gollob 1968)) a été évaluée à l'aide de 8 modèles différents (Table 1). Ces modèles se différencient par la modélisation de la matrice d'interactivité génétique. Ils utilisent une matrice Kinship (modèles 1, 2, 3, 4 et 6), une matrice issue de l'approche AMMI (modèles 5, 6, 7 et 8), une matrice construite sur les indices environnementaux (modèles 3, 4 et 5). La predictive ability de ces modèles estimée par cross-validation dans différents scénarios de prédiction (Table 2) indique que l'approche AMMI semble prometteuse avec un gain théorique de prédictive ability de +0,2 en moyenne dans les 4 scénarios par rapport au GBLUP. Mais en pratique le gain reste minime (gain maximum de 0,08) car les matrices d'interactivité génétique et environnementale sont difficiles à prédire.

Modèle	scénario	GBLUP	AMMI	AMMI
Modèle 1	Env	0,67	0,62	0,66
	Env+G	0,76	0,62	0,68
	Env+G+K	0,73	0,52	0,60
	Env+G+K+I	0,70	0,54	0,56
Modèle 2	Env	0,67	0,62	0,66
	Env+G	0,76	0,62	0,68
	Env+G+K	0,73	0,52	0,60
	Env+G+K+I	0,70	0,54	0,56
Modèle 3	Env	0,67	0,62	0,66
	Env+G	0,76	0,62	0,68
	Env+G+K	0,73	0,52	0,60
	Env+G+K+I	0,70	0,54	0,56
Modèle 4	Env	0,67	0,62	0,66
	Env+G	0,76	0,62	0,68
	Env+G+K	0,73	0,52	0,60
	Env+G+K+I	0,70	0,54	0,56
Modèle 5	Env	0,67	0,62	0,66
	Env+G	0,76	0,62	0,68
	Env+G+K	0,73	0,52	0,60
	Env+G+K+I	0,70	0,54	0,56
Modèle 6	Env	0,67	0,62	0,66
	Env+G	0,76	0,62	0,68
	Env+G+K	0,73	0,52	0,60
	Env+G+K+I	0,70	0,54	0,56
Modèle 7	Env	0,67	0,62	0,66
	Env+G	0,76	0,62	0,68
	Env+G+K	0,73	0,52	0,60
	Env+G+K+I	0,70	0,54	0,56
Modèle 8	Env	0,67	0,62	0,66
	Env+G	0,76	0,62	0,68
	Env+G+K	0,73	0,52	0,60
	Env+G+K+I	0,70	0,54	0,56

Table 1 (gauche) - Liste des 8 modèles comparés et modélisation de la variance d'interaction GxÉ caractérisante

Table 2 (droite) - Qualité de prédiction pour les 8 modèles testés. Les scénarios sont oGoE (old Genotype & old Environment), nGoE (new Genotype & old Environment), oGoE (old Genotype & new Environment) et nGoE (new Genotype & new Environment)

GWAS - Caractères agronomiques

Une analyse d'association a été réalisée avec le modèle K par l'approche LOCO (Rincent et al., 2014). Au total, 272 QTL ont été détectés, répartis sur l'ensemble des chromosomes (Figure 3). La qualité de l'analyse est confirmée par l'observation d'importantes colocalisations au niveau de gènes majeurs, comme PPD-D1 pour le précocité. Pour le rendement, 9 QTL ont été identifiés. Une colocalisation de QTL de composantes du rendement, indépendants de la précocité et de la hauteur semble intéressante sur le chromosome 7A et explique en moyenne 6,7% de la variance.

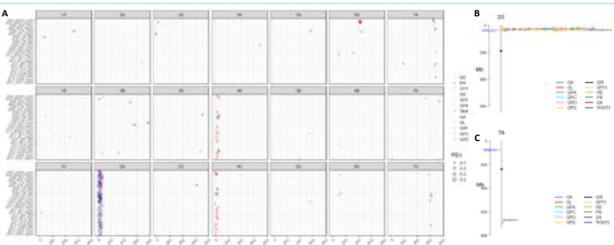


Figure 3 - (A) Répartition des QTL détectés sur l'ensemble du génome pour chaque caractère dans chaque essai ; (B) Colocalisation de QTL de précocité avec PPD-D1 ; (C) Colocalisation de QTL de rendement sur le 7A. Les caractères étudiés sont la précocité (PD), la hauteur (PH), le rendement à 15% d'humidité (QY15), le nombre d'épis par m² (SA), le nombre de grains par épi (GPS), le nombre de grains par m² (GPA), le poids de mille grains (TKW15), la surface, la longueur et la largeur du grain (GA, GL, GW), la teneur en protéine (GPC) et le Grain Protein Deviation (GPD).

Phénotypage protéines de réserve / qualité boulangère

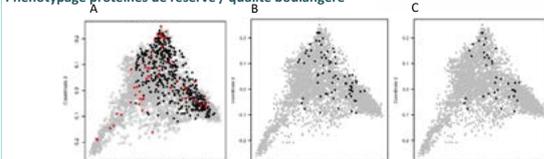


Figure 4 - (A) panel BWP3 étendu (485), (B) panel gluténines (73), (C) panel alvéographe (45) Parmi les 4500 accessions Breedwheat, 450 correspondent à BWP3 (noires sur Figure 4A), 20 asiatiques et 25 présentant des prédictions génomiques intéressantes ont été ajoutées (rouges sur Fig. 4A) pour former BWP3 étendu. Parmi elles, 73 accessions représentatives ont été dosées et séquencées pour les protéines de réserve (noires sur Figure 4B). Parmi elles, 45 ont été évaluées pour les variables d'alvéographe en conditions optimales et stressées (azote: N/NO, irrigation: DRY/IRR) (noires sur Figure 4C).



Figure 5 - Composition du grain de blé tendre, focus sur les protéines de réserve

Séquençage des gluténines

L'annotation des principales protéines de réserve (Figure 5), 18 gènes de gluténines et 44 gènes de gliadines, a été réalisée chez Chinese-Spring V2.1. Des fragments de 4500 à 8500 pb ont été amplifiés. Seules les amorces de gluténines ont fonctionné et permis le séquençage de 6 gènes de gluténines de haut poids moléculaire (HMW en fin des chromosomes du groupe 1) et 12 de faible poids moléculaire (LMW en début des chromosomes du groupe 1).

Parmi les 2102 SNP, 1309 ont une MAF>0.05 et 53 sont en équilibre de liaison.

On remarque que l'allèle « absent » est un allèle fréquent à considérer dans les associations avec les phénotypes (Table 2).

On observe du DL intra-gène. Au total, 25 marqueurs permettent de résumer la diversité des HMW et 29 pour les LMW. Chaque gène possède en moyenne 4 haplotypes (Figure 6).

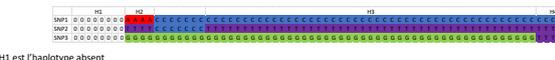


Figure 6 - Exemple de 4 haplotypes chez 73 accessions pour un gène LMW

GWAS - Protéines de réserve

Table 2 - Associations protéines de réserve

te: élasticité, L: extensibilité, protTot: protéine totale, glu: gluténine, gli: gliadine, N: azote total

Trait	#Chr	Chr	Position (CS V2.1, bp)	Pvalue	part variance	QTL
te	1	1A	509 017 352	9.40E-07	0.49	Glu_HMW-A
L	5	2B	745 716 941	2.10E-07	0.56	Glu_HMW-A
L	15	5D	548 216 820	4.84E-07	0.52	CWi-5D
ProtTot	2	1B	94 458 186	6.01E-09	0.37	1RS/1BL(gli/LMW)
ProtTot	2	1B	105 538 550	6.01E-09	0.37	1RS/1BL(gli/LMW)
gli.w5	3	1D	578 541	3.33E-09	0.39	gli/LMW
protTot	7	3A	724 660 462	6.02E-07	0.29	YGWS
Nfarine	8	3B	373 613 528	4.50E-07	0.32	TalcY-B1
Nfarine	8	3B	774 409 784	4.32E-07	0.32	Red-3B
Nfarine	10	4A	263 086 190	4.72E-07	0.32	introgression dicoccoides
gli.w5	11	4B	3 133 117	6.23E-09	0.38	Lev-B1
gli.w1.2	13	5A	476 434 666	6.77E-07	0.30	nac27
gli.w5	14	5B	641 046 239	8.76E-07	0.30	SHP
gli.w5	14	5B	703 647 253	7.25E-09	0.38	
gli.w5	17	6B	10 754 025	7.96E-09	0.39	
gli.w5	17	6B	514 027 602	4.38E-07	0.30	SAD

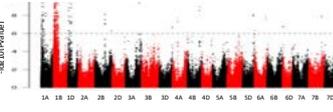


Figure 7 - Manhattan plot protéines de réserve

Toutes les variables liées aux protéines de réserve ont été projetées sur le même manhattan plot pour avoir une vision globale des QTL détectés

Au total, 16 QTL principaux ont été détectés (Table 2). Ils sont en général associés à plusieurs caractères dans plusieurs environnements et conditions. Ils expliquent entre 30 et 50% de la variance du phénotype. De nombreuses associations sont trouvées dans les régions des gliadines et LMW au début des chromosomes 1A, B et D (1,2 et 3) (Figure 7). L'introgression 1RS/1BL du seigle sur le chromosome 1B est présente dans le panel, ce qui explique l'étendue du QTL sur le bras court.

GWAS - maladies

Au total, 54 QTL principaux ont été détectés sur la rouille jaune, la septoriose et la fusariose. Ils sont retrouvés dans plusieurs environnements et conditions. Ils expliquent entre 4 et 11% de la variance de la maladie.

Les QTL les plus intéressants se situent sur les chromosomes 2B (5) et 6A (16) pour la rouille jaune (Figure 8). Certaines accessions présenteraient une introgression au niveau du chromosome 2B.



Figure 8 - Manhattan rouille jaune

L'accession a été faite sur les résultats d'un modèle avec hauteur et précocité en variable explicative.

Perspectives

Un jeu de données de qualité de génotypes et de phénotypes a été produit sur un large panel de diversité (485). Des analyses poussées ont été faites sur les données rendement. Les analyses sont encore en cours pour les autres caractères. Un travail d'imputation et de méta-analyses avec d'autres jeux de données sera nécessaire pour valider les QTL, en particulier pour les caractères où nous avons évalué seulement 45 (alvéographe) ou 75 (protéines de réserve) individus. L'objectif est de détecter des gènes intéressants et de constituer un set de marqueurs diagnostiques pour optimiser le pre-breeding.

Plastix : Plasticité des composantes de rendement des céréales à paille

Vincent ALLARD^{1*}, Christine GIROUSSE¹, Jacques LE GOUIS¹, Jean-Charles DESWARTE^{2*},
Stéphanie THEPOT³, Jérôme AUZANNEAU⁴, Sébastien CAIVEAU⁵, Pascal GIRAUDEAU⁶,
Gustavo SLAFER⁷, Denis VILE⁸, Benoit DE SOLAN⁹

1 - INRAE - Université Clermont-Auvergne, UMR GDEC- Chemin de Crouel, 63000 Clermont-Ferrand, FRANCE

2 - Arvalis - ZA des Graviers, 91190 Villiers-le-Bâcle, FRANCE

3 - BASF France SAS - Ferme du Paly, 91490 Milly-la-Forêt, FRANCE

4 - Agri-Obtentions - Chemin De La Petite Minière, 78280 Guyancourt, FRANCE

5 - Syngenta - Avenue Gustave Eiffel, 28000 Chartres, FRANCE

6 - Secobra Recherches - Le Bois Henry, 78580 Maule, FRANCE

7 - Université de Lleida - ETSIA, Av. de l'Alcalde Rovira Roure 191, E-25198 Lleida, ESPAGNE

8 - INRAE - LEPSE - 2 pl P Viala, F-34060 Montpellier, FRANCE

9 - Arvalis - Domaine Saint Paul, Site Agroparc, Bâtiment Climat - 228, route de l'Aérodrome, 84914 Avignon, FRANCE

*Coordinateur du projet : Vincent ALLARD, vincent.allard@inrae.fr / + Rédacteur de l'article : Jean-Charles DESWARTE, jc.deswarte@arvalis.fr

1 Introduction

Au cours des siècles, les gains de rendement des cultures ont été obtenus par des pratiques qui accroissaient la mise à disposition de ressources aux cultures (essentiellement eau et azote), associées à des variétés adaptées à des ressources accrues (Slafer and Andrade, 1991 ; Evans and Fischer, 1999 ; Sinclair and Ruffy, 2012). Les hausses de rendement ont été remarquables pendant la seconde moitié du 20^e siècle, mais se sont réduites au cours des dernières décades (Calderini and Slafer, 1998 ; Brisson *et al.*, 2010 ; Fischer and Edmeades, 2010). En France, la stagnation des rendements n'est pas attribuable à un ralentissement du progrès génétique, constant (+1.0 à +1.3 q ha⁻¹ y⁻¹) (Brisson *et al.*, 2010) ; par contre, elle semble causée en partie par une augmentation de conditions environnementales (dont climatiques) défavorables, alors que les prévisions climatiques annoncent une hausse de la fréquence et de l'intensité des aléas (Stocker, 2014).

La combinaison de moindres gains de rendement et d'une population en hausse (Rosegrant and Cline, 2003) mène à une baisse de la production par personne ; ainsi, il est nécessaire d'accroître les rendements de 50% au cours des prochaines décades (Reynolds *et al.*, 2009). Cet objectif est atteignable à la fois en augmentant le potentiel de rendement des nouvelles variétés, et en identifiant des traits physiologiques qui apportent une plasticité accrue et donc une aptitude accrue à s'adapter aux variations climatiques qui interviennent au cours d'une campagne culturale ou entre campagnes. Ces objectifs requièrent une meilleure compréhension physiologique de l'élaboration du rendement (Slafer, 2003 ; Araus *et al.*, 2008 ; Fischer, 2011 ; Foulkes *et al.*, 2011 ; Reynolds *et al.*, 2012).

Slafer *et al.* (2014) ont proposé une méthode pour analyser le contrôle génétique et l'effet environnemental des composantes de rendement chez le blé : nombre de grains/m² (décomposable en épis/m² et grains/épi) et poids moyen des grains. En effet, génétique et environnement interagissent et conduisent à des relations complexes entre composantes. Des travaux récents sur la plasticité phénotypique ont apporté une interprétation nouvelle des interactions entre composantes (Sadras, 2007; Sadras and Denison, 2009; Gambin and Borrás,

2010; Peltonen-Sainio *et al.*, 2011; Sadras and Slafer, 2012; Sadras and Rebetzke, 2013). Sadras et Slafer (2012) ont ordonné la plasticité des composantes de rendement chez les céréales : le tallage présente la plasticité maximale, et le poids moyen des grains la plus faible. Ainsi, chez le blé, le nombre de grains/m² est le principal déterminant de la variation de rendement sous différentes conditions environnementales ; ses composantes (épis/m² et grains/épi) sont donc des traits privilégiés pour la sélection variétale.

Le nombre final d'épis/m² résulte de l'émission, la croissance et la survie de talles (Slafer *et al.*, 2009 ; Dreccer *et al.*, 2013) ; de la même manière, le nombre de grains/m² découle de l'initiation et de la survie des fleurs au sein de chaque épi en développement (Ghiglione *et al.*, 2008 ; Gonzalez *et al.*, 2011), puis de la fécondation (Ferrante *et al.*, 2013). Chez le blé, la phase d'avortement est critique à la fois pour les épis et pour les fleurs (Fischer, 1985 ; Kirby, 1988 ; Slafer *et al.*, 1994). Etant donné que leurs périodes de mise en place se chevauchent partiellement au cours du cycle, on peut supposer qu'une rétroaction existe entre la survie des épis et celle des fleurs lorsque la culture est exposée à des variables trophiques, de telle sorte que les ressources nécessaires aux unes sont soustraites (ou du moins non accessibles) aux autres. Puisque les ressources et énergies nécessaires pour une talle fertile sont largement supérieures à celles requises par une ébauche de fleur (Fischer and Turner, 1978), il est probable que la densité d'épis constitue un mécanisme de régulation principal et grossier (Zhang *et al.*, 2010 ; Sadras and Rebetzke, 2013), alors que le nombre de grains/épi engendre une régulation plus fine. Ainsi, les deux composantes peuvent répondre à de petits changements environnementaux, mais la densité d'épis semble davantage concernée par de grandes variations.

L'objectif du projet est donc d'acquérir une meilleure description de la relation entre les deux traits Densité d'épis (NEM2) et Nombre de grains par épi (NGE) et de quantifier la variabilité génétique existante associée à la compensation inter-trait. Le cœur du projet Plastix vise à développer les outils techniques et conceptuels permettant de réaliser cette quantification de manière robuste et facilement déployable chez les partenaires socio-économiques.

2 Matériel et méthode

► Valorisation de jeux de données génériques antérieurs et démonstration d'une variabilité génétique de la plasticité de la fertilité épi

Deux sources de données sur blé tendre ont été exploitées pour explorer la variabilité génétique de la plasticité de la fertilité épi en réponse à la densité d'épi. Les données d'essais Post-Inscription d'Arvalis de 2003 à 2020 regroupaient 13821 unités expérimentales (variété x essai) présentant les composantes de rendement d'intérêt (densité d'épis, fertilité des épis). Compte-tenu des différenciations des listes variétales dans le temps et sur le territoire, ce jeu initial s'est avéré très déséquilibré ; il a donc été réduit en sélectionnant uniquement les 78 variétés présentes dans au moins 40 essais, soit au total 6082 observations. En complément, les données de composantes de rendement de 16 essais du projet BreedWheat, regroupant chacun 2 niveaux d'alimentation hydrique ou azotée (Touzy *et al.*, 2019 ; Mini *et al.*, 2023) ont fourni un jeu de données équilibré recroisant 210 variétés dans au moins 30 environnements (année x site x modalité) soit 6646 observations. Dans ces essais, les composantes de rendement n'étaient pas manipulées et résultaient en premier lieu de l'effet de l'environnement.

Une approche par modèles mixtes a été retenue pour analyser les relations entre les composantes du rendement : les effets aléatoires du facteur variété et du facteur essai ont été intégrés dans des modèles linéaires des relations bivariées entre composantes du rendement. Des procédures statistiques par rééchantillonnage (bootstrap) ont permis d'analyser la sensibilité des résultats par rapport à la structure déséquilibrée du jeu de données post-inscription.

► Confirmation de stratégies de plasticité différenciées

Afin d'étudier la plasticité de la fertilité épi *indépendamment de la densité d'épis*, des essais furent menés au champ en 2021 et 2022, associant les deux facteurs Variété et Structure du couvert. Les variétés étudiées étaient définies sur la base de leur comportement observé dans les essais Post-Inscription (variétés faiblement ou fortement compensatrices). Le facteur Structure du couvert visait à induire des densités d'épis très différentes au moment de la constitution de l'épi (montaison). Ainsi, pour éviter un sur-tallage des plantes, la modalité à faible densité d'épis était obtenue par arrachage manuel d'un rang sur deux autour du stade Z32 (second nœud visible), par opposition à la modalité témoin, intacte.

En blé tendre, 4 essais regroupant 20 variétés ont été conduits en 2021 ; en blé dur 3 essais ont été menés (2022) sur 10 variétés.

Pour étudier la réponse de la fertilité des épis à la densité, la densité d'épis par m² a été déterminée au centre des parcelles ; la fertilité des épis a été obtenue par battage et dénombrement des grains sur 50 épis prélevés au centre de la parcelle et battus ensemble.

► Analyse fine des mécanismes de compensation

Afin de fournir une compréhension plus fine des mécanismes à l'œuvre lors d'une compensation entre le nombre d'épis par m² et le nombre de grains par épi, une expérimentation a été menée en manipulant le niveau

de ressources disponible pour chaque épi : 5 traitements ont été implémentés en apportant de l'ombrage (« shading » -25% et -50% de rayonnement entre Z31 +150°Cj et floraison) ou en modifiant la densité du couvert (« thinning » -50% de densité obtenu en arrachant un rang sur deux au stade Z31 +150°Cj, et -75% en arrachant un rang sur deux et une plante sur deux sur le rang restant) en comparaison à un témoin non ombré et non éclairci. Deux variétés *a priori* contrastées pour leur plasticité en termes de fertilité épi (Ascott plus plastique et SY Moisson moins plastique) ont été utilisées. Les plantes ont été arrosées et fertilisées de manière optimale. Le dispositif comportait 3 répétitions, en randomisation totale.

L'expérimentation a été implantée en 2022 sur deux sites présentant des environnements très différents : Clermont-Ferrand (Puy-de-Dôme, France) et Lleida (Catalogne, Espagne).

Le nombre de plantes par m², le nombre d'épis par m² et par plante, le PMG et le rendement ont été déterminés ; le nombre de grains par épi a été évalué sur un échantillon de 50 épis prélevés de manière aléatoire et battus individuellement. De plus, une caractérisation fine de la dynamique des fleurons a été réalisée sur 3 niveaux d'épillets (basal, central, apical) pour 5 épis par date / génotype / localisation, en dénombrant le nombre de primordium potentiels et de fleurs fertiles aux stades Z45 et Z65 (floraison).

► Manipuler le couvert et accéder aux composantes de rendement : considérations méthodologiques

La composante « fertilité des épis » est le plus souvent obtenue par calcul à partir du rendement grain final, du PMG à la moisson et de la densité d'épis courant remplissage. Ainsi, l'accès à un outil de dénombrement à haut débit des épis est nécessaire pour garantir l'accès à cette composante et au calcul des autres. Un outil de phénotypage à haut débit léger, associé à la chaîne de traitement adaptée, a été testé pour en permettre l'amélioration et valider les sorties. Le matériel se présente sous la forme de deux caméras solitaires permettant une vision stéréoscopique, portées à environ 1,5 m au-dessus du couvert à l'aide d'une perche véhiculée par un opérateur (Fig 1).



Figure 1 : Présentation d'une perche LITERAL opérée au champ (gauche) et analyse d'une image acquise pour comptage des épis par algorithme (droite).

Le traitement des images est réalisé par apprentissage profond de manière asynchrone avec l'acquisition. La version 2023 du système a été testée sur des essais Post-Inscription ou équivalent en juin 2023 sur blé tendre et

blé dur. La comparaison des méthodes (phénotypage à haut-débit vs manuel) a été réalisée selon plusieurs échantillonnages : à échantillon identique (quadrat de 0.25 m²), ou à échantillonnage recommandé pour chaque méthode (2 à 3 placettes de 2 rangs x 1 m pour le comptage manuel, 4 à 6 acquisitions pour le phénotypage HD). Six essais Variétés Post-Inscription de 2023 (4 en BTH, 2 en BD) ont été utilisés pour évaluer la version la plus aboutie du système.

L'estimation de la plasticité de la fertilité épi sur un jeu de données générique tel que les essais post-inscription requiert un nombre élevé d'essais. A l'inverse, la manipulation du couvert garantit une meilleure expression de la plasticité des épis, en comparant toutes choses égales par ailleurs des peuplements d'épis denses et éclaircis. Pour répéter ces modalités expérimentales à grande échelle, des alternatives à l'arrachage manuel ont été testées : l'arrachage d'un rang sur 2 à l'aide d'une bineuse, ou le semis d'un rang sur deux. Les deux dernières modalités ont été comparées dans un essai spécifique mené en 2021 et 2022 à Villiers-le-Bâcle (91) sur 2 variétés contrastées : Ascott et SY Moisson.

La problématique des tailles de parcelles et d'effets de bordure sur les composantes de rendement a par ailleurs été explorée en 2021 et 2023 à Villiers-le-Bâcle (91). En 2021, des parcelles de 7 rangs, sans rang de bordure et bénéficiant d'un espace inter-parcelle large (> 50 cm) ont été conduites, et les composantes de rendement ont été déterminées rang par rang. En 2023, les facteurs de longueur de parcelle (5 vs 9 m) et de largeur d'inter-parcelles (50 vs 20 cm) ont été évalués sur 2 variétés contrastées : Advisor et Autricum. L'impact sur le rendement et sur l'estimation de la fertilité épi a été analysé.

3 Résultats

► Valorisation de jeux de données génériques antérieurs et démonstration d'une variabilité génétique de la plasticité de la fertilité épi

Données BreedWheat sur blé tendre

La plasticité environnementale a pu être analysée dans le jeu de données du projet BreedWheat (Paux *et al.*, 2022) par une analyse de régression conjointe inspirée de la méthode de Finlay-Wilkinson (1963) qui consiste à extraire les coefficients de régression linéaire entre les valeurs moyennes par environnement et les valeurs observées pour chaque génotype dans chaque environnement. Les estimations des coefficients des modèles mixtes permettent de comparer les génotypes.

L'analyse de régression conjointe a permis de mettre en évidence une variabilité génétique significative de la plasticité du rendement et de ses composantes.

Pour le rendement, la variation est principalement expliquée par la variation entre environnements (59%), mais la part de variance expliquée par la variabilité de la pente entre génotypes est de 25% de la part totale. Une relation positive significative ($r = 0.5$, $P < 0.001$) a été observée entre le rendement moyen de chaque génotype et la pente du modèle de régression conjointe (Fig. 2). D'après Finlay-Wilkinson, une interprétation possible de la diversité des stratégies des génotypes analysés est l'identification de génotypes adaptés à tous les environnements (e.g. RUBISKO, PAKITO, FAIRPLAY), des

génotypes bien adaptés aux environnements favorables (e.g. NOGAL, CORVUS), et des génotypes avec une stabilité du rendement supérieure à la moyenne et une bonne adaptation aux environnements défavorables (e.g. ESPERIA, AVENUE, AEROBIC).

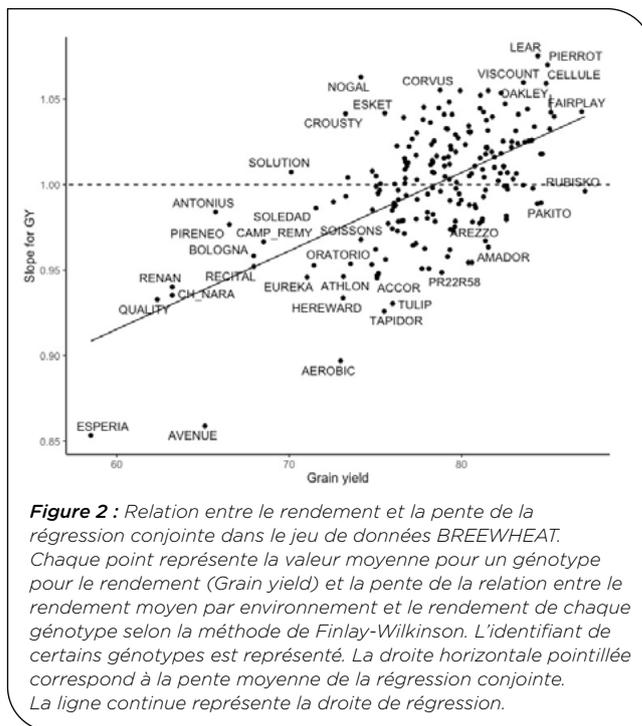


Figure 2 : Relation entre le rendement et la pente de la régression conjointe dans le jeu de données BREEWHEAT. Chaque point représente la valeur moyenne pour un génotype pour le rendement (Grain yield) et la pente de la relation entre le rendement moyen par environnement et le rendement de chaque génotype selon la méthode de Finlay-Wilkinson. L'identifiant de certains génotypes est représenté. La droite horizontale pointillée correspond à la pente moyenne de la régression conjointe. La ligne continue représente la droite de régression.

Pour la densité d'épis, alors que la variabilité entre les environnements contribue à 30% de la variabilité totale, c'est la variabilité des pentes d'un génotype à l'autre qui contribue le plus (50%) à la variabilité totale. Le nombre de grains par m² est quant à lui majoritairement expliqué par les différences entre environnements (63%) et la variabilité des pentes entre génotypes explique seulement 8% de la part totale de la variance.

En terme de plasticité variétale de la fertilité des épis, des différences significatives ont été détectées au sein du panel BreedWheat (Fig. 3) : pour une même variation de la densité d'épis, certaines variétés telles que Ephoros répondent fortement par une modulation de leur fertilité des épis.

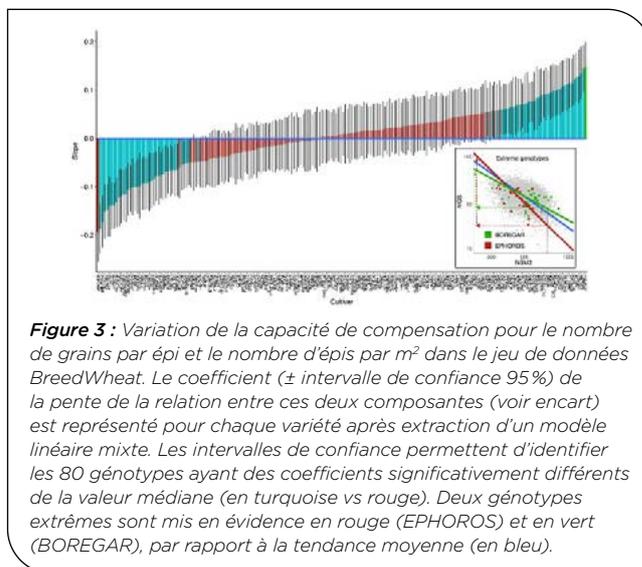


Figure 3 : Variation de la capacité de compensation pour le nombre de grains par épi et le nombre d'épis par m² dans le jeu de données BreedWheat. Le coefficient (\pm intervalle de confiance 95%) de la pente de la relation entre ces deux composantes (voir encart) est représenté pour chaque variété après extraction d'un modèle linéaire mixte. Les intervalles de confiance permettent d'identifier les 80 génotypes ayant des coefficients significativement différents de la valeur médiane (en turquoise vs rouge). Deux génotypes extrêmes sont mis en évidence en rouge (EPHOROS) et en vert (BOREGAR), par rapport à la tendance moyenne (en bleu).

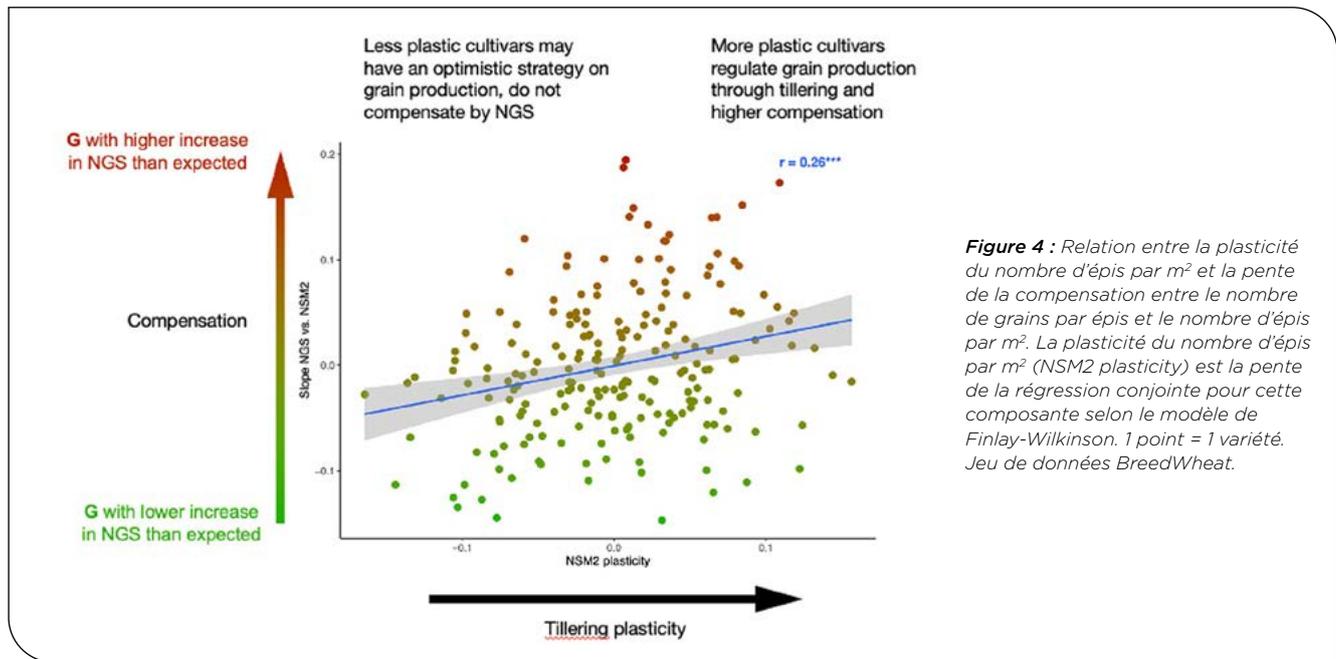


Figure 4 : Relation entre la plasticité du nombre d'épis par m² et la pente de la compensation entre le nombre de grains par épis et le nombre d'épis par m². La plasticité du nombre d'épis par m² (NSM2 plasticity) est la pente de la régression conjointe pour cette composante selon le modèle de Finlay-Wilkinson. 1 point = 1 variété. Jeu de données BreedWheat.

Une relation positive faible mais significative a été observée entre la plasticité du nombre d'épis par m² et la pente de la compensation entre le nombre de grains par épis et le nombre d'épis par m² ($r = 0.26$, $P < 0.001$; Fig. 4). Les variétés moins plastiques compensent peu la réduction du nombre d'épis par le nombre de grains par épis. Les cultivars plus plastiques quant à eux semblent réguler la production de grains par le tallage et une compensation plus élevée.

La composition orthogonale du jeu de données BreedWheat a par ailleurs permis d'estimer l'effectif minimal nécessaire de données de composantes de rendement pour porter un jugement fiable sur le caractère plastique d'une variété. Pour cela, une analyse de sensibilité a été menée en restreignant progressivement le nombre d'environnements utilisés. Par rapport à l'analyse initiale (32 environnements), restreindre le jeu à 24 environnements conduit à déclasser 25% des génotypes considérés comme extrêmes par classification ascendante hiérarchique.

Données post-inscription

Les analyses du jeu de données post-inscription ont permis d'identifier des génotypes au comportement extrême pour leur capacité de compensation du nombre de grains par épis (NGE) face à réduction du nombre d'épis par m² (NEM2).

Dans ce jeu de données blé tendre, la variabilité des pentes entre les environnements (essais) était celle qui contribuait le plus (41%) à la variabilité totale. La variabilité des pentes entre variétés représentait 21% de la variabilité totale. Cette variabilité génétique de la relation NGE/MEM2 nous permet d'identifier des variétés aux comportements tranchés (Fig. 5).

Les résultats révèlent une tendance à ce que les génotypes les plus compensateurs sur la NGE seraient également les plus plastiques en termes de tallage.

Nous nous sommes également intéressés à la plasticité en termes de nombre de grains par m² (NGM2), dont l'intérêt attendu est d'identifier des variétés présentant des faibles valeurs de cette plasticité (génotypes extrêmes

négatifs). Les résultats préliminaires montrent que les génotypes qui ont des valeurs fortes de compensation en termes de NGE/NEM2 auraient tendance à être moins plastiques en termes de NGM2 que la norme et surtout que les génotypes extrêmes positifs.

Convergence des deux jeux de données

Après avoir exclu deux variétés qui présentaient une faible congruence (PR22R58 et ASCOTT), une corrélation positive marginalement significative ($P = 0.085$) a été observée entre les coefficients de compensation du NGE par rapport au NSM2 entre les variétés communes ($n = 45$) aux deux jeux de données post-inscription et BreedWheat. Parmi les 7 variétés ayant des coefficients significativement différents de la tendance moyenne dans les deux jeux de données, 5 (BOLOGNA, ISENGRAIN, SOISSONS, PREMIO et CELLULE) présentaient des coefficients de compensation très similaires, et deux (BAROK et ALIXAN) présentaient des coefficients opposés dans les deux jeux de données.

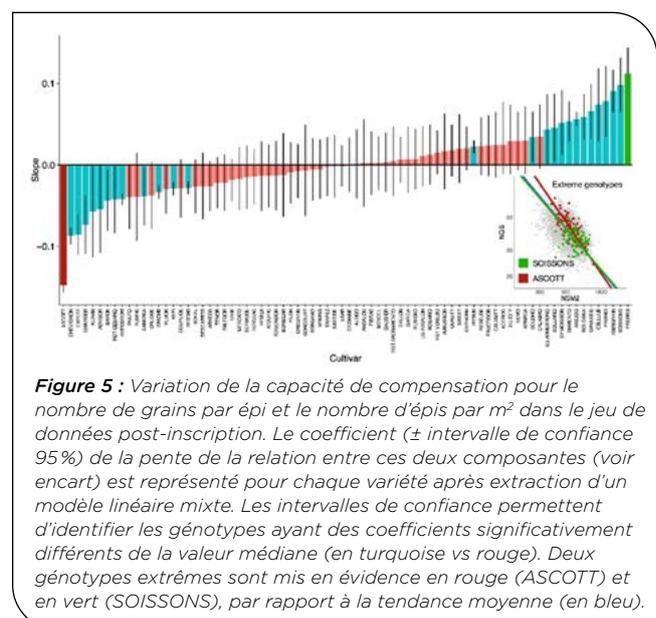
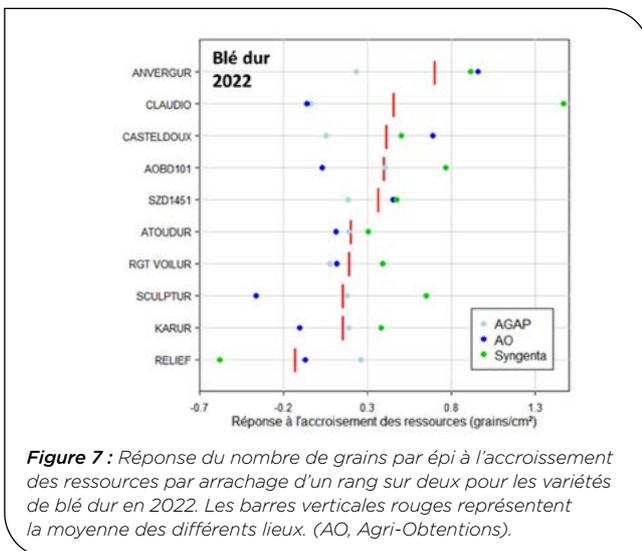
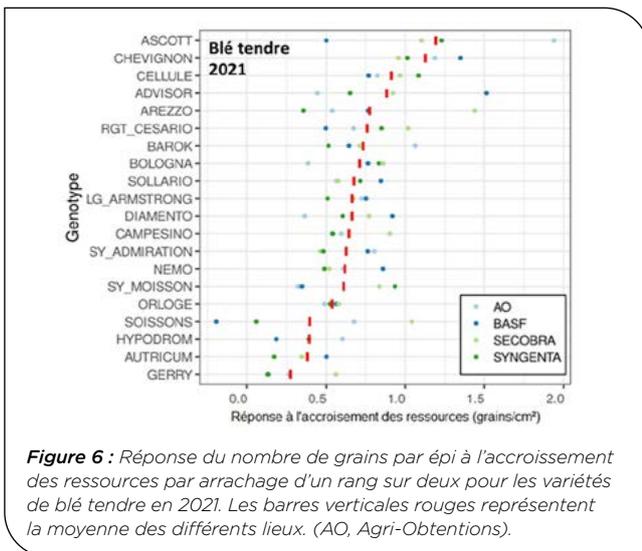


Figure 5 : Variation de la capacité de compensation pour le nombre de grains par épis et le nombre d'épis par m² dans le jeu de données post-inscription. Le coefficient (\pm intervalle de confiance 95%) de la pente de la relation entre ces deux composantes (voir encart) est représenté pour chaque variété après extraction d'un modèle linéaire mixte. Les intervalles de confiance permettent d'identifier les génotypes ayant des coefficients significativement différents de la valeur médiane (en turquoise vs rouge). Deux génotypes extrêmes sont mis en évidence en rouge (ASCOTT) et en vert (SOISSONS), par rapport à la tendance moyenne (en bleu).

► Confirmation de stratégies de plasticité différenciées

Les essais visant à stimuler l'expression de la plasticité des épis s'appuyaient sur la comparaison d'une modalité standard (semis à densité et écartement normal) à une modalité d'éclaircissage obtenue par l'arrachage d'un rang sur deux autour du stade Z32. En dépit de cette manipulation tardive, un sur-tallage des plantes restantes de la modalité éclaircie a pu être observé sur les rangs intacts (+12 à +40% en fonction des sites et des espèces). Ainsi, il est nécessaire de rapporter la variation du nombre de grains par épi à la surface de sol disponible. La diminution de la densité des épis se traduit par une augmentation moyenne du nombre de grains par épi de 0.6 grain/cm² pour le blé tendre en 2021 (Fig. 6), et 0.2 grain/cm² pour le blé dur en 2022 (Fig. 7). Une large variabilité génotypique est observée. Comme pour le sur-tallage, il faut noter une forte interaction génotype × environnement avec des classements qui peuvent varier de façon très significative en fonction des sites. La détermination de ce trait demandera donc soit des essais dans un nombre important de conditions (site × année) pour acquérir une valeur moyenne robuste, soit une compréhension des facteurs environnementaux générant cette interaction pour créer des conditions favorables à l'expression de ce caractère et maximisant la variabilité génotypique.

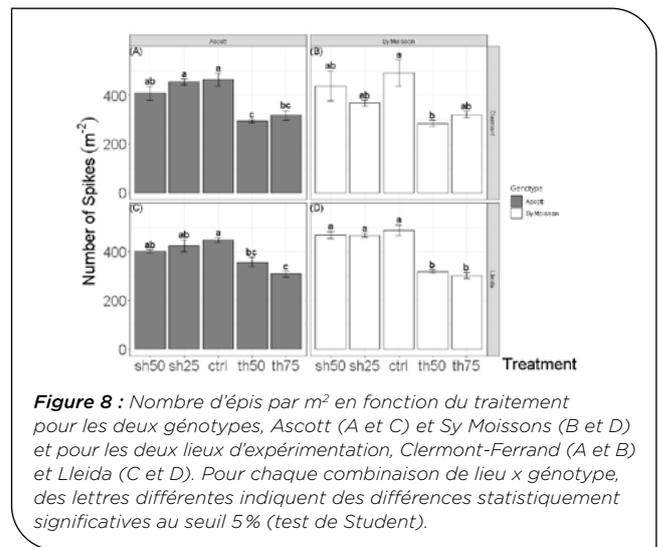


En blé tendre, il a été montré que le sur-tallage est plus faible pour les génotypes ayant une forte densité d'épis en condition témoin et plus fort dans les environnements favorables au tallage.

► Analyse fine des mécanismes de compensation

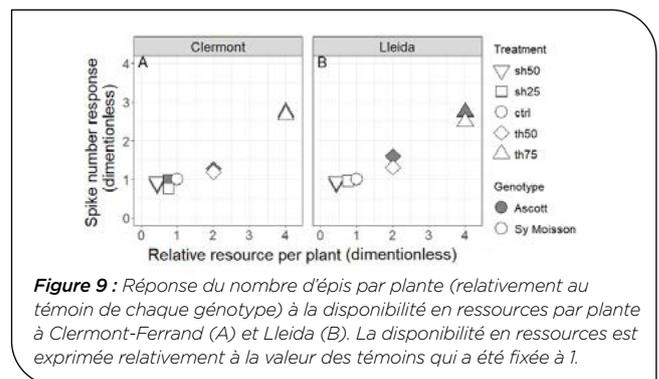
Les rendements des modalités témoins ont été relativement élevés dans les deux lieux (entre 6.5 et 9 t/ha), sans différence statistique entre les 2 variétés suivies.

Les traitements d'éclaircies (th50 et th75) ont réduit de manière significative le nombre de plantes et donc le nombre de talles porteuses d'épis par m² (Fig. 8). Les traitements d'ombrage (sh50 et sh25) n'ont pas modifié de manière évidente le nombre de talles porteuses d'épis par m². Ces tendances sont similaires quels que soient le génotype ou le lieu considérés.



A l'inverse, exprimé par plante, le nombre d'épis a été augmenté de manière significative par le traitement d'éclaircissement th75 et cela pour les deux génotypes et les deux lieux d'expérimentation. Relativement au traitement témoin, cette augmentation est d'environ 2.7 fois à Clermont-Ferrand pour les deux génotypes (Ascott et Sy Moisson) alors qu'à Lleida l'augmentation est légèrement plus importante pour le génotype Ascott que pour le génotype Sy Moisson, soit respectivement 2.8 et 2.5 fois par rapport aux valeurs témoins. Le traitement th50 et les traitements d'ombrage n'ont pas modifié de manière systématique et notable le nombre d'épis par plante.

La Figure 9 montre le nombre d'épis par plante lorsque le niveau de ressources disponibles est exprimé relativement au niveau témoin.



Les traitements d'ombrage appliqués pendant la phase d'élongation des tiges n'ont pas induit de mortalité significativement supplémentaire de talles par rapport au témoin alors que les traitements d'éclaircissement ont augmenté la survie des talles ; la survie est particulièrement importante dans le cas du traitement th75, pour lequel le nombre d'épis par plante est 2.5 fois supérieur à celui des témoins pour les deux génotypes et les deux localisations. La réponse du nombre de grains par épi en fonction des ressources disponibles par plante est similaire entre les deux lieux (Fig. 10) : une augmentation des ressources disponibles entre sh50 et th50 entraîne une augmentation linéaire du nombre de grains par épi. Au-delà, pour la modalité th75, cette augmentation est marginale et non significative, et cela pour les deux lieux et les deux génotypes.

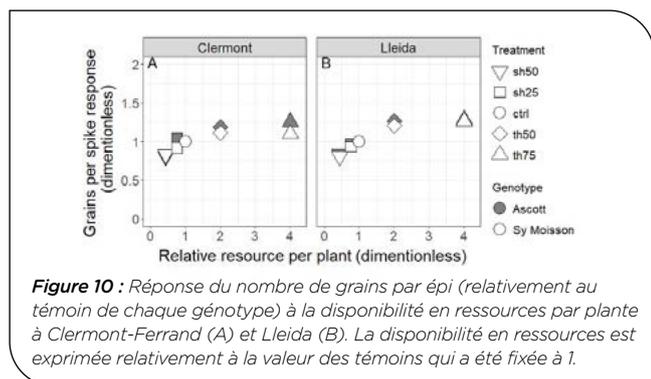


Figure 10 : Réponse du nombre de grains par épi (relativement au témoin de chaque génotype) à la disponibilité en ressources par plante à Clermont-Ferrand (A) et Lleida (B). La disponibilité en ressources est exprimée relativement à la valeur des témoins qui a été fixée à 1.

Cette quasi-absence de réponse pour le traitement th75, alors même que le nombre d'épis augmente très fortement, est probablement dû au fait que parmi les talles survivantes, la proportion de talles d'ordre supérieur (secondaire ou tertiaire) porteur de petits épis est plus importante que pour les autres modalités entraînant une baisse du nombre moyen de grains par épi. Notons que quels que soient les modalités ou le lieu, le génotype Ascott présente des épis avec un nombre plus élevé de grains par épi que le génotype Sy Moisson.

Il est suggéré que l'augmentation des ressources disponibles par plante dans la modalité th75 a favorisé la survie d'un plus grand nombre de talles, conduisant ainsi à une augmentation moindre des ressources disponibles par épi par rapport au traitement th50. L'expression du nombre de grains par épi en fonction de la disponibilité des ressources par épi (Fig. 11) exacerbe la linéarité de la relation ($P < 0.001$ pour les deux lieux et les deux génotypes) entre ces deux variables et souligne la plus grande plasticité en nombre de grains par épi du génotype Ascott (au-delà du plus grand nombre constitutif de grains par épi) par rapport au génotype Sy Moisson.

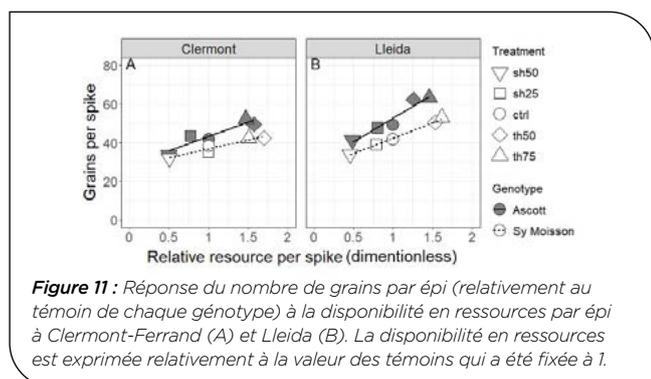


Figure 11 : Réponse du nombre de grains par épi (relativement au témoin de chaque génotype) à la disponibilité en ressources par épi à Clermont-Ferrand (A) et Lleida (B). La disponibilité en ressources est exprimée relativement à la valeur des témoins qui a été fixée à 1.

Quel que soit le génotype, les différentes modalités n'ont pas eu, de manière attendue compte tenu de la date d'application des traitements, d'impact sur le nombre d'épillets par épi ; mais Ascott présente constitutivement un nombre plus élevé d'épillets par épi que Sy Moisson, expliquant en partie le plus grand nombre de grains par épi pour Ascott : le nombre moyen d'épillets par épi est de 22.6 ± 0.1 et 19.3 ± 0.1 respectivement pour Ascott et Sy Moisson.

La dissection des épis aux stades Z45 et Z65 a permis d'estimer le nombre maximal par épillet de fleurons formés (à Z45) ainsi que le nombre de fleurons fertiles (à Z65) :

- Les variétés se distinguent sur le nombre de primordia, et le taux de survie ;
- Les modalités n'impactent que rarement le nombre maximal de fleurons ;
- Le taux de survie des fleurons augmente quand le niveau de ressources par épi augmente, et se manifeste surtout sur les épillets basaux.

► Manipuler le couvert et accéder aux composantes de rendement : considérations méthodologiques

Estimation de la densité d'épis par phénotypage à haut débit (PHD)

Les comparaisons entre la méthode manuelle de référence et le comptage par PHD ont été établies à échantillonnage identique (Fig. 12), et sur les valeurs génotypiques par essai (non présenté).

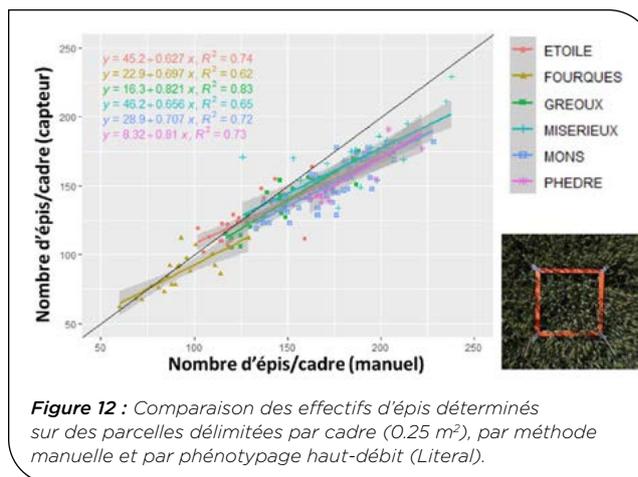


Figure 12 : Comparaison des effectifs d'épis déterminés sur des parcelles délimitées par cadre (0.25 m²), par méthode manuelle et par phénotypage haut-débit (Literal).

On constate une tendance à la sous-estimation de la densité d'épis par PHD, notamment en situations de fortes densités (difficultés de détection des épis de la strate inférieure en situation de faible ensoleillement ; également possible biais méthodologique des comptages humains dans des parcelles hétérogènes, où les manques sont inconsciemment évités) ; cependant, les classements variétaux intra- ou inter-essais ne sont pas modifiés. Les plus petites différences significatives (ppds) sont équivalentes ou inférieures avec l'appareil de phénotypage, et les héritabilités en hausse.

Mécanisation des essais pour exprimer la plasticité de la fertilité épi

Les essais méthodologiques conduits en 2021 (2 variétés) et 2022 (1 variété) ont pu comparer 3 méthodes de modification de la structure du couvert : semis d'un rang sur deux, destruction d'un rang sur deux par binage courant montaison et destruction d'un rang sur deux par coupes successives à partir de Z32.

L'effet de ces modalités sur les composantes (plantes/m², épis/plante, grains/épi et PMG) est systématiquement très significatif ($p < 0.001$), sans interaction entre elles. On constate que le sur-tallage s'exprime de manière plus marquée sur la modalité semée 1 rang sur 2, mais toutes les modalités éclaircies se différencient nettement du témoin pour les composantes épis/plante, grains/épi et PMG (Fig. 13).

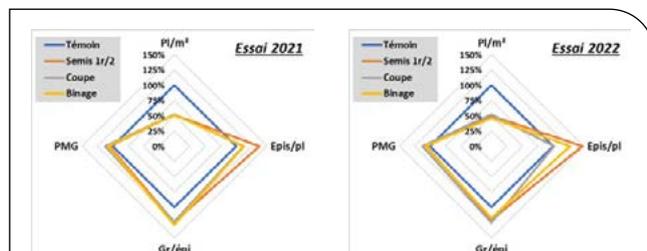


Figure 13 : Diagrammes radar représentant l'évolution des composantes de rendement en fonction des modalités de modification de la structure du couvert (en % du témoin non modifié).

Conséquences de la dimension des parcelles sur l'estimation des composantes et l'expression de la plasticité

L'analyse des composantes de rendement de chaque rang d'une parcelle isolée indique que les rangs 1 et 7 en bordure de parcelle (absence de compétition sur au moins 50 cm sur l'un des côtés) présentent un tallage épi et une fertilité épi en nette hausse par rapport à un rang situé en milieu de parcelle (rang 4). Cet effet de bordure s'estompe rapidement au sein de la parcelle : le rang 2 ne montre qu'un effet modéré sur le nombre d'épis, mais pas de modification sur la fertilité des épis et le poids moyen des grains (Fig. 14).

N° rang	Densité d'épis /ml	Fertilité épi	PMG	Rendement /ml
1 (bord. sud-ouest)	152%	126%	103%	203%
2	109%	100%	100%	111%
4 (témoin central)	100%	100%	100%	100%
7 (bord. nord-est)	144%	127%	106%	200%

Figure 14 : Impact de la position du rang dans la parcelle sur les composantes de rendement, exprimé en % du rang central. Essai Villiers-le-Bâcle, 2021.

En l'absence de prise en compte des effets de bordure dans le calcul de la surface de la parcelle, les impacts de taille de parcelle et de présence de rangs de bordure (essai de Villiers-le-Bâcle, 2023) modifient très fortement l'estimation du rendement ($p < 0.001$), ainsi que l'expression d'une interaction variété x dispositif ($p < 0.1$). Lorsqu'on estime par calcul la fertilité des épis dans ces dispositifs de taille et de disposition variées (mesure du rendement et du PMG à l'échelle de la parcelle sans correction de la surface de référence, détermination de la densité d'épi au centre de la parcelle), on observe une surestimation marquée en l'absence de rangs de bordures, et/ou en cas de parcelles plus courtes (Fig. 15). Ainsi, si l'on considère que l'absence de concurrence directe s'exprime sur la périphérie des microparcelles sur 15 à 20 cm de profondeur, elle affecte ainsi une part très fluctuante des couverts en fonction des espaces inter-parcelles et des dimensions parcellaires.

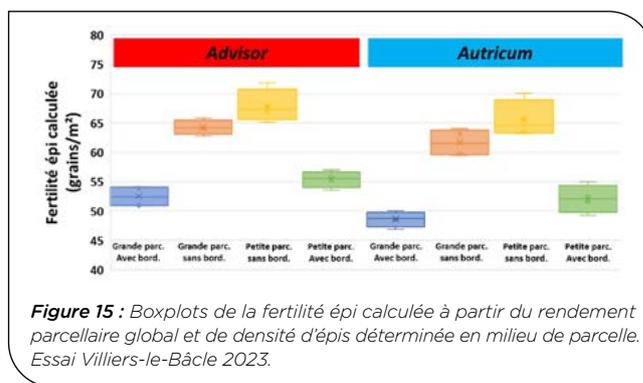


Figure 15 : Boxplots de la fertilité épi calculée à partir du rendement parcellaire global et de densité d'épis déterminée en milieu de parcelle. Essai Villiers-le-Bâcle 2023.

	Long. 5 m	Long. 9 m
Interp. larges	34%	31%
Interp. étroites ou rangs de bord	7%	4%

Figure 16 : Estimation de la part du peuplement parcellaire concerné par un effet de bordure en fonction du dispositif utilisé (hypothèse : 7 rangs récoltés).

4 Discussion

► Expression de la plasticité de la fertilité des épis

L'hypothèse physiologique sous-jacente des expérimentations conduites lors cette étude reposait sur une aptitude des plantes à compenser une faible densité d'épi par davantage de grains par épi. Le tallage étant le premier (en terme chronologique) et le principal (en termes d'ampleur) facteur de compensation, la manipulation de la densité du couvert a dû être réalisée courant montaison, pour ne pas engendrer ou limiter le plus possible le sur-tallage des plantes étudiées. Ainsi, un gain de fertilité des épis a effectivement été observé (en moyenne, +20%), malgré un sur-tallage régulier des plantes restantes (moindre régression des talles supposée). Il semble ainsi difficile expérimentalement d'identifier précisément le stade de développement pour manipuler la densité d'épis et la modification simultanée de ces deux composantes a donc imposé le recours à des métriques spécifiques, décrivant l'augmentation du nombre de grains/épi (NGE) pondéré par le sur-tallage (NEM²), ou le gain de grains/cm² disponible par épi, avec toutes les imprécisions inhérentes à ce type d'estimation.

L'environnement semble également avoir un impact : les essais à fort nombre de grains/m² sur les modalités témoins présentent généralement davantage de sur-tallage. Outre la date d'éclaircissage, les conditions environnementales seront donc à prendre en considération.

► Existence d'un effet variétal sur la plasticité des épis

Les variétés comparées lors des essais ont montré des comportements contrastés entre la modalité témoin et celle éclaircie, sur le sur-tallage d'une part (de +1 à +10 %, avec une forte variabilité inter-essais), et sur la fertilité des épis (+7 à +39%). La combinaison du sur-tallage et de la plasticité de la fertilité épi conduit donc à une large gamme de réponses variétales à l'accroissement de ressources (Fig. 6 & 7). Ces observations réalisées sur blé tendre (4 essais) semblent être transposables

au blé dur (3 essais). Pour le blé tendre, une variété comme Gerry augmentera son nombre de grains par épi suite à l'éclaircissage de +0.25 grain/cm² alors que Ascott l'augmentera de +1.2 grain/cm². Pour le blé dur, la gamme de variation est équivalente compte-tenu du fait que moins de variétés ont été observées, avec Relief montrant la plus faible (0.0 grain/cm²) et Anvergur la plus forte (+0.7) augmentation. Aussi bien sur le blé tendre que sur le blé dur, on observe une tendance pour une réponse plus faible pour les variétés tardives.

► **Caractérisation des variétés par des essais non dédiés ; variabilité de comportement essai par essai**

Les jeux de données issus des réseaux BreedWheat et Post-Inscription en blé tendre ont permis d'étudier la relation nombre de grains/épi en fonction du nombre d'épis/m² dans un ensemble de dispositifs non dédiés.

Les données BreedWheat, équilibrées entre 32 environnements et 210 variétés, ont permis d'identifier 80 variétés extrêmes. Les variétés les plus plastiques pour la fertilité des épis sont en tendance également celles qui produisent le plus d'épis/m², associés à une moindre fertilité d'épis. Cette tendance significative est néanmoins assez lâche, et différents profils de plasticité ont pu être observés dans le panel BreedWheat.

Les données issues d'essais Post-Inscription ont présenté la double particularité d'être plus diversifiées en termes de contextes pédo-climatiques, et d'être déséquilibrées : toutes les variétés ne sont systématiquement présentes dans tous les essais.

La comparaison des plasticités calculées sur les deux jeux de données présente une corrélation positive assez ténue ($p < 0.1$) ; en particulier, on peut noter que le jugement porté sur certaines variétés « extrêmes » dans un réseau peut être contredit dans l'autre. Cette instabilité de classement n'a pas pu être davantage analysée (environnement pédo-climatique et cultural, méthodologie expérimentale), mais elle incite à la prudence dans l'évaluation variétale de la plasticité.

► **Mécanismes sous-jacents à la plasticité de la fertilité des épis**

La modification de la densité de plantes/m² ou l'application d'ombrages d'intensités variées permettent de moduler la quantité de ressource lumineuse disponible par plante et par épi, sans modification de la disponibilité des éléments nutritifs dans le milieu (eau, azote). Ainsi, on observe que le nombre d'épis final par plante répond, de manière non linéaire et moins que proportionnelle, à une modification de la quantité de ressource disponible. De la même manière, le nombre de grains/épi répond à cet accroissement de ressource, de manière asymptotique.

Dans le contexte étudié (modification de l'environnement lumineux en milieu de montaison, soit après le stade épillet terminal), le nombre d'épillets par épi est inchangé, et l'accroissement de la fertilité de l'épi est le résultat d'un nombre accru de grains par épillets : le taux d'avortement des fleurons est réduit lorsque la ressource lumineuse par épi est plus abondante. Cependant, le dispositif mis en place ne permet pas de distinguer si l'origine de la réponse des plantes est strictement la

quantité de lumière disponible par tige restante, ou si un signal qualitatif est impliqué.

Les résultats montrent que le nombre de grains est un trait plus plastique chez Ascott que chez Sy Moisson, confirmant le classement de ces deux génotypes à l'issue des essais conduits en 2021. Cette différence de plasticité est due à une plasticité différente entre les deux génotypes pour les deux composantes du nombre de grains, à savoir le nombre d'épis et le nombre de grains par épi. La plasticité plus élevée du nombre de grains par épi du génotype Ascott par rapport à celle de Sy Moisson a été observée dans les deux lieux, comme le montrent les différences de pentes entre génotypes de la relation entre le nombre de grains par épi et la disponibilité relative en ressources par épi (Fig. 9). Il faut noter que cette plus grande plasticité du génotype Ascott s'observe également si on considère uniquement le maître-brin ou le nombre de fleurons fertiles (données non présentées).

On peut noter que l'expression de la plasticité de la fertilité épi, en modulant le nombre de grains/épillet, et non le nombre d'épillets, est pratiquement indécélable ou quantifiable visuellement au champ. Cette propriété ne peut donc être étudiée et améliorée qu'à travers l'étude de la composante « grains par épi » obtenue à la moisson après récolte du couvert.

► **Précision des mesures et différences entre jeux de données**

Si des essais dédiés impliquant des manipulations de la structure du couvert et donc des composantes de rendement ont permis de confirmer des différences variétales observées dans des jeux de données larges et antérieurs, il est légitime de s'interroger sur l'effectif minimal nécessaire d'essais de type « post-inscription » requis (avec mesure rigoureuse des composantes de rendement) pour porter un jugement fiable sur le caractère plastique d'une variété. Les données du réseau BreedWheat indique que le recours à 24 essais au lieu de 32 dégrade nettement la capacité à convenablement discriminer les variétés les plus extrêmes.

► **Considérations méthodologiques pour l'étude de la plasticité de la fertilité des épis**

Le critère de plasticité de la fertilité épi s'avère donc difficile à évaluer précisément :

- il requiert une mesure précise des composantes Nombre de Grains/épi et Nombre d'épis/m² ;
- les réponses variétales peuvent s'avérer très disparates entre essais, sans qu'il soit en l'état possible d'attribuer cette variabilité à des facteurs climatiques, nutritionnels ou expérimentaux ;
- en l'absence de dispositif dédié, un nombre conséquent d'observations doivent être collectées.

Les méthodes d'expérimentation actuelles semblent donc peu adaptées à la caractérisation routinière et précoce de ce paramètre variétal. Il est cependant possible d'évaluer la plasticité de la fertilité épi en multipliant les déterminations de composantes sur des essais « standard » ou en menant des essais dédiés incluant de la modification de la structure du couvert (destruction d'un rang sur deux courant montaison) comme mis en œuvre dans cette étude.

La détermination de la densité d'épis par phénotypage à haut débit, non destructeur, permet désormais d'accéder à la composante de rendement la plus exigeante en temps de travail. Le dispositif testé dans le cadre de ce projet permet d'échantillonner 1 à 1.5 m² et de déterminer la densité d'épis avec une précision égale ou supérieure à un comptage manuel en moins de 1 minute au champ par parcelle (hors temps de préparation et d'analyse au bureau). L'estimation du nombre de grains par épi reste par contre destructive et moyen débit (échantillonnage d'épis, battage, comptage des grains).

L'éclaircissage du couvert pour laisser la plasticité de la fertilité épi s'exprimer peut être mécanisé pour la mise en place d'expérimentations dédiées de grande dimension. Un éclaircissage précoce (dès le semis ou avant la mi-tallage) va automatiquement engendrer un sur-tallage abondant, qui risque de limiter pour partie la compensation par la fertilité épi, mais peut également mettre en évidence une plasticité supplémentaire : la plasticité de tallage. A l'inverse, un éclaircissage mi-montaison, mécanisable par binage ou par broyage, peut mimer les dispositifs conduits manuellement au cours de ce projet.

D'un point de vue méthodologique, l'expression de la plasticité de la fertilité des épis, voire du tallage en fonction du mode de manipulation du couvert, va avoir lieu dès que l'environnement lumineux permettra leur expression, notamment en microparcelles au niveau des fronts de parcelle (voisinage de l'allée) et/ou en interparcelle si celle-ci s'avère significativement plus large que les interrangs. Ainsi, les plantes présentes à la périphérie d'une microparcelle auront plus de ressources pour produire davantage d'épis et des épis plus fertiles que les plantes présentes à l'intérieur du couvert. Selon la géométrie des parcelles, ces « plantes de périphérie » peuvent représenter de 4 à 34 % du peuplement, et peuvent produire un nombre de grains/plante très substantiellement supérieur à celles présentes en milieu de couvert. Ceci pourrait présenter 2 conséquences significatives :

- pour l'expérimentation, ceci conduit à l'obtention d'un poids parcellaire majoré par rapport à la surface effectivement semée, et donc au calcul d'un nombre de grains/m² et de grains/épi non représentatif du cœur de parcelle (où la densité d'épis est généralement déterminée). Ainsi, dans un réseau

d'essais aux pratiques hétérogènes (nombre et longueurs des rangs variables) tel que BreedWheat, les estimations des composantes de rendement peuvent être altérées, et le comportement des variétés plus difficile à mettre en évidence ;

- pour la sélection, on peut émettre l'hypothèse que les tris réalisés sur la valeur du rendement en très petites parcelles favorisent mécaniquement les variétés plastiques pour le tallage comme pour la fertilité des épis.

► Stratégies variétales de composantes de rendement

L'étude menée met en exergue les différences variétales sur la plasticité des composantes : s'il est couramment admis que l'altération d'une composante C peut ouvrir la voie à une variation de la composante C+1, la diversité génétique dans le matériel végétal inscrit est peu ou pas analysée, à la différence des valeurs moyennes des composantes variétales. Or le projet Plastix illustre que la valeur moyenne d'une composante ne renseigne pas suffisamment l'aptitude de la variété à adapter ses composantes aux conditions de croissance.

Différentes stratégies variétales peuvent être imaginées : forte plasticité du tallage et de la fertilité épi, faibles plasticités pour les deux composantes, etc... et l'analyse du panel BreedWheat renseigne que ces différents comportements se retrouvent dans les variétés françaises ; il semble cependant qu'il y ait un lien préférentiel entre plasticité du tallage et de la fertilité. Il existe donc des variétés « plastiques » qui ajustent fortement leurs composantes NEM2 et NGE au cours du cycle, et d'autres plus « stables » ; la conséquence de la plasticité des composantes NEM2 et NGE semble néanmoins conduire à une stabilisation de la composante NGM2.

Les conclusions du projet ne permettent pas d'aboutir à des propositions d'idéotypes de plasticité en fonction des milieux et des aléas rencontrés, faute d'avoir pu analyser l'effet des plasticités sur la stabilité du rendement final, et l'effet de quelques stress courants (sécheresse printanière, excès d'eau ou gel hivernaux, carence précoce en azote) sur le maintien de l'aptitude à compenser. Cependant, le projet Plastix a produit ou validé un ensemble de cadres conceptuels d'analyse, de méthode de travail au champ et d'accès à la mesure des composantes pour permettre d'instruire efficacement la question de la recommandation variétale.

Références bibliographiques

- Araus, J. L., Slafer, G. A., Royo, C., and Serret, M. D.** (2008). Breeding for Yield Potential and Stress Adaptation in Cereals. *Crit. Rev. Plant Sci.* 27, 377-412. doi: 10.1080/07352680802467736
- Brisson, N., Gate, P., Gouache, D., Charmet, G., Oury, F.-X., and Huard, F.** (2010). Why are wheat yields stagnating in Europe? A comprehensive data analysis for France. *Field Crops Res.* 119, 201-212. doi: 10.1016/j.fcr.2010.07.012
- Calderini, D. F., and Slafer, G. A.** (1998). Changes in yield and yield stability in wheat during the 20th century. *Field Crops Res.* 57, 335-347. doi: 10.1016/S0378-4290(98)00080-X

- Dreccer, M. F., Chapman, Scott. C., Rattey, A. R., Neal, J., Song, Y., Christopher, J. (Jack) T., et al.** (2013). Developmental and growth controls of tillering and water-soluble carbohydrate accumulation in contrasting wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes: can we dissect them? *J. Exp. Bot.* 64, 143-160. doi: 10.1093/jxb/ers317
- Evans, L. T., and Fischer, R. A.** (1999). Yield Potential: Its Definition, Measurement, and Significance. *Crop Sci.* 39, 1544-1551. doi: 10.2135/cropsci1999.3961544x

- Ferrante, A., Savin, R., and Slafer, G. A.** (2013). Is floret primordia death triggered by floret development in durum wheat? *J. Exp. Bot.* 64, 2859–2869. doi: 10.1093/jxb/ert129
- Fischer, R. A.** (1985). Number of kernels in wheat crops and the influence of solar radiation and temperature. *J. Agric. Sci.* 105, 447. doi: 10.1017/S0021859600056495
- Fischer, R. A.** (2011). Wheat physiology: a review of recent developments. *Crop Pasture Sci.* 62, 95. doi: 10.1071/CP10344
- Fischer, R. A. (Tony), and Edmeades, G. O.** (2010). Breeding and Cereal Yield Progress. *Crop Sci.* 50. doi: 10.2135/cropsci2009.10.0564
- Fischer, R. A., and Turner, N. C.** (1978). Plant Productivity in the Arid and Semiarid Zones. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29, 277–317. doi: 10.1146/annurev.pp.29.060178.001425
- Foulkes, M. J., Slafer, G. A., Davies, W. J., Berry, P. M., Sylvester-Bradley, R., Martre, P., et al.** (2011). Raising yield potential of wheat. III. Optimizing partitioning to grain while maintaining lodging resistance. *J. Exp. Bot.* 62, 469–486. doi: 10.1093/jxb/erq300
- Gambín, B. L., and Borrás, L.** (2010). Resource distribution and the trade-off between seed number and seed weight: a comparison across crop species. *Ann. Appl. Biol.* 156, 91–102. doi: 10.1111/j.1744-7348.2009.00367.x
- Ghiglione, H. O., Gonzalez, F. G., Serrago, R., Maldonado, S. B., Chilcott, C., Curá, J. A., et al.** (2008). Autophagy regulated by day length determines the number of fertile florets in wheat. *Plant J.* 55, 1010–1024. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03570.x
- Gonzalez, F. G., Miralles, D. J., and Slafer, G. A.** (2011). Wheat floret survival as related to pre-anthesis spike growth. *J. Exp. Bot.* 62, 4889–4901. doi: 10.1093/jxb/err182
- Kirby, E. J. M. (1988). Analysis of leaf, stem and ear growth in wheat from terminal spikelet stage to anthesis. *Field Crops Res.* 18, 127–140. doi: 10.1016/0378-4290(88)90004-4
- Mini, A., Touzy, G., Beauchêne, K., Cohan, J.-P., Heumez, E., Oury, F.-X., et al.** (2023). Genetic regions determine tolerance to nitrogen deficiency in European elite bread wheats grown under contrasting nitrogen stress scenarios. *Theor. Appl. Genet.* 136, 218. doi: 10.1007/s00122-023-04468-x
- Paux, E., Lafarge, S., Balfourier, F., Derory, J., Charmet, G., Alaux, M., et al.** (2022). Breeding for Economically and Environmentally Sustainable Wheat Varieties: An Integrated Approach from Genomics to Selection. *Biology* 11, 149. doi: 10.3390/biology11010149
- Peltonen-Sainio, P., Jauhiainen, L., and Sadras, V. O.** (2011). Phenotypic plasticity of yield and agronomic traits in cereals and rapeseed at high latitudes. *Field Crops Res.* 124, 261–269. doi: 10.1016/j.fcr.2011.06.016
- Reynolds, M., Foulkes, J., Furbank, R., Griffiths, S., King, J., Murchie, E., et al.** (2012). Achieving yield gains in wheat. *Plant Cell Environ.* 35, 1799–1823. doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02588.x
- Reynolds, M., Foulkes, M. J., Slafer, G. A., Berry, P., Parry, M. A. J., Snape, J. W., et al.** (2009). Raising yield potential in wheat. *J. Exp. Bot.* 60, 1899–1918. doi: 10.1093/jxb/erp016
- Rosegrant, M. W., and Cline, S. A.** (2003). Global Food Security: Challenges and Policies. *Science* 302, 1917–1919. doi: 10.1126/science.1092958
- Sadras, V. O.** (2007). Evolutionary aspects of the trade-off between seed size and number in crops. *Field Crops Res.* 100, 125–138. doi: 10.1016/j.fcr.2006.07.004
- Sadras, V. O., and Denison, R. F.** (2009). Do plant parts compete for resources? An evolutionary viewpoint. *New Phytol.* 183, 565–574. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02848.x
- Sadras, V. O., and Rebetzke, G. J.** (2013). Plasticity of wheat grain yield is associated with plasticity of ear number. *Crop Pasture Sci.* 64, 234. doi: 10.1071/CP13117
- Sadras, V. O., and Slafer, G. A.** (2012). Environmental modulation of yield components in cereals: Heritabilities reveal a hierarchy of phenotypic plasticities. *Field Crops Res.* 127, 215–224. doi: 10.1016/j.fcr.2011.11.014
- Sinclair, T. R., and Rufty, T. W.** (2012). Nitrogen and water resources commonly limit crop yield increases, not necessarily plant genetics. *Glob. Food Secur.* 1, 94–98. doi: 10.1016/j.gfs.2012.07.001
- Slafer, G. A.** (2003). Genetic basis of yield as viewed from a crop physiologist's perspective. *Ann. Appl. Biol.* 142, 117–128. doi: 10.1111/j.1744-7348.2003.tb00237.x
- Slafer, G. A., and Andrade, F. H.** (1991). Changes in physiological attributes of the dry matter economy of bread wheat (*Triticum aestivum*) through genetic improvement of grain yield potential at different regions of the world: A review. *Euphytica* 58, 37–49. doi: 10.1007/BF00035338
- Slafer, G. A., Calderini, D. F., Miralles, D. J., and Dreccer, M. F.** (1994). Preanthesis shading effects on the number of grains of three bread wheat cultivars of different potential number of grains. *Field Crops Res.* 36, 31–39. doi: 10.1016/0378-4290(94)90050-7
- Slafer, G. A., Kantolic, A. G., Appendino, M. L., Miralles, D. J., and Savin, R.** (2009). "Crop Development: Genetic Control, Environmental Modulation and Relevance for Genetic Improvement of Crop Yield," in *Crop Physiology*, (Elsevier), 277–308. doi: 10.1016/B978-0-12-374431-9.00012-8
- Stocker, T. ed.** (2014). Climate change 2013: the physical science basis: Working Group I contribution to the Fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. New York: Cambridge University Press.
- Touzy, G., Rincet, R., Bogard, M., Lafarge, S., Dubreuil, P., Mini, A., et al.** (2019). Using environmental clustering to identify specific drought tolerance QTLs in bread wheat (*T. aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 132, 2859–2880. doi: 10.1007/s00122-019-03393-2
- Zhang, H., Turner, N. C., Simpson, N., and Poole, M. L.** (2010). Growing-season rainfall, ear number and the water-limited potential yield of wheat in south-western Australia. *Crop Pasture Sci.* 61, 296. doi: 10.1071/CP09288

PLASTIX : Plasticité des composantes de rendement des céréales à paille

Vincent ALLARD¹, Christine GIROUSSE¹, Jacques LE GOUIS¹, Jean-Charles DESWARTE², Stéphanie THEPOT³, Jérôme AUZANNEAU⁴, Sébastien CAIVEAU⁵, Pascal GIRAUDEAU⁶, Gustavo SLAFER⁷, Denis VILE⁸, Benoît DE SOLAN⁹

1 - INRAE - Université Clermont-Auvergne, UMR GDEC- Chemin de Crouel, 63000 Clermont-Ferrand, FRANCE

2 - Arvalis - ZA des Gravières, 91190 Villiers-le-Bâcle, FRANCE

3 - BASF France SAS - Ferme du Paly, 91490 Milly-la-Forêt, FRANCE

4 - Agri-Obtentions - Chemin De La Petite Minière, 78280 Guyancourt, FRANCE

5 - Syngenta - Avenue Gustave Eiffel, 28000 Chartres, FRANCE

6 - Secobra Recherches - Le Bois Henry, 78580 Maule, FRANCE

7 - Université de Lleida - ETSIA, Av. de l'Alcalde Rovira Roure 191, E-25198 Lleida, ESPAGNE

8 - INRAE - LEPSE - 2 pl P Viala, F-34060 Montpellier, FRANCE

9 - Arvalis - Domaine Saint Paul, Site Agroparc, Bâtiment Climat 228, route de l'Aérodrome, 84914 Avignon, FRANCE

*Coordinateur : Vincent ALLARD, vincent.allard@inrae.fr

Résumé

- La plasticité des composantes s'intéresse à la variation d'une composante par rapport à une autre. Il est supposé que la plasticité du tallage et de la fertilité épi constituent un levier variétal d'adaptation aux stress climatiques ou nutritionnels.
- La valorisation des larges jeux de données existants sur blé tendre (essais BreedWheat, réseau post-inscription) permet d'explorer les variations des composantes dans des contextes pédo-climatiques variés, sans induire de manipulation des couverts. Des différences variétales fortes ont été observées.
- Des essais dédiés, incluant une manipulation de la densité des épis, a pu démontrer la variabilité génétique de la plasticité de la fertilité épi. L'accès aux ressources lumineuses semble être le déclencheur de la compensation via le nombre de grains par épi.
- La plasticité de la fertilité des épis résulte d'une modification du nombre de grains/épi, et non du nombre d'épillets. Elle n'est donc décelable qu'à travers le comptage effectif des grains ou le calcul de la composante « grains/épi ». Ce calcul requiert un accès aisé à la densité de semis, désormais accessible avec des outils de phénotypage à haut débit.
- La configuration des parcelles peut avoir un impact fort sur l'expression de la plasticité des épis, et sur les valeurs de composantes de rendement estimées par calcul.

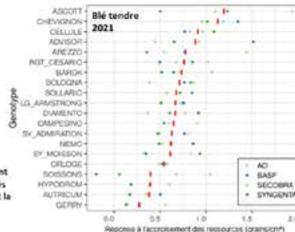
Matériel - méthodes

- Les données de composantes de rendement mesurées sur les essais antérieurs (projet BreedWheat, réseau Post-Inscription Blé Tendre) ont été analysées à l'aide d'une approche par modèles mixtes des relations bivariées entre composantes. Le rendement et le PMG ont été mesurés à la récolte (parcelle entière); la densité d'épis a été déterminée au centre de la parcelle; la fertilité a été obtenue par calcul à partir des autres composantes.
- Des essais factoriels dédiés ont été menés entre 2020 et 2023 en microparcelles (3-4 répétitions), avec manipulation de la densité d'épis du couvert (suppression d'un rang sur deux, éventuellement ombrage) afin d'étudier la plasticité de la fertilité épi de différentes variétés de blé tendre et de blé dur, indépendamment de la réponse du tallage. Densité d'épis et fertilité épi ont été mesurées sur des placettes au centre des parcelles.
- L'estimation de la densité des épis par capteur a été évaluée sur le matériel Literal (développement Capte); 4 essais Blé Tendre et 2 essais Blé Dur menés en 2023 ont fourni le support pour des estimations paires (quadrats de 0,25m²) ou non paires (mode opératoire propre à chaque méthode de la densité d'épis).
- L'impact des rangs de bordures, espacement entre parcelles et dimensions de parcelles a été évalué en 2021 et 2023 (Villiers-le-Bâcle, 91) sur deux variétés de blé tendre.

Résultats

- Les expérimentations dédiées à l'expression de la plasticité de la fertilité épi (avec suppression d'un rang sur 2 mimontaison) ont confirmé l'existence d'une variabilité génétique forte en blé tendre comme en blé dur (Fig. 1).

Fig. 1 : Réponse du nombre de grains par épi à l'accroissement des ressources par arrachage d'un rang sur deux pour les variétés de blé tendre en 2021. Les barres verticales rouges représentent la moyenne des différents lieux. (AG, Agri-Obtentions)



- Les essais non dédiés tels que BreedWheat permettent également d'explorer la plasticité des composantes (variations conjointes de la densité d'épis et de leur fertilité); la variabilité de la réponse de la fertilité des épis à la densité d'épis présente une composante variétale très significative, avec 80 variétés (sur 210) qui se distinguent de la réponse moyenne (Fig 2). Cependant le nombre de données pour obtenir un classement stable est important (>20 essais environ).
- L'analyse combinée de la densité d'épis et de la fertilité des épis montre qu'il existe différentes stratégies de plasticité au sein du panel; en tendance, la plasticité de la fertilité épi est corrélée à la plasticité du tallage (Fig 3).

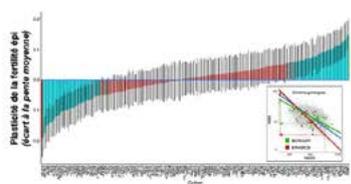


Fig. 2 : Variation de la capacité de compensation pour le nombre de grains/épi et le nombre d'épis/m² dans le jeu de données BreedWheat. Deux génotypes extrêmes sont mis en évidence en rouge (EPHOROS) et en vert (BOREGAR), par rapport à la tendance moyenne (en bleu).

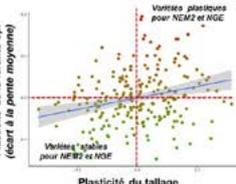


Fig. 3 : Relation entre la plasticité du nombre d'épis/m² et la pente de la compensation entre le nombre de grains/épi et le nombre d'épis/m². Chaque point représente une variété.

- La réponse de la fertilité des épis à une faible densité d'épis semble déclenchée par un signal lumineux (vraisemblablement quantitatif). Le gain provient d'un nombre accru de grains/épillet, et non d'épillets/épi. Les variétés plus plastiques répondent plus fortement à l'accroissement des ressources lumineuses.

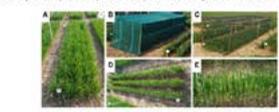
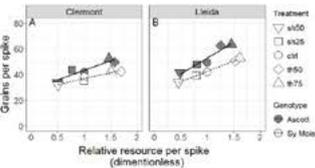


Fig. 4 : Réponse du nombre de grains par épi (relativement au témoin de chaque génotype) à la disponibilité en ressources par épi à Clermont-Ferrand (A) et Lleida (B). La disponibilité en ressources lumineuses est exprimée relativement à la valeur des témoins qui a été fixée à 1.

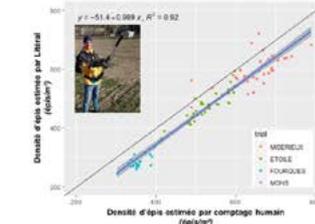


Fig. 6: Comparaison des estimations de densité d'épis par Literal (y) et par comptage humain (x). Valeurs moyennes par génotype et par essai.

- L'estimation de la densité d'épi par analyse d'image, avec du matériel et une chaîne de traitement dédiée est possible. L'outil Literal et la chaîne de traitement dédiée tend à sous-estimer la densité mesurée par comptage manuel, mais les classements variétaux sont conservés (Fig. 6). Le recours à de tels outils facilite la détermination en routine de la densité d'épis dans les essais, et donc l'accès par calcul à la fertilité des épis.

- Les effets de bordure varient en fonction de la configuration des parcelles d'expérimentation (Fig. 7), et peuvent fausser l'estimation du rendement et des composantes

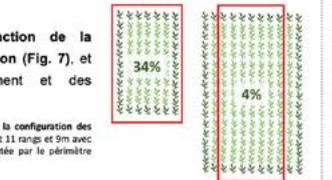


Fig. 7: Représentation schématique des effets de bordure selon la configuration des parcelles. Estimation pour microparcelles de 7 rangs et 5m (gouche) et 11 rangs et 9m avec rangs de bordure (droite). La part de couvert récolté est représentée par le périmètre rouge.

Conclusions

- Les variétés de blé tendre et de blé dur se distinguent à la fois sur la valeur moyenne de leurs composantes de rendement, mais aussi sur leur plasticité et donc leur capacité de compenser.
- La plasticité de la fertilité des épis, en réponse à une fluctuation de la densité d'épis, se manifeste par un nombre accru de grains/épillets et non pas une modification du nombre d'épillets. La ressource lumineuse par tige semble être le stimulus déclenchant la réponse.
- Il est possible d'évaluer les variétés par des essais spécifiques, en manipulant une composante C pour mesurer la réponse de la composante C+1. Peu d'essais spécifiques sont requis pour aboutir à une caractérisation variétale, et une mécanisation est envisageable.
- La valorisation d'essais génériques de type Post-Inscription est possible, mais se heurte à la non-orthogonalité des listes variétés dans le réseau, et au nombre élevé d'observations requises. La configuration des parcelles pouvant induire des effets de bordure très nets, le travail multi-partenaires requiert une attention méthodologique particulière.
- Le développement d'outils de phénotypage haut débit capables d'estimer la densité d'épi doit permettre d'obtenir plus aisément l'ensemble des composantes de rendement nécessaires à l'évaluation de la plasticité des composantes. L'outil Literal basé sur l'analyse d'images permet d'estimer la densité d'épis avec un léger biais, mais un débit très élevé (<1 minute/parcelle)
- Différentes stratégies de plasticité sont présentes dans les panels variétaux français. Les scénarii de stress doivent être confrontés à la réponse de chaque stratégie pour aboutir à une préconisation variétale

Financé par:



DivR : Des outils moléculaires pour la sélection de résistances diversifiées et efficaces contre la septoriose du blé

Thierry C. MARCEL^{1*}, Gwilherm GAZEAU¹, Hadjer BELLAH², Jean-Noël THAUVIN³, Sandrine GELISSE¹, Emmie DZIALO¹, Adeline SIMON¹, Reda AMEZROU¹, Ellen GOUEMAND⁴, Benoit FOUCAULT⁵, Nicholas BIRD⁶, Gemma MOLERO MILAN⁵, Sébastien CAIVEAU⁷, Alexander LOLADZE⁷, Andrea SÁNCHEZ-VALLET⁸, Daniel CROLL², Cyrille SAINTENAC³

1 - Université Paris-Saclay, INRAE, UR BIOGER, Palaiseau, FRANCE

2 - University of Neuchâtel, Laboratory of Evolutionary Genetics, Neuchâtel, SWITZERLAND

3 - UCA, INRAE, GDEC, Clermont-Ferrand, FRANCE

4 - Florimond-Desprez Veuve & Fils SAS, Cappelle-en-Pévèle, FRANCE

5 - KWS, Momont Recherche, Mons-en-Pévèle, FRANCE

6 - KWS UK Ltd, Thriplow, Hertfordshire, UNITED KINGDOM

7 - Syngenta France SAS, Le Jardin des Entreprises, Chartres, FRANCE

8 - CBGP, UPM-INIA, Campus de Montegancedo UPM, Pozuelo de Alarcón, Madrid, SPAIN

*Coordinateur : Thierry C. MARCEL, thierry.marcel@inrae.fr

1 Introduction

La septoriose, causée par le champignon hémibiotrophe *Zymoseptoria tritici*, est une maladie très nuisible affectant les cultures de blé tendre, mais aussi de blé dur et de triticales. Sur blé tendre, elle se rencontre sur tout le territoire avec une pression plus élevée dans la moitié Nord et l'Ouest du pays. Sa nuisibilité annuelle est très variable selon l'année et oscille entre 11 et 25 qx/ha, et peut monter jusqu'à 50 qx/ha en cas de variété sensible et d'année favorable au développement de la maladie (source : Arvalis-Institut du Végétal). La lutte contre la septoriose reste largement assurée par les traitements fongicides. Cependant, cette lutte chimique devient difficile à mener en raison de l'apparition et de la généralisation de souches résistantes aux molécules utilisées, mais aussi à cause de la nécessité de réduire l'usage des pesticides en agriculture. Face à ces évolutions, l'alternative consiste à sélectionner de nouveaux cultivars plus résistants ou tolérants à la septoriose. Toutefois, la caractérisation du niveau de résistance du blé vis-à-vis de la septoriose ainsi que sa sélection restent difficiles. Ces difficultés résident notamment dans notre méconnaissance de la plupart des gènes de résistance présents dans nos variétés ainsi que de la complexité à surveiller l'évolution de l'efficacité de ces gènes vis-à-vis des populations de septoriose.

Z. tritici est un champignon filamenteux soumis aussi bien à la reproduction sexuée, dont les ascospores se dispersent par le vent, qu'à la reproduction asexuée dont les pycnidiospores se dispersent par éclaboussures dues à la pluie (Cohen & Eyal, 1993 ; Suffert & Sache, 2011). Son mode de reproduction sexuée est hétérothallique, c'est-à-dire que deux souches de types sexuels opposés doivent se rencontrer pour que la reproduction sexuée soit réalisée (Waalwick *et al.* 2002 ; Suffert *et al.* 2016, 2019 ; Kema *et al.*, 2018). Ce double mode de reproduction fait que ce champignon a une capacité d'évolution adaptative très importante qui se traduit par une forte spécificité vis-à-vis de son hôte et le contournement rapide des résistances variétales (McDonald *et al.*, 2015). Un des exemples les plus récents de contournement de résistance par

Z. tritici est la variété de blé tendre Cellule, porteuse du gène de résistance *Stb16q* (Kildea *et al.*, 2020). Deux phases se distinguent nettement dans le processus infectieux de *Z. tritici* : une première phase asymptomatique relativement longue suivie d'une phase de nécrotrophie aboutissant à la sporulation du champignon (Palmer & Skinner 2002 ; Sanchez-Vállet *et al.* 2015). La transition entre la phase asymptomatique et la phase de nécrotrophie est accompagnée par une reprogrammation complexe de la transcription chez *Z. tritici*, impliquant notamment la surexpression de nombreux gènes encodant des petites protéines secrétées de fonction inconnue (Palma-Guerrero *et al.* 2015 ; Rudd *et al.*, 2015). Ces petites protéines secrétées sont caractéristiques des effecteurs fongiques dont le rôle est de supprimer les défenses de la plante et d'en altérer la physiologie afin de permettre l'infection (Selin *et al.*, 2016). Les effecteurs sont les déterminants de la virulence, c'est-à-dire de la capacité du pathogène à infecter et coloniser son hôte. Toutefois, certains de ces effecteurs peuvent également avoir un rôle d'avirulence lorsqu'ils sont reconnus par un gène de résistance de la plante entraînant une réaction de défense de celle-ci. L'analyse du génome de la souche *Z. tritici* IPO-323 a permis d'identifier 492 gènes ayant les caractéristiques classiques de ces effecteurs (Do Amaral *et al.*, 2012), mais le répertoire d'effecteurs est généralement très variable entre individus d'une même espèce (Karasov *et al.*, 2014 ; Hartmann & Croll, 2017). Cette variabilité dans le répertoire d'effecteurs ainsi que la variabilité de séquence de ces effecteurs expliquent en grande partie la spécificité de l'efficacité des résistances variétales vis-à-vis des souches de l'agent pathogène. Ces dernières années, plusieurs gènes d'avirulence expliquant la spécificité des souches de *Z. tritici* vis-à-vis des gènes de résistance présents dans les variétés de blé ont été identifiés, notamment *AvrStb6* (Zhong, *et al.* 2017), *Avr3D1* (Meile *et al.*, 2018), *AvrStb9* (Amezrou *et al.*, 2023) et *AvrStb20q* (Langlands-Perry *et al.*, 2023). Ces avancées ouvrent la voie vers le suivi de l'évolution des virulences au sein des populations de *Z. tritici*.

Une meilleure connaissance des gènes de résistance présents dans les variétés de blé cultivées est aussi essentielle pour mieux comprendre ces évolutions et

déterminer les virulences qu'il est le plus important de surveiller. En comparaison à d'autres maladies foliaires comme les rouilles et l'oïdium, le nombre de gènes de résistance à la septoriose cartographiés chez le blé est beaucoup moins grand. Un total de 23 gènes majeurs de résistance ainsi que 89 méta-QTLs ont été identifiés et recensés dans des accessions de blé d'origine très diverses (Brown *et al.* 2015 ; Yang *et al.*, 2018 ; Langlands-Perry *et al.*, 2022). Seuls les gènes *Stb4* (Apache), *Stb6* (nombreux cultivars), *Stb9* (Courtot), *Stb11* (Apache), *Stb15* (Arina et Riband), *Stb16q* (Cellule), *Stb18* (Balance) et *Stb20q* (Renan) ont été identifiés dans des variétés cultivées en Europe (Arraiano *et al.* 2006, 2007 ; Chartrain *et al.* 2009 ; Ghaffary *et al.* 2011 ; Saintenac *et al.*, 2021 ; Langlands-Perry *et al.*, 2022). Il est difficile de savoir si les autres 14 gènes *Stb* connus sont présents dans les variétés cultivées en France car il n'existe aucun marqueur diagnostic pour ces gènes. Afin de pallier à ces difficultés, le projet FSOV 2018 S DivR avait pour objectif le développement d'outils de marquage moléculaire des gènes de résistance présents dans les variétés de blé tendre françaises et de suivi des populations fongiques.

2 Matériel et méthode

► Matériel fongique et végétal

L'unité INRAE BIOGER est impliquée dans le suivi de la population française de *Zymoseptoria tritici* pour l'évolution des résistances aux différentes molécules fongicides utilisées. Dans ce cadre, des échantillons de feuilles de blé infectées sont collectés chaque année dans des parcelles provenant de toutes les régions où le blé est cultivé ; c'est notamment le cas des parcelles du Réseau Performance (Garnault *et al.*, 2019, 2020). Ces échantillons ont été utilisés pour constituer une nouvelle collection de 625 isolats français de *Z. tritici*, collectés entre 2017 et 2019. Parmi ces 625 isolats, 40 isolats ont été sélectionnés pour être testés sur 15 variétés de blé tendre différentielles pour les gènes de résistance *Stb* qu'elles portent (Figure 1) afin de déterminer leur profil de virulences ; ces isolats ont également été testés sur les 5 variétés de blé tendre élites françaises Renan, Apache, Rubisko, Fructidor et LG-Absalon (Figure 1). D'autre part, ces échantillons

ont été utilisés pour constituer une banque d'ADNs représentatifs de la population de *Z. tritici* présente sur une parcelle (ADNs extraits à partir du broyat des feuilles provenant d'un même échantillon).

Un panel de blé composé de 285 variétés représentant la diversité génétique présente dans le matériel génétique de blé tendre élite français (Paux *et al.*, 2022 ; Thauvin *et al.*, non publié) a été évalué avec différents isolats de *Z. tritici* (Tableau 1). 220 variétés de ce panel ont été évaluées précédemment dans le cadre du projet de recherche ANR Biotechnologies Breedwheat (ANR-10-BTBR-03) avec 4 isolats de *Z. tritici* sur plantules en conditions contrôlées et au champ (Tableau 1). L'ensemble des 285 variétés du panel a été évalué dans le cadre du projet FSOV DivR avec 6 autres isolats de *Z. tritici* sur plantules en conditions contrôlées et au champ (Tableau 1).

Pour la validation fonctionnelle des gènes candidats impliqués dans la pathogénie de *Z. tritici*, nous avons utilisé l'isolat ST99CH3D7 collecté en 1999 dans un champ de blé Suisse et précédemment utilisé pour la validation fonctionnelle du gène d'avirulence *Avr3D1* (Meile *et al.*, 2018). L'isolat IPO-323 a également été utilisé pour amplifier le gène candidat *Zt_6_00224* ; IPO-323 a été collecté en 1982 aux Pays-Bas sur la variété Arminda, et a été le premier isolat de *Z. tritici* pour lequel le génome a été entièrement séquencé (Goodwin *et al.*, 2011).

► Tests d'infection en conditions contrôlées

Des tests d'infection en conditions contrôlées, sur jeunes plantes, ont été réalisés afin de déterminer le spectre de virulences de 40 souches de *Z. tritici* sur des variétés de blé tendre différentielles pour les gènes de résistance *Stb* qu'elles portent, mais aussi pour l'évaluation du panel de 285 variétés élites françaises avec 10 souches de *Z. tritici* (Tableau 1). La procédure détaillée de ces tests d'infection est disponible dans Langlands-Perry *et al.* (2022). Brièvement, pour chaque interaction testée (une plante versus un isolat) trois graines ont été semées par pot, puis les pots répartis dans des plateaux contenant 15 pots/plateau. Avant l'inoculation, les plantes ont été cultivées en chambre climatique avec une photopériode de 16h, une hygrométrie fixée à 70% et des températures de 16°C la nuit et 20°C le

Isolat	Variété ¹	Pays ¹	Année	Projet ²	Essais plantules ³	Essais au champ ⁴
IPO-323	Arminda	Pays-Bas	1982	Breedwheat	2	-
IPO-09455	Premio	France	2009	Breedwheat	4	-
IPO-09415	Premio	France	2009	Breedwheat	4	2013 (2) 2014 (2)
IPO-90006	Kavkaz- K4500	Mexique	1990	Breedwheat	2	
INRA16-TM0229	Renan	France	2016	FSOV DivR	1	2019 (1) 2020 (2)
IPO-09593	Apache	France	2009	FSOV DivR	2	-
INRA09-FS0732	Soissons	France	2009	FSOV DivR	2	-
INRA09-FS0813	Soissons	France	2009	FSOV DivR	2	-
ST99CH_3D7	-	Suisse	1999	FSOV DivR	2	-
INRA19-TM0016	LG-Absalon	France	2018	FSOV DivR	1	-

Tableau 1 : Isolats de *Zymoseptoria tritici* utilisés pour l'évaluation du panel de 285 variétés élites françaises dans les projets ANR BreedWheat et FSOV. 1 - Variété et pays d'origine de l'isolat de *Z. tritici* ; 2 - Projet de recherche au sein duquel les données ont été acquises ; 3 - Nombre de répétitions de l'évaluation du panel en conditions contrôlées pour chaque isolat ; 4 - Année pendant laquelle l'évaluation du panel au champ a eu lieu, le nombre d'essais est indiqué entre parenthèses.

jour. Après l'inoculation, les plantes ont été placées dans une chambre climatique avec une photopériode de 16h, hygrométrie fixée à 90% le jour, 80% la nuit et températures de 22°C pendant le jour et 18°C la nuit. Dans les chambres climatiques, les conditions d'éclairage ont été maintenues à 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Dans tous les tests, la variété Taichung-29 a été utilisée comme témoin sensible à la maladie. Les plantes ont été inoculées 16 jours après semis sur la première vraie feuille avec une suspension contenant 10⁶ spores.mL⁻¹. Les pourcentages de surface foliaire inoculée présentant des lésions (note de nécrose ; PLACL) ou portant des pycnides (note de sporulation ; PLACP) ont été estimées visuellement à 21 et/ou 28 jours après l'inoculation. Les aires sous les courbes de progression de la maladie (AUDPC) entre les deux dates d'observation ont ensuite été calculées.

► Tests d'infection au champ

Des essais au champ ont été réalisés sur six sites au cours des saisons 2013, 2014, 2019 et 2020. En 2013-2014, les essais, réalisés dans le cadre du projet Breedwheat, ont été inoculés avec l'isolat IPO09415. En 2019-2020, les essais, réalisés dans le cadre du projet DivR, ont été inoculés avec l'isolat INRA16-TMO229 (Tableau 1). Chaque essai était composé de deux répétitions organisées selon un dispositif aléatoire par blocs. La sévérité de la maladie a été notée pour chaque variété en utilisant une échelle allant de 1 à 9, où 1 signifie totalement résistant et 9 totalement sensible (Naz *et al.*, 2015). Dans chaque essai deux observations ont été réalisées, sauf un essai en 2013 pour lequel seulement une seule observation a pu être faite. Les AUDPC entre les deux dates d'observation ont été calculées. Un modèle de régression multiple prenant en compte la date d'épiaison et la hauteur de la plante a été appliquée aux AUDPC, afin d'éviter l'implication de ces caractères quantitatifs dans le niveau de la maladie et de permettre l'analyse de la résistance à *Z. tritici per se*.

► Approches de GWAS

Des analyses d'association à l'échelle du génome (GWAS) ont été conduites sur le panel de 285 variétés de blé tendre. Les variétés de ce panel avaient précédemment été génotypées sur la puce Axiom TaBW280K (Rimbert *et al.*, 2018), qui a permis de construire une matrice de 151,248 SNPs ayant une fréquence allélique minimum (MAF) de 5%. Les données manquantes et les données hétérozygotes ont été imputées en utilisant la fonction knnImputeLarge du package scribe. Les analyses GWAS ont été réalisées avec la suite logicielle GAPIT v3.0 (Wang & Zhang, 2021) pour deux modèles : un modèle linéaire mixte (MLM) avec la méthode P3D (Zhang *et al.*, 2010 ; Rosyara *et al.*, 2016), et un modèle « Bayesian-information

and Linkage-disequilibrium Iteratively Nested Keyway » (BLINK) (Huang *et al.*, 2018). Le seuil de significativité a été fixé à $-\text{LOG}_{10}(\text{p-value}) = 5$. Le déséquilibre de liaison (DL) a été calculé autour de chaque SNP détecté par les analyses GWAS à l'aide du package LdcorSV (Mangin *et al.*, 2012). Le DL local a été calculé en moyennant le DL sur des fenêtres glissantes de 10 marqueurs. Les SNP ayant un intervalle chevauchant pour un DL de $R^2=0.2$ ont été considérés comme détectant le même QTL. Tous les SNP détectés avec les deux méthodes ont été regroupés. Les QTL ont été définis séparément pour les essais en conditions contrôlées et au champ. Toutes les analyses ont été réalisées avec R version 4.1.2 (R Core Team, 2021). Les intervalles de confiance de tous les QTL ont été définis par rapport au génome de Chinese Spring RefSeq v2.1 (Zhu *et al.*, 2021).

► Transformation génétique de *Zymoseptoria tritici*

Trois gènes candidats issus des études de GWAS ont été priorités pour la validation fonctionnelle parce qu'ils encodent des petites protéines secrétées, fortement surexprimées pendant la phase de transition de la maladie vers la nécrotrophie (Amezrou *et al.*, 2024). Ces trois gènes ont été identifiés sur les variétés résistantes Arina (*Stb6*, *Stb15*), Tadinia (*Stb6*, *Stb4*) et Cadenza (*Stb6*, *Stb9*), respectivement (Tableau 2).

Pour *Zt3_0467*, nous avons exprimé de manière ectopique les allèles virulent (ST99CH3D7) et avirulent (IPO-10273) dans le fond génétique de l'isolat ST99CH3D7. Un fragment contenant le gène *Zt_3_00467*, comprenant 1830 pb en amont du codon d'initiation et 459 pb en aval du codon d'arrêt, a été amplifié à l'aide de l'ADN polymérase Phusion (NEB). Ce fragment a été cloné dans un vecteur pCGEN avec le gène de résistance à la néomycine comme marqueur de sélection, en utilisant le kit de clonage In-Fusion HD (Takara Bio). Les vecteurs ont été transformés à l'aide de cellules *E. coli* Stellar soumises à un choc thermique et vérifiés à l'aide du séquençage Sanger. Les plasmides confirmés ont été transformés dans des cellules d'*Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) par choc thermique suivant une procédure adaptée de Zwiers & de Waard (2001). La sélection des mutants de *Z. tritici* a été réalisée sur des plaques contenant de la généticine (150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Pour *Zt_6_00224*, nous avons exprimé de manière ectopique les allèles virulent (ST99CH3D7) et avirulent (IPO-323) dans le fond génétique de l'isolat ST99CH3D7. Un fragment contenant le gène *Zt_3_00224*, comprenant 1990 pb en amont du codon d'initiation et 1 008 pb en aval du codon d'arrêt, a été amplifié puis cloné dans un vecteur pCGEN. Le clonage et la transformation via ATMT ont été réalisés suivant la procédure décrite ci-dessus.

Gene ID	Chrom	Coordonnées (pb)	MAM ¹ ID	MAM position (pb)	Variété	Trait pheno
Zt_3_00467	chr_3	1540271-1541356	SNP0704075	1 541 043	Arina	PLACP ²
Zt_6_00224	chr_6	960813-961081	SNP1290794	960 964	Tadinia	PLACP
Zt_9_00069	chr_9	272926-273739	SNP1806146	272 732	Cadenza	PLACP

Tableau 2 : Gènes candidats pour leur rôle dans le pouvoir pathogène de *Zymoseptoria tritici*, identifiés par GWAS (Amezrou *et al.*, 2024), et sélectionnés pour la validation. 1 - MAM : marqueur le plus associé ('Most Associated Marker') identifié pendant la GWAS ; 2 - PLACP : pourcentage de la surface foliaire inoculée couverte par la sporulation ('Percentage of Leaf Area Covered by Pycnidia').

Pour *Zt9_0069*, nous avons généré des mutants knock-out dans l'isolat ST99CH3D7. Pour construire les plasmides de délétion du gène, des régions de 1085 pb en amont du codon d'initiation et de 1111 pb en aval du codon d'arrêt du gène *Zt9_0069* ont été amplifiées à partir d'ADN génomique. Ces fragments ont été clonés dans un vecteur pCHYG avec le gène de résistance à l'hygromycine comme marqueur de sélection. Le clonage et la transformation via ATMT ont été réalisés suivant la procédure décrite ci-dessus.

La croissance de tous les mutants produits a été testée en conditions de culture axénique sur milieu Yeast Mannitol Agar (YMA) afin de vérifier que la modification génétique n'affectait pas la croissance du mutant. Pour chaque construction, trois transformants indépendants portant les différents allèles de virulence ou trois mutants knock-out ont été utilisés pour la caractérisation phénotypique *in planta*.

► Séquençage ciblé d'amplicons

Nous avons mis au point une méthode de séquençage ciblé d'amplicons permettant de suivre les virulences, les résistances aux fongicides et les flux de gènes dans les populations de *Z. tritici*. Au total, 798 amplicons ont été conçus sur la base de polymorphismes connus au sein de l'espèce. Les sites polymorphes ont été utilisés à la fois pour sélectionner les SNP à amplifier mais aussi pour concevoir des amorces dans des régions conservées du génome afin d'éviter de possibles biais d'amplification liés à la mauvaise hybridation des amorces. Pour cela, nous avons utilisé les informations de séquences de génomes complets disponibles pour 632 isolats de *Z. tritici* collectés dans l'aire de répartition mondiale du blé ; *i.e.* Australie, Nouvelle Zélande, Etats-Unis, Suisse, France et Israël. La longueur des amplicons conçus a été limitée à environ 200 pb pour garantir une amplification efficace et équilibrée entre les *loci*. La procédure d'identification des polymorphismes et de conception des amplicons est décrite en détail dans Bellah *et al.* (2023).

Notre approche de séquençage ciblé d'amplicons a été testée sur 192 échantillons, dont 4 échantillons étaient des mélanges équimolaires d'ADN de 26 à 30 isolats obtenus à partir de cultures pures, 10 échantillons des mélanges d'ADN de trois isolats (*i.e.* INRA10-FS1006, INRA10-FS1022 et IPO-09455) dans des proportions différentes, et 178 échantillons des ADN extraits directement à partir de feuilles de blé infectées qui ont été collectées dans différentes régions de France, Belgique, Irlande et Angleterre. Les ADN ont été extraits à l'aide du DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) puis les concentrations mesurées à l'aide d'un fluoromètre Qubit 2.0 (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA). Les 798 amplicons ont été générés pour chaque échantillon avec 10 pools d'amorces (chaque pool contenant de 50 à 96 couples d'amorces) par PCR sur un thermocycleur spécialisé Juno™ (Fluidigm Inc., San Francisco, Californie, USA). Nous avons réalisé cette expérience deux fois indépendamment sur deux puces à circuits microfluidiques intégrés LP 192.24 (IFC). Le séquençage Illumina a été effectué en mode paire pour générer des lectures de 100 pb sur la plateforme NovaSeq™6000 à Integragen Inc. (Evry, France) et a produit 363,89 Go de données brutes de séquençage pour chaque puce.

Pour chaque paire de séquences, les lectures *forward* et *reverse* ont été fusionnées afin d'obtenir des pseudo-lectures simples. Ces pseudo-lectures ont ensuite été alignées sur le génome de référence IPO-323 puis les lectures analysées et dénombrées pour chacun des *loci* ciblés par notre approche ; seulement les *loci* avec une couverture minimale de 50 lectures ont été considérés afin de réduire les biais dans l'évaluation des fréquences alléliques. La procédure d'identification des fréquences alléliques aux SNP ciblés est décrite en détail dans Bellah *et al.* (2023). Pour analyser la diversité génétique et la structure de la population de *Z. tritici*, nous avons réalisé une analyse en composantes principales (PCA) en n'utilisant que les résultats de la deuxième répétition (puce Fluidigm), et en excluant les SNP liés à la pathogénie et à la résistance aux fongicides, afin de refléter une structure de population neutre. D'autre part, après l'alignement des pseudo-lectures sur le génome de IPO323, pour chaque amplicon dans chaque échantillon, nous avons assemblé les séquences identiques puis nous les avons comptés en nombre de lectures par million de lectures alignées (Reads per million mapped reads, RPM). Cela a permis d'identifier les variants distincts pour chaque amplicon, puis d'analyser la distribution de ces variants en fonction de l'origine géographique des échantillons et de la virulence d'isolats précédemment caractérisés (pathotype et séquence).

3 Résultats

► Spectre de virulence des isolats collectés en France en 2018

Une nouvelle collection représentative de la population française de *Z. tritici* a été constituée en isolant des isolats monospores à partir d'échantillons de feuilles de blé infectées collectées à travers la France en 2017 (n = 344), 2018 (n = 258) et 2019 (n = 23). Cette collection est donc composée de 625 isolats, provenant de 12 régions françaises et de 27 variétés élites de blé tendre. Cette collection vient compléter l'importante collection d'isolats de référence de *Z. tritici* disponible à INRAE BIOGER, et comprenant notamment 2236 isolats collectés en 2009-2010 sur les variétés Apache et Premio dans le cadre du projet FSOV 2008 H. Parmi les 258 isolats collectés en 2018, 40 ont été choisis provenant des 12 régions et de 17 variétés différentes, afin d'établir leur capacité à infecter 15 variétés de blé tendre différentielles pour les gènes de résistance *Stb* qu'elles portent (*Stb1* à *Stb16q*) ainsi que sur les 5 variétés de blé tendre élites françaises Apache, Rubisko, Fructidor, LG-Absalon et Renan (Figure 1).

Nous considérons un isolat comme virulent (*i.e.* capable de causer une infection) sur une variété donnée lorsqu'il produit une surface foliaire sporulante supérieure à 10%, par opposition à avirulence (*i.e.* incapable de causer une infection). Lorsqu'il est virulent, l'agressivité d'un isolat se traduit par la variation quantitative de la sévérité de l'infection. Parmi les 15 variétés différentielles, la variété témoin sensible 'Taichung-29' est effectivement sensible à 39 des isolats caractérisés (ces isolats sont virulents), mais l'agressivité des isolats varie entre 10% et 100% de surface foliaire sporulante. L'isolat qui n'est

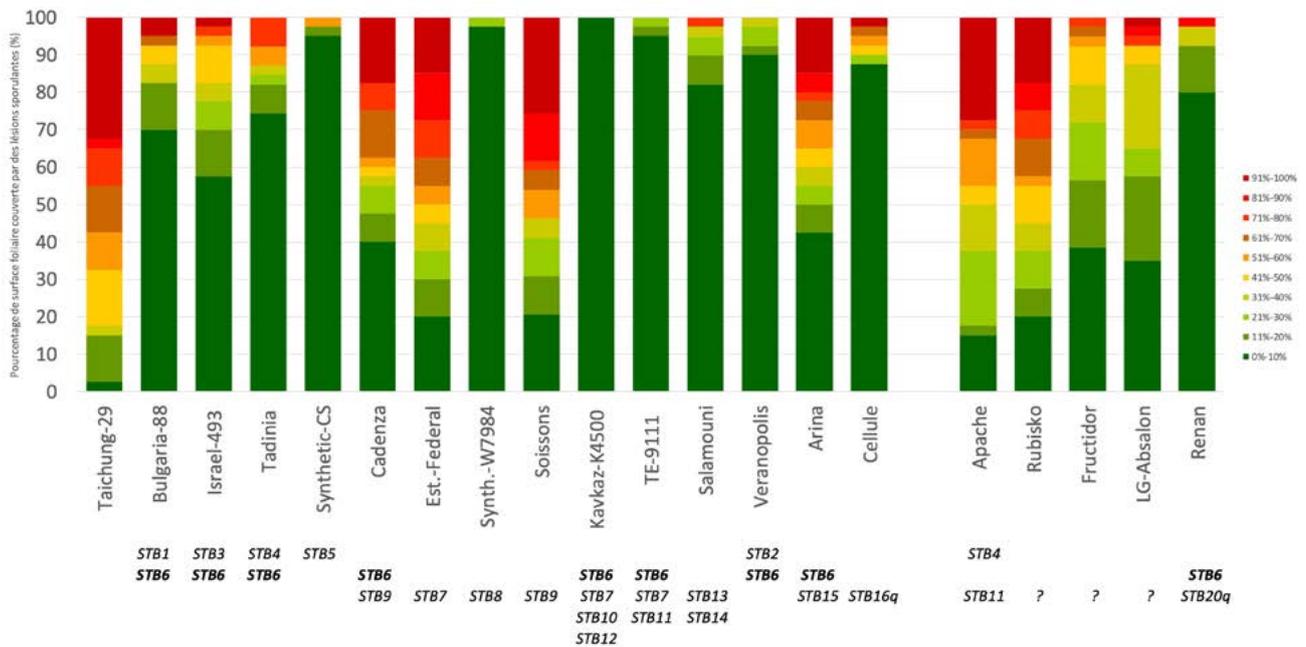


Figure 1 : Distribution de fréquences des 40 isolats de *Z. tritici* en fonction de la sévérité des symptômes (surface de feuille couverte de lésions sporulantes) sur 15 variétés de blé tendre différentielles pour leurs gènes de résistance *STB*, et sur 5 variétés de blé tendre élites françaises. Les gènes de résistance connus dans les variétés sont indiqués sous le graphique ; Taichung-29 est le témoin sensible.

pas virulent sur 'Taichung-29' est virulent sur quatre autres variétés, indiquant que 'Taichung-29' possède tout de même un ou plusieurs facteurs de résistance. Les isolats sont particulièrement agressifs sur les variétés Cadanza, Estanzuela Federal, Soissons et Arina, porteuses des gènes de résistance *Stb6*, *Stb7*, *Stb9* et *Stb15*. Le niveau d'agressivité des isolats est variable sur les variétés élites françaises, allant d'Apache (plus agressifs) à Renan (moins agressifs).

La fréquence de virulence des isolats de *Z. tritici* est très variable d'une variété à une autre mais à globalement peu évoluée entre 2009 et 2018 (Figure 2). Des isolats virulents ont été observés sur toutes les variétés, quelques soient le ou les gènes de résistance portés, mais aucune variété n'était sensible à tous les isolats testés. Aucun isolat n'était virulent sur Cellule en 2009 alors que la virulence sur cette variété, porteuse de *Stb16q*, apparaît en 2018. La fréquence d'isolats virulents reste très faible (inférieure à 10%) sur les variétés Synthetic-CS, Synthetic-W7984, Kavkaz-K4500, TE-9111 et Veranopolis, indiquant l'efficacité des gènes de résistance *Stb2*, *Stb5*, *Stb8*, *Stb11*, *Stb10* et *Stb12* vis-à-vis des populations françaises de *Z. tritici*. Aucune souche virulente n'a été détectée sur Kavkaz-K4500 (*Stb10* et *Stb12*) en 2018. Cette caractérisation a permis d'établir un profil de virulences pour chaque isolat (*i.e.* ensemble des gènes de résistance *Stb* vis-à-vis desquels l'isolat est virulent). Parmi les 40 isolats de 2018, nous avons pu distinguer 33 spectres de virulences différents. Cette importante diversité dans les spectres de virulences traduit la très grande diversité génétique présente dans les populations de *Z. tritici*. A cause de cette diversité, il semble préférable de caractériser les populations de *Z. tritici* en termes de fréquences de virulences vis-à-vis des différents gènes *Stb*, plutôt qu'en termes d'occurrences des spectres de virulence aussi appelés 'races' d'en d'autres pathosystèmes.

► Validation fonctionnelle de 3 gènes d'avirulence chez *Z. tritici*

Parmi la collection d'isolats constituée en 2009-2010 dans le cadre du projet FSOV 2010 K, 103 isolats ont été sélectionnés pour constituer un panel de génétique d'association chez *Z. tritici*. Ce panel a été utilisé pour mener une étude de génétique d'association à l'échelle du génome (*i.e.* GWAS) afin d'identifier les gènes d'avirulence correspondant aux gènes de résistance *Stb* portés par les 15 variétés de blé tendre différentielles (Figure 2). Cette étude a permis

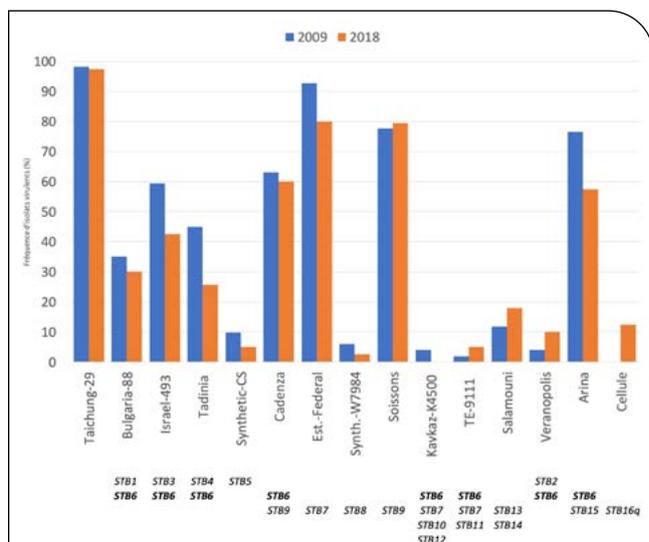


Figure 2 : Fréquence de virulences parmi les isolats de *Zyoseptoria tritici* collectées en France en 2009 ($n = 103$; en bleu) et en 2018 ($n = 40$; en orange). Les virulences sont évaluées sur 15 cultivars de blé tendre portant un ou une combinaison des gènes de résistance *Stb1* à *Stb16q* (indiqué sous le graphique); Taichung-29 est le témoin sensible. Un isolat est considéré virulent lorsqu'il cause une surface foliaire couverte de lésions sporulantes supérieure à 10% sur le cultivar considéré.

d'identifier 65 gènes candidats pour leur implication dans la pathogénie de *Z. tritici*, dont 19 gènes étaient fortement surexprimés pendant la phase de transition de la maladie vers la nécrotrophie (Amezrou *et al.*, 2024). Trois de ces gènes candidats ont été prioritaires pour la validation fonctionnelle, notamment parce qu'ils encodent des petites protéines secrétées. Ces trois gènes ont été identifiés sur les variétés résistantes Arina (*Stb6*, *Stb15*), Tadinia (*Stb6*, *Stb4*) et Cadenza (*Stb6*, *Stb9*), respectivement.

L'isolat ST99CH_3D7 est virulent sur les trois variétés Arina, Tadinia et Cadenza. Il porte l'allèle associé à une plus faible agressivité pour le gène candidat *Zt9_0069*, identifié sur Cadenza. L'inactivation du gène *Zt9_0069* dans la souche ST99CH_3D7 n'a pas permis de confirmer le rôle de ce gène dans le pouvoir pathogène de *Z. tritici* sur Cadenza (Figure 3). L'inactivation de *Zt9_0069* semble conférer une agressivité plus importante à l'isolat ST99CH_3D7Δ*Zt9_0069* (i.e. plus 20% PLACL) mais cette différence n'est pas statistiquement significative. Il est possible que l'effet de ce gène sur la pathogénie de *Z. tritici* soit relativement faible et donc difficile à mettre en évidence ; un plus grand nombre de répétitions dans l'évaluation phénotypique de ces mutants pourrait permettre de clarifier cette question.

L'isolat ST99CH_3D7 porte l'allèle associé à une agressivité plus importante pour les gènes candidats *Zt6_0224* et *Zt3_0467*, identifiés sur Tadinia et Arina respectivement. L'introduction ectopique de l'allèle de l'isolat IPO-323 (associé à une agressivité moins importante) pour le gène *Zt6_0224*, dans le fond génétique de ST99CH_3D7, n'a pas permis de confirmer le rôle de ce gène dans le pouvoir pathogène de *Z. tritici* sur la variété Tadinia (Figure 4). A contrario, l'introduction ectopique de l'allèle de l'isolat IPO-10273 (associé à une agressivité moins importante) pour le gène *Zt3_0467*, dans le fond génétique de ST99CH_3D7, a permis de confirmer le rôle de ce gène dans le pouvoir pathogène de *Z. tritici* sur la variété Arina (Figure 5 ; Amezrou *et al.*, 2024). Ce résultat implique que la variété Arina est capable de reconnaître l'allèle IPO-10273 de *Zt3_0467* pour induire une réaction de défense. Toutefois, cette reconnaissance conduit à un phénotype quantitatif (i.e. moins 11% PLACP) que nous n'avons pu mettre en évidence qu'au tout début de l'apparition des symptômes à 14 dpi. La variété Arina est porteuse des gènes de résistance *Stb6* et *Stb15*. *AvrStb6* a été identifié précédemment, et code pour une petite protéine secrétée, typique d'un effecteur (Zhong *et al.*, 2017). *Zt3_00467* code également pour une petite protéine secrétée, et pourrait interagir avec *Stb15* (Hafeez *et al.*, 2023) ou avec un autre gène de résistance qui n'aurait pas encore été détecté dans la variété Arina.

► Suivi des populations de *Z. tritici* en France

Les amplicons conçus ciblent des SNP associés à 65 gènes candidats pour leur implication dans la pathogénie de *Z. tritici*, qui ont été identifiés au cours de l'étude GWAS de Amezrou *et al.* (2024) ; ces gènes incluent notamment les gènes d'avirulence *AvrStb6* et *AvrStb9* connus chez *Z. tritici* (Zhong *et al.*, 2017 ; Amezrou *et al.*, 2023). Les amplicons conçus ciblent également des mutations connues dans 25 gènes impliqués dans la résistance aux fongicides ; dont

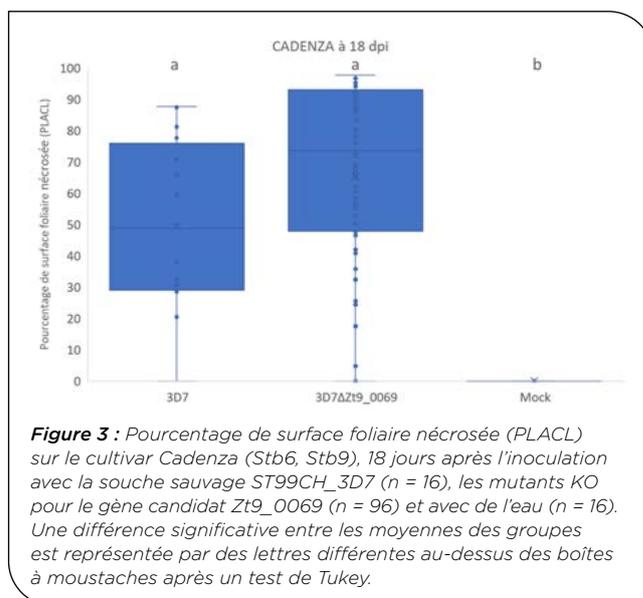


Figure 3 : Pourcentage de surface foliaire nécrosée (PLACL) sur le cultivar Cadenza (*Stb6*, *Stb9*), 18 jours après l'inoculation avec la souche sauvage ST99CH_3D7 (n = 16), les mutants KO pour le gène candidat *Zt9_0069* (n = 96) et avec de l'eau (n = 16). Une différence significative entre les moyennes des groupes est représentée par des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches après un test de Tukey.

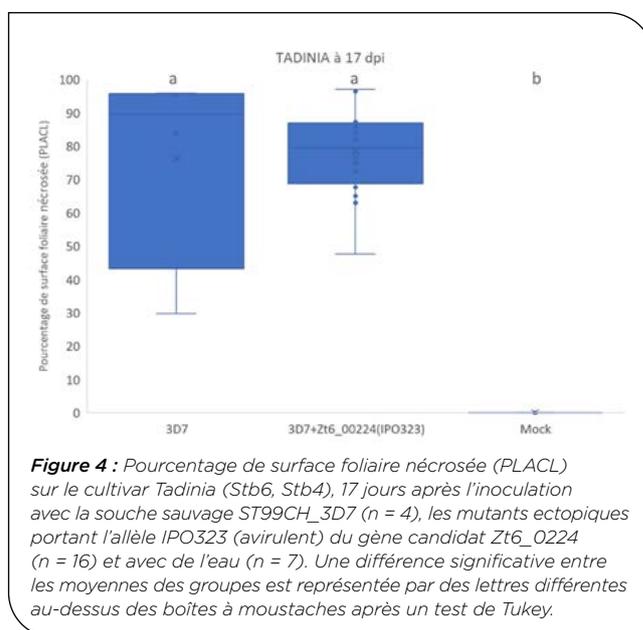


Figure 4 : Pourcentage de surface foliaire nécrosée (PLACL) sur le cultivar Tadinia (*Stb6*, *Stb4*), 17 jours après l'inoculation avec la souche sauvage ST99CH_3D7 (n = 4), les mutants ectopiques portant l'allèle IPO323 (avirulent) du gène candidat *Zt6_0224* (n = 16) et avec de l'eau (n = 7). Une différence significative entre les moyennes des groupes est représentée par des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches après un test de Tukey.

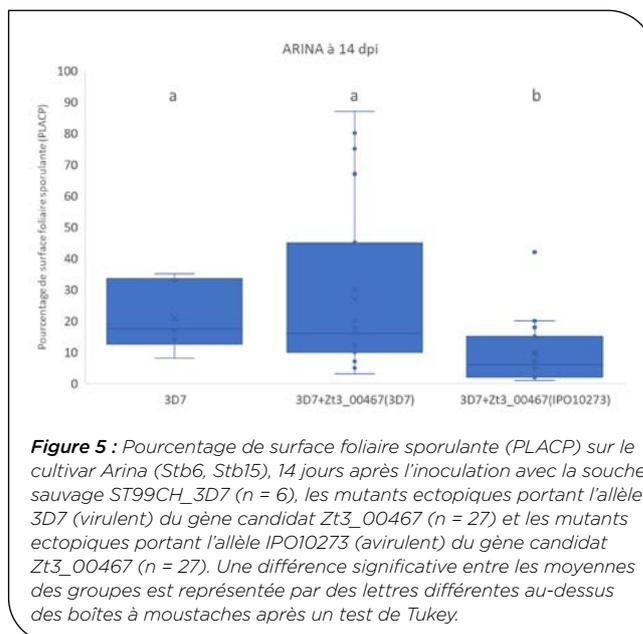


Figure 5 : Pourcentage de surface foliaire sporulante (PLACP) sur le cultivar Arina (*Stb6*, *Stb15*), 14 jours après l'inoculation avec la souche sauvage ST99CH_3D7 (n = 6), les mutants ectopiques portant l'allèle 3D7 (virulent) du gène candidat *Zt3_00467* (n = 27) et les mutants ectopiques portant l'allèle IPO10273 (avirulent) du gène candidat *Zt3_00467* (n = 27). Une différence significative entre les moyennes des groupes est représentée par des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches après un test de Tukey.

les gènes mitochondriaux *CYTB* et *AOX*, et les gènes nucléaires de la bêta-tubuline 1 (résistance à la carbendazime), *CYP51* (résistance aux azoles), et *SDH1*, *SDH2*, *SDH3* et *SDH4* (résistance aux SDHI) (Fraaije *et al.*, 2007 ; Steinhauer *et al.*, 2019 ; Torriani *et al.*, 2009 ; Zhan *et al.*, 2006). La résistance multidrogues (MDR) aux fongicides chez *Z. tritici* est médiée par l'insertion d'éléments transposables dans la région promotrice du transporteur membranaire *MgMFS1* (Omrane *et al.*, 2015, 2017) ; nous avons conçu 16 amplicons couvrant trois des insertions d'éléments transposables et des haplotypes précédemment signalés afin de détecter la présence ou absence de ces insertions. Enfin, nous avons conçu 691 amplicons supplémentaires ciblant des SNP répartis chaque 50 kb le long des 21 chromosomes de *Z. tritici*, afin de capturer la structure de la diversité génétique neutre dans les populations de *Z. tritici*.

Nous avons utilisé 158 échantillons de feuilles de blé infectées par *Z. tritici* collectées dans des champs à travers la France en 2018 et 2019 ; chaque échantillon correspond à un ADN extrait à partir du broyat de feuilles de blé infectées provenant de la même parcelle (même variété, même traitement). Sur la base d'une analyse en composantes principales de 82 SNP à l'échelle du génome, nous avons trouvé une légère différenciation pour les échantillons provenant du Midi-Pyrénées et de Champagne (Figure 6 ; Bellah *et al.*, 2023). Cependant, la différenciation globale entre tous les échantillons était très faible, les première et deuxième composantes principales n'expliquant qu'environ 4% de la variabilité.

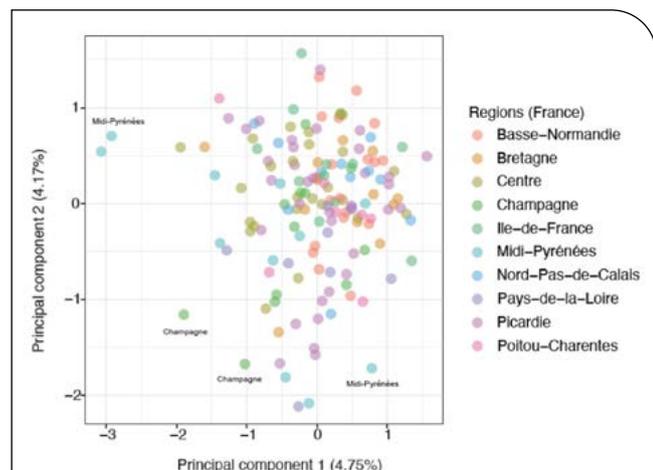


Figure 6 : Analyse en composantes principales représentant la structure génétique de la population française de *Zymoseptoria tritici* basée sur 691 marqueurs répartis le long des 21 chromosomes de *Z. tritici*. Chaque échantillon correspond à plusieurs feuilles de blé infectées, collectées dans une même parcelle ; les différentes couleurs représentent différentes régions (d'après Bellah *et al.*, 2023).

Nous nous sommes ensuite intéressés à deux amplicons ciblant les gènes *AvrStb6* (*i.e.* TXA0371173) et *AvrStb9* (*i.e.* TXA0371142). Pour l'amplicon ciblant *AvrStb6*, 3 variants de séquence ont été identifiés parmi tous les échantillons analysés, alors que pour l'amplicon ciblant *AvrStb9*, 2 variants ont été identifiés. Les fréquences alléliques de chacun de ces variants pour chaque échantillon ont été comparées entre les deux puces à circuits microfluidiques utilisées. Pour ces deux amplicons, la reproductibilité des fréquences alléliques calculées pour chaque variant est très bonne puisque

$R^2 = 0,90$ dans le cas de l'amplicon ciblant *AvrStb6* (Figure 7A) et $R^2 = 0,97$ dans le cas de l'amplicon ciblant *AvrStb9* (Figure 7B). Les deux nuages de points visibles pour TXA0371142 traduisent des fréquences alléliques très différentes entre les deux variants détectés (Figure 7B).

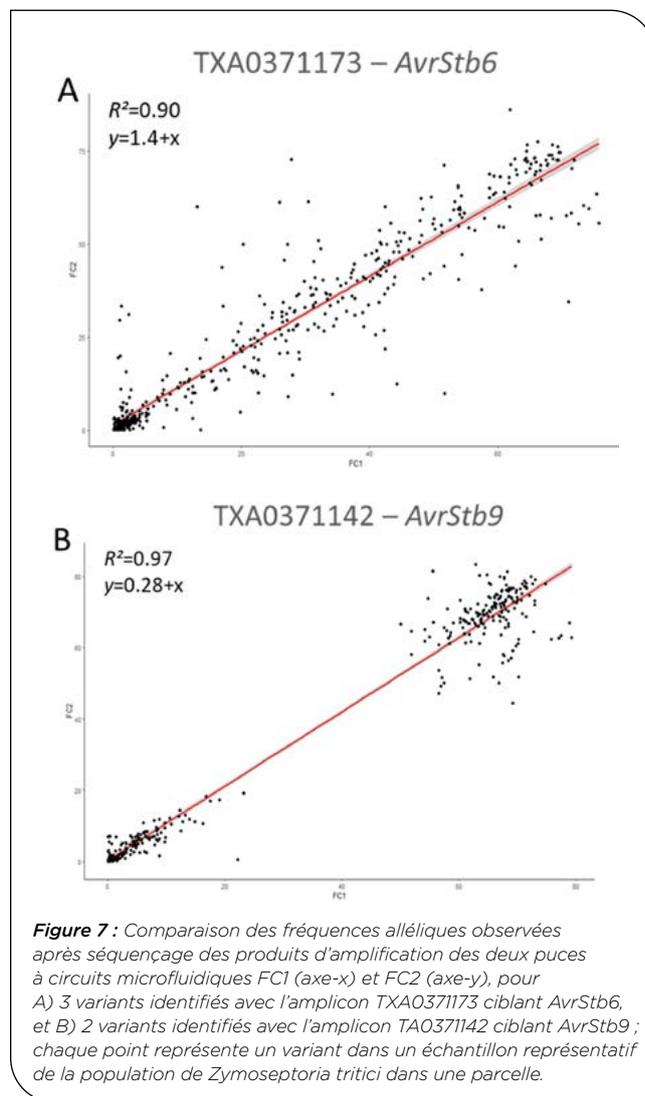


Figure 7 : Comparaison des fréquences alléliques observées après séquençage des produits d'amplification des deux puces à circuits microfluidiques FC1 (axe-x) et FC2 (axe-y), pour A) 3 variants identifiés avec l'amplicon TXA0371173 ciblant *AvrStb6*, et B) 2 variants identifiés avec l'amplicon TA0371142 ciblant *AvrStb9* ; chaque point représente un variant dans un échantillon représentatif de la population de *Zymoseptoria tritici* dans une parcelle.

Nous avons ensuite analysé le phénotype associé à ces variants sur des variétés porteuses du gène de résistance *Stb6* (*i.e.* Cadenza, Shafir, Caphorn) ou du gène de résistance *Stb9* (*i.e.* Soissons, Courtot, Premio), ainsi que la distribution géographique de ces variants. Pour TXA0371173 (*i.e.* *AvrStb6*), le variant 1 est clairement associé à un phénotype avirulent alors que les variants 2 et 3 sont associés à des phénotypes virulents (Figure 8A) ; d'autre part, le variant 1 est plus fréquent dans la moitié Sud du pays alors que le variant 2 est plus fréquent dans la moitié Nord (Figure 8B). Pour TXA0371142 (*i.e.* *AvrStb9*), le variant 2 est associé à un phénotype avirulent globalement peu fréquent à l'échelle du pays, alors que le variant 1 est associé à un phénotype virulent globalement très fréquent (Figure 8C,D). Ces résultats indiquent que notre approche peut se révéler très efficace pour le suivi des gènes d'intérêts chez *Z. tritici*, notamment les gènes liés au pouvoir pathogène et à la résistance aux fongicides.

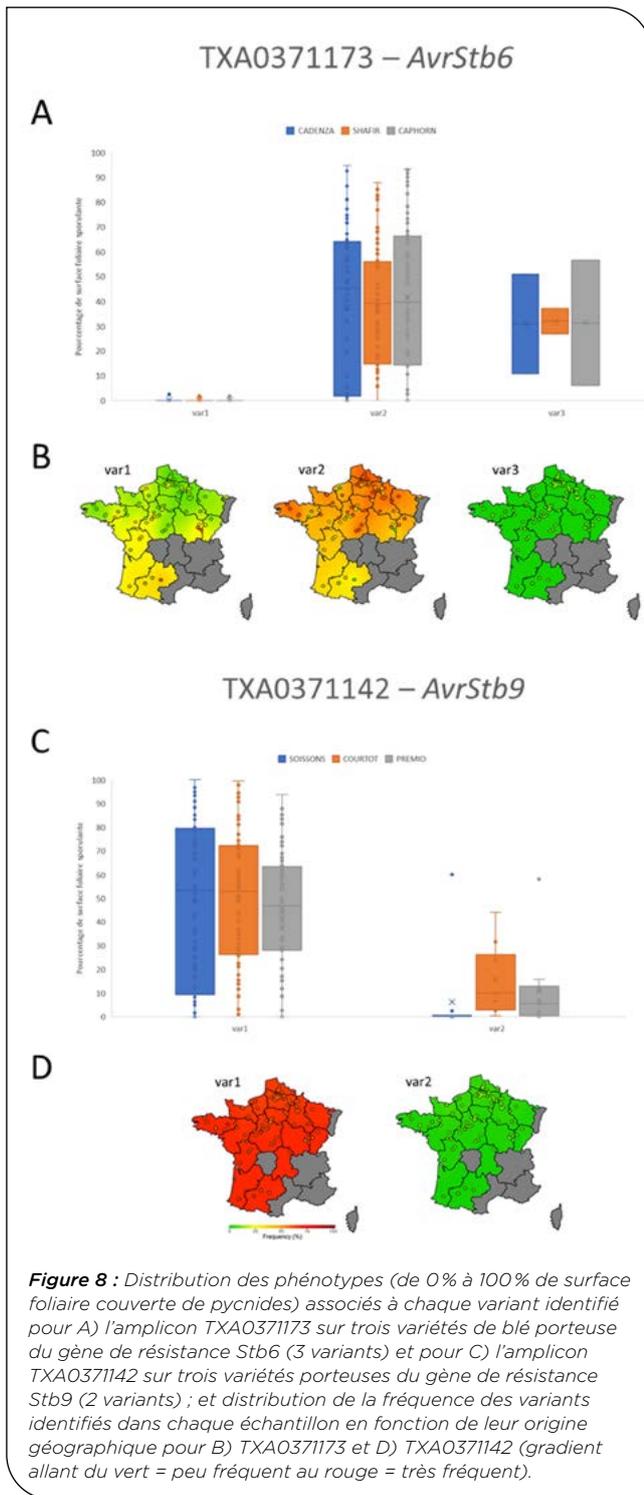


Figure 8 : Distribution des phénotypes (de 0% à 100% de surface foliaire couverte de pycnides) associés à chaque variant identifié pour A) l'amplicon TXA0371173 sur trois variétés de blé porteuse du gène de résistance Stb6 (3 variants) et pour C) l'amplicon TXA0371142 sur trois variétés porteuses du gène de résistance Stb9 (2 variants) ; et distribution de la fréquence des variants identifiés dans chaque échantillon en fonction de leur origine géographique pour B) TXA0371173 et D) TXA0371142 (gradient allant du vert = peu fréquent au rouge = très fréquent).

► Identification des gènes de résistance à la septoriose dans les variétés de blé françaises

Le panel de 285 variétés élités de blé a été phénotypé en conditions contrôlées au stade plantules avec 10 isolats de *Z. tritici* présentant un spectre de virulence différent, et au stade plantes adultes au cours de 7 essais au champ inoculés avec 2 des isolats utilisés en conditions contrôlées. Au stade plantules, la sévérité des symptômes (*i.e.* surfaces foliaires nécrosées et sporulantes) était fortement dépendante des isolats, l'isolat INRA09-FS0732 étant le moins agressif, et les isolats IPO-09415 et INRA16-TM0229 les plus agressifs. Les symptômes variaient aussi fortement en fonction

des variétés et des interactions variété*isolat, suggérant la présence de résistances spécifiques aux isolats. Vingt-et-unes variétés présentaient moins de 10% de sporulation en moyenne, tous isolats confondus. Ces données mettent en évidence la diversité des interactions entre les isolats de *Z. tritici* et les cultivars de blé, tout en identifiant un certain nombre de variétés de blé présentant une résistance à large spectre au stade plantule. Au stade plantes adultes, 4 essais ont été inoculés avec l'isolat IPO-09415 (en 2013 et 2014) et 3 avec l'isolat INRA16-TM0229 (en 2019 et 2020). Les essais inoculés avec l'isolat IPO-09415 présentaient globalement plus de symptômes et une sévérité plus forte de la maladie que les essais inoculés avec INRA16-TM0229. La résistance observée dans ces essais était majoritairement quantitative, avec cependant plusieurs cas de résistance majeure. Quatre cultivars (Ambition, Azzerti, Cellule et Barok) se sont classés parmi les dix les plus résistants dans tous les essais au champ, ce qui suggère la présence d'une résistance stable dans ces variétés.

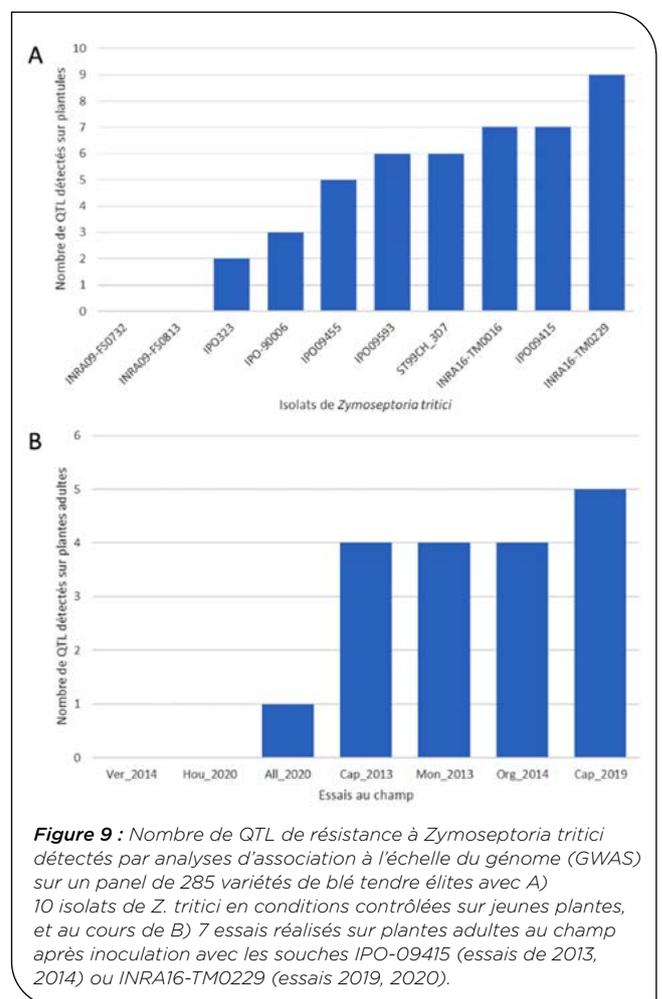


Figure 9 : Nombre de QTL de résistance à *Zymoseptoria tritici* détectés par analyses d'association à l'échelle du génome (GWAS) sur un panel de 285 variétés de blé tendre élités avec A) 10 isolats de *Z. tritici* en conditions contrôlées sur jeunes plantes, et au cours de B) 7 essais réalisés sur plantes adultes au champ après inoculation avec les souches IPO-09415 (essais de 2013, 2014) ou INRA16-TM0229 (essais 2019, 2020).

En conditions contrôlées, 40 QTL de résistance ont été identifiés contre les 10 isolats évalués. Le nombre de QTL identifiés est très variable d'un isolat à un autre, avec aucun QTL détecté pour les isolats INRA09-FS0732 et INRA09-FS0813 malgré la distribution quantitative des symptômes, et jusqu'à 9 QTL détectés avec l'isolat INRA16-TM0229 (Figure 9A). Parmi tous les QTL identifiés, 33 ont été détectés avec un seul isolat de *Z. tritici*, illustrant la spécificité de ces résistances vis-à-vis

de l'isolat, 6 ont été détectés avec deux isolats et 1 avec quatre isolats. Sur plantes adultes au champ, 17 QTL ont été détectés dans les 7 essais réalisés. Aucun QTL n'a pu être détecté à l'aide des données collectées dans les essais Ver_2014 et Hou_2020, et jusqu'à 5 QTL ont été détectés dans l'essai Cap_2019 (Figure 9B). Onze QTL ont été identifiés dans les essais inoculés avec l'isolat IPO-09415, et 6 QTL ont été détectés dans les essais inoculés avec l'isolat INRA16-TM0229. Dans l'ensemble, ces QTL présentent des résistances quantitatives plus faibles que les QTL identifiés en conditions contrôlées. Un seul QTL a été détecté dans deux essais différents inoculés avec le même isolat, IPO-09415, illustrant la faible stabilité de la plupart des QTL de résistance identifiés au champ. Enfin, un seul des 20 QTL détectés au stade plantules à l'aide des isolats IPO-09415 et INRA16-TM0229 a également été détecté lors des essais au champ. Ces résultats indiquent que la résistance du blé contre *Z. tritici* dépend fortement du stade de développement du blé et de l'environnement.

Au total, ce sont 57 QTL de résistance qui ont été détectés, 40 au stade plantules et 17 au stade plantes adultes au champ. Ces QTL sont répartis sur 20 des 21 chromosomes du blé hexaploïde (Figure 10). Trente-cinq de ces QTL co-localisent avec des régions génétiques connues pour être porteuses de gènes de résistances *Stb*. Le chevauchement entre les QTL de résistance et la position connue des gènes *Stb* a été étudiée en fonction du spectre de virulence de chaque isolat utilisé. Les QTL de résistance identifiés co-localisent avec les gènes de résistance majeur *Stb1*, *Stb3*, *Stb4* et *Stb11* mais les isolats utilisés pour la détection sont virulents sur ces gènes *Stb* correspondants, suggérant la présence d'un autre gène de résistance ou d'une version allélique du gène ayant un spectre de résistance différent. En revanche, les QTL qui co-localisent avec les gènes *Stb5*, *Stb6*, *Stb9*, *Stb10*, *Stb12*, *Stb13*, *Stb17* et *Stb18* ont été identifiés avec un

isolat avirulent, suggérant la présence de ces gènes dans certaines variétés françaises. L'ensemble de ces résultats donne un aperçu des principaux gènes de résistance *Stb* présents dans les variétés de blé françaises.

4 Discussion

Le projet DivR a permis de réaliser des avancées significatives dans notre connaissance du pathosystème blé tendre-septoriose, et tout particulièrement dans le déterminisme génétique et l'architecture génétique des interactions entre variétés de blé et isolats de *Z. tritici*.

Cinquante-sept QTL de résistance ont été identifiés dans une collection de 285 variétés principalement issues du catalogue officiel français, démontrant qu'un nombre remarquablement élevé de régions génomiques est impliqué dans la résistance à la septoriose. Ce nombre est d'autant plus remarquable qu'il existe très probablement de nombreuses autres régions qui n'ont pas été détectées, parce que le spectre de virulences des isolats utilisés ne le permettait pas, ou par manque de puissance statistique pour détecter des effets quantitatifs trop faibles ou des allèles de résistance trop peu fréquents dans notre panel. C'est notamment le cas des 21 variétés présentant une résistance large spectre au stade plantule (moins de 10% PLACP en moyenne, tous isolats confondus) et des 4 variétés présentant la résistance la plus efficace au stade plantes adultes au champ (tous isolats et essais confondus). Ces variétés représentent des sources de résistance précieuses pour améliorer la résistance du blé à la septoriose, mais les 57 QTL identifiés ne permettent pas d'expliquer le niveau de résistance dans ces variétés, probablement parce que les gènes de résistance sont en fréquence trop faible dans le panel. Une approche de cartographie QTL dans des populations biparentales issues de croisements avec ces variétés pourrait être envisagée afin d'identifier les gènes de résistance qu'elles portent. Brown *et al.* (2015) soulignaient déjà cette multiplicité des régions génomiques impliquées dans la résistance du blé à la septoriose ; une synthèse bibliographique des différentes études concernant ce sujet leur a permis de recenser 21 gènes de résistance dite 'qualitative' (*i.e.* gènes *Stb*) et surtout plus de 89 QTL de résistance dite 'quantitative'. Des résultats similaires ont été obtenus au cours d'analyses GWAS avec des panels de variétés provenant d'Europe (Yates *et al.*, 2018 ; Riaz *et al.*, 2020 ; Zakieh *et al.*, 2023), d'Afrique (Mekonnen *et al.*, 2021), du Moyen-Orient (Mahboubi *et al.*, 2022) ou d'Australie (Yang *et al.*, 2022). Parmi les 57 QTL identifiés, 10 QTL (4 plantules et 6 plantes adultes) se trouvent dans des régions du génome où aucune résistance à *Z. tritici* n'a été identifiée auparavant, indiquant que ces 10 QTL représentent de nouvelles cibles pour la sélection de variétés résistantes à la septoriose. D'autre part, l'intervalle de confiance de plusieurs des QTL identifiés chevauche la position de gènes de résistance *Stb* connus, et pourraient donc indiquer la présence de ces gènes *Stb* dans les variétés françaises. C'est notamment le cas de *Stb6*, *Stb9* et *Stb18* identifiés dans près de 50%, 17% et 7% des variétés du panel, respectivement. Les gènes *Stb5*, *Stb10*, *Stb11*, *Stb12* et *Stb13* semblent également être présents dans les variétés françaises. Inversement, des gènes précédemment identifiés dans les variétés françaises n'ont pas été détectés dans cette étude,

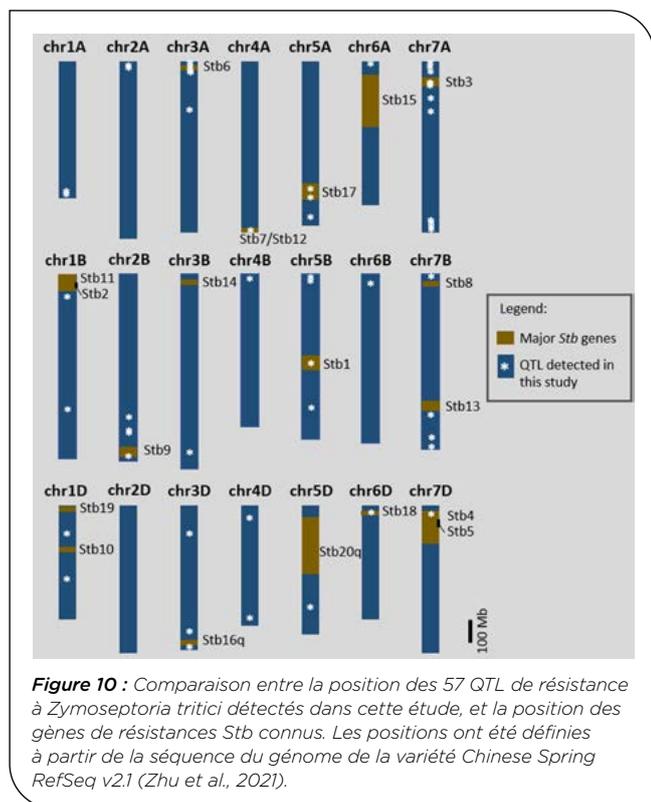


Figure 10 : Comparaison entre la position des 57 QTL de résistance à *Zymoseptoria tritici* détectés dans cette étude, et la position des gènes de résistances *Stb* connus. Les positions ont été définies à partir de la séquence du génome de la variété Chinese Spring RefSeq v2.1 (Zhu *et al.*, 2021).

notamment *Stb15* (Arraiano & Brown, 2006), *Stb16q* (Saintenac *et al.*, 2021) et *Stb20q* (Langlands-Perry *et al.*, 2022). Ces résultats suggèrent qu'au moins 11 des 23 gènes *Stb* connus pourraient être présents dans les variétés de blé tendre françaises, mais à des fréquences variables d'un gène à l'autre.

Une des caractéristiques les plus frappantes des QTL de résistance identifiés est leur spécificité vis-à-vis des isolats de *Z. tritici* utilisés. Le panel de variétés a été phénotypé avec dix isolats, et seulement 7 des 57 QTL ont été détectés avec plusieurs de ces isolats. Il est également intéressant de remarquer que presque chaque nouvel isolat utilisé a permis de détecter de nouvelles régions génomiques impliquées dans la résistance ; les isolats ne l'ayant pas permis n'ont en fait permis de détecter aucun QTL (*i.e.* INRA09-FS0732 et INRA09-FS0813). Au vu de l'importance de la reproduction sexuée et de la diversité génétique dans les populations de *Z. tritici* (Kema *et al.*, 2018 ; Feurtey *et al.*, 2023), le nombre d'isolats génétiquement différents est virtuellement illimité et nous pourrions imaginer poursuivre indéfiniment ces études GWAS avec de nouveaux isolats et détecter de nouveaux QTL de résistance. Nous avons aussi caractérisé le spectre de virulence de 40 souches de *Z. tritici* sur les variétés de blé porteuses des gènes de résistance *Stb1* à *Stb16q*, et nous avons observé 33 spectres de virulence différents parmi ces 40 souches. Il est probable que la caractérisation de ces souches sur un nombre encore plus grand de sources de résistance aurait abouti à l'identification d'un nombre encore plus grand de spectres de virulence, et que nous pourrions indéfiniment caractériser de nouvelles souches pour identifier de nouveaux spectres de virulence. Nous avons également observé qu'il existait pour chacun des gènes de résistance testé, qu'il ait été identifié dans les variétés de blé françaises ou pas, des souches virulentes dans les populations françaises de *Z. tritici*. La complexité des interactions entre le blé et *Z. tritici*, du fait du nombre très important de facteurs de résistance dans le blé et de l'importante spécialisation aux variétés des isolats de *Z. tritici*, rend inconcevable l'identification et la caractérisation de tous les facteurs génétiques impliqués dans ces interactions. Cette très forte spécificité entre variétés résistantes et isolats sous-entend aussi que de nombreux gènes de résistance sont impliqués dans des interactions gène-pour-gène avec des gènes d'avirulence de *Z. tritici*. Ces interactions gène-pour-gène ont été mises en évidence dans le pathosystème blé-*Z. tritici* depuis le début des années 2000 (Kema *et al.*, 2000 ; Brading *et al.*, 2002), mais l'identification des premiers gènes *Stb* impliqués dans la résistance et gènes *AvrStb* reconnus par ces gènes de résistance est plus récente. Cela concerne notamment *Stb6* et *AvrStb6* (Zhong *et al.*, 2017 ; Saintenac *et al.*, 2018), *AvrStb9* (Amezrou *et al.*, 2023), *Stb15* (Hafeez *et al.*, 2023) et *Stb16q* (Saintenac *et al.*, 2021). Une particularité de ces interactions gène-pour-gène dans le pathosystème blé-*Z. tritici* est qu'elles peuvent concerner des résistances quantitatives, telles que cela a été montré pour *Avr3D1* (Meile *et al.*, 2018 & 2023) et *AvrStb20q* (Langlands-Perry *et al.*, 2023). Ces interactions gène-pour-gène pourraient donc concerner un très grand nombre des gènes ou QTL de résistance identifiés dans cette étude, faisant de l'identification des couples gène *Stb*-gène *AvrStb* un véritable défi dans ce pathosystème.

L'identification et la validation fonctionnelle des gènes impliqués dans l'interaction blé-*Z. tritici* est très importante afin de mieux comprendre ce pathosystème, de pouvoir introduire les gènes de résistance dans les variétés, et de pouvoir suivre l'efficacité des résistances ainsi que l'évolution des virulences correspondantes dans les populations de l'agent pathogène. Une meilleure connaissance des gènes d'avirulence de *Z. tritici* représente également un avantage certain pour détecter, caractériser et identifier les gènes de résistance dans le blé, notamment via des approches de sélection assistée par effecteurs (Vleeshouwers & Oliver, 2014). Le projet DivR a contribué à l'étude de trois gènes candidats précédemment identifiés au cours d'une étude GWAS pour être des facteurs du pouvoir pathogène de *Z. tritici* sur les variétés Cadenza (*Stb6*, *Stb9*, *Stb+*), Tadinia (*Stb6*, *Stb4*) et Arina (*Stb6*, *Stb15*) (Amezrou *et al.*, 2024). Seulement un de ces trois gènes, *Zt3_00467*, a pu être validé pour son rôle dans le pouvoir pathogène de *Z. tritici* sur la variété Arina. Ce gène pourrait correspondre au facteur d'avirulence *AvrStb15* ou à l'avirulence vis-à-vis d'un autre gène de résistance présent dans la variété Arina. Notre difficulté à confirmer cette interaction reflète la difficulté susmentionnée de faire correspondre les gènes *Stb* avec les gènes *AvrStb* identifiés. D'autre part, notre difficulté à confirmer le rôle des autres gènes candidats dans le pouvoir pathogène de *Z. tritici* sur les variétés Cadenza et Tadinia pourrait être dû au caractère quantitatif des interactions rendant l'effet de ces gènes compliqué à mettre en évidence. L'identification des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de *Z. tritici* permet également d'envisager le développement d'outils moléculaires de suivi des populations de l'agent pathogène. Nous avons développé un test de séquençage d'amplicons basé sur la microfluidique, combinant les avantages du séquençage à haut débit et de la PCR multiplexée (Bellah *et al.*, 2023). Nous avons évalué les performances de 798 *loci* pour génotyper de manière fiable et sensible des marqueurs sélectionnés au hasard à l'échelle du génome, ainsi que des gènes liés à la pathogénicité et à la résistance aux fongicides. L'ensemble des marqueurs à l'échelle du génome fournit un outil pour évaluer la structure génétique des populations de *Z. tritici* directement à partir de feuilles de blé collectées sur le terrain. Une grande partie des marqueurs conçus peut être amplifiée de manière cohérente à travers les échantillons, et donc utilisée pour surveiller l'émergence de mutations pertinentes et fournir une évaluation des fréquences alléliques dans les populations de *Z. tritici*. L'analyse des amplicons concernant les gènes *AvrStb6* et *AvrStb9* a démontré la capacité de notre approche à détecter différents variants associés à la virulence ou à l'avirulence de *Z. tritici*, et à étudier la fréquence de ces variants à l'échelle nationale.

Les résultats du projet DivR ont donc permis de réaliser des avancées significatives dans notre connaissance du pathosystème blé tendre-*Z. tritici*, mais il est important de poursuivre l'effort sur l'identification des gènes de résistance dans le blé et des gènes d'avirulence chez *Z. tritici*, d'améliorer l'identification des couples de gènes *Stb-AvrStb*, et d'implémenter ces connaissances dans le développement d'outils d'aide au développement de variétés durablement résistantes à la maladie et dans le suivi des populations de l'agent pathogène.

Références bibliographiques

- Amezrou R, Audéon C, et al.** (2023). A secreted protease-like protein in *Zymoseptoria tritici* is responsible for avirulence on Stb9 resistance gene in wheat. *PLoS Pathog.* 19(5): e1011376.
- Amezrou R, Ducasse A, et al.** (2024). Quantitative pathogenicity and host adaptation in a fungal plant pathogen revealed by whole-genome sequencing. *Nat. Comm.* 15(1): 1933.
- Arraiano LS, Brown JKM.** (2006). Identification of isolate-specific and partial resistance to septoria tritici blotch in 238 European wheat cultivars and breeding lines. *Plant Pathol.* 55(6):726-738.
- Arraiano LS, Chartrain L, et al.** (2007). A gene in European wheat cultivars for resistance to an African isolate of *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Pathol.* 56(1): 73-78.
- Bellah H, Gazeau G, et al.** (2023). A highly multiplexed assay to monitor pathogenicity, fungicide resistance and gene flow in the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *PLoS ONE* 18(2): e0281181.
- Brading PA, Verstappen ECP, et al.** (2002). A gene-for-gene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the *Septoria tritici* blotch pathogen. *Phytopathology* 92(4): 439-445.
- Brown JKM, Chartrain L, et al.** (2015). Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genetics and Biology* 79:33-41.
- Chartrain L, Sourdille P, et al.** (2009). Identification and location of Stb9, a gene for resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat cultivars Courtot and Tonic. *Plant. Pathol.* 58:547-555.
- Cohen L, Eyal Z.** (1993). The histology of processes associated with the infection of resistant and susceptible wheat cultivars with *Septoria tritici*. *Plant Pathol.* 42(5):737-743
- Do Amaral AM, Antoniw J, et al.** (2012). Defining the predicted protein secretome of the fungal wheat leaf pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS ONE* 7(12): e49904.
- Furtey A, Lorrain C, et al.** (2023). A thousand-genome panel retraces the global spread and adaptation of a major fungal crop pathogen. *Nat. Comm.* 14(1): 1059.
- Fraaije B A, Cools HJ, et al.** (2007). A novel substitution I381V in the sterol 14 -demethylase (CYP51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. *Mol. Plant Pathol.* 8(3): 245-254.
- Garnault M, Duplaix C, et al.** (2019). Spatiotemporal dynamics of fungicide resistance in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in France. *Pest Manag. Sci.* 75(7): 1794-1807.
- Garnault M, Duplaix C, et al.** (2020). Large-scale study validates that regional fungicide applications are major determinants of resistance evolution in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in France. *New Phytol.* 229: 3508-3521.
- Ghaffary SMT, Robert O, et al.** (2011). Genetic analysis of resistance to septoria tritici blotch in the French winter wheat cultivars Balance and Apache. *Theor. Appl. Genet.* 123(5):741-754.
- Goodwin SB, Ben M'Barek S, et al.** (2011). Finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals dispensome structure, chromosome plasticity, and stealth pathogenesis. *PLoS Genet.* 7(6): e1002070.
- Hafeez AN, Chartrain L, et al.** (2023). *Septoria tritici* blotch resistance gene Stb15 encodes a lectin receptor-like kinase. *bioRxiv*: 2023.09.11.557217.
- Hartmann FE, Croll D.** (2017). Distinct Trajectories of massive recent gene gains and losses in populations of a microbial eukaryotic pathogen. *Mol. Biol. Evol.* 34:2808-2822.
- Huang M, Liu X, et al.** (2018). BLINK: a package for the next level of genome-wide association studies with both individuals and markers in the millions. *GigaScience* 8(2).
- Karasov TL, Horton MW, Bergelson J.** (2014). Genomic variability as a driver of plant-pathogen coevolution? *Curr. Opin. Plant Biol.* 18:24-30.
- Kema GHJ, Gohari AM, et al.** (2018). Stress and sexual reproduction affect the dynamics of the wheat pathogen effector AvrStb6 and strobilurin resistance. *Nat. Genet.* 50(3): 375-380.
- Kildea S, Byrne JJ, et al.** (2020). First report of virulence to the septoria tritici blotch resistance gene Stb16q in the Irish *Zymoseptoria tritici* population. *New Dis. Rep.* 41(1): 13-13.
- Langlands-Perry C, Cuenin M, et al.** (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).
- Langlands-Perry C, Pitarch A, et al.** (2023). Quantitative and qualitative plant-pathogen interactions call upon similar pathogenicity genes with a spectrum of effects. *Front. Plant Sci.* 14.
- Mahboubi M, Talebi R, et al.** (2022). Genetic analysis of novel resistance sources and genome-wide association mapping identified novel QTLs for resistance to *Zymoseptoria tritici*, the causal agent of septoria tritici blotch in wheat. *J. Appl. Genet.* 63: 429-445.
- Mangin B, Siberchicot A, et al.** (2012). Novel measures of linkage disequilibrium that correct the bias due to population structure and relatedness. *Heredity* 108(3): 285-291.
- McDonald MC, McDonald BA, Solomon PS.** (2015). Recent advances in the *Zymoseptoria tritici*-wheat interaction: insights from pathogenomics. *Front. Plant Sci.* 6(102).
- Meile L, Croll D., et al.** (2018). A fungal avirulence factor encoded in a highly plastic genomic region triggers partial resistance to septoria tritici blotch. *New Phytol.* 219(3): 1048-1061.
- Meile L., Garrido-Arandia M, et al.** (2023). Natural variation in Avr3D1 from *Zymoseptoria* sp. contributes to quantitative gene-for-gene resistance and to host specificity. *New Phytol.* 238(4): 1562-1577.
- Mekonnen T, Sneller CH, et al.** (2021). Genome-wide association study reveals novel genetic loci for quantitative resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front. Plant Sci.* 12.
- Omrane S, Audéon C, et al.** (2017). Plasticity of the MFS1 promoter leads to multidrug resistance in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *mSphere* 2(5): e00393-17.
- Omrane S, Sghyer H, et al.** (2015). Fungicide efflux and the MgMFS1 transporter contribute to the multidrug resistance phenotype in *Zymoseptoria tritici* field isolates. *Environ. Microbiol.* 17(8): 2805-2823.

- Palma-Guerrero J, Torriani SFF, et al.** (2015). Comparative transcriptome analyses of *Zymoseptoria tritici* strains show complex lifestyle transitions and intra-specific variability in transcription profiles. *Mol. Plant Pathol.* 17(6):845-859.
- Palmer C-L, Skinner W.** (2002). *Mycosphaerella graminicola*: latent infection, crop devastation and genomics. *Mol. Plant Pathol.* 3(2):63-70.
- Paux E, Lafarge S, et al.** (2022). Breeding for economically and environmentally sustainable wheat varieties: an integrated approach from genomics to selection. *Biology* 11(1): 149.
- R Core Team.** R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, (2021).
- Riaz A, KockAppelgren P, et al.** (2020). Genetic analysis using a multi-parent wheat population identifies novel sources of *Septoria tritici* blotch resistance. *Genes* 11(8).
- Rimbert H, Darrier B, et al.** (2018). High throughput SNP discovery and genotyping in hexaploid wheat. *PLoS ONE* 13(1): e0186329.
- Rosyara UR, De Jong WS, et al.** (2016). Software for genome-wide association studies in autopolyploids and its application to potato. *Plant Genome* 9(2).
- Rudd J, Kanyuka K, et al.** (2015). Transcriptome and metabolite profiling the infection cycle of *Zymoseptoria tritici* on wheat (*Triticum aestivum*) reveals a biphasic interaction with plant immunity involving differential pathogen chromosomal contributions, and a variation on the hemibiotrophic lifestyle definition. *Plant Physiol.* 167(3):1158-85.
- Saintenac C, Cambon F, et al.** (2021). A wheat cysteine-rich receptor-like kinase confers broad-spectrum resistance against *Septoria tritici* blotch. *Nat. Comm.* 12(1): 433.
- Saintenac C, Lee W-S, et al.** (2018). Wheat receptor-kinase-like protein *Stb6* controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Nature Genetics* 50(3): 368-374.
- Sánchez-Vallet A, McDonald MC, et al.** (2015). Is *Zymoseptoria tritici* a hemibiotroph? *Fungal Genetics and Biology* 79(0): 29-32.
- Selin C, de Kievit TR, et al.** (2016). Elucidating the role of effectors in plant-fungal interactions: Progress and Challenges. *Front. Microbiol.* 7.
- Steinhauer D, Salat M, et al.** (2019). A dispensable paralog of succinate dehydrogenase subunit C mediates standing resistance towards a subclass of SDHI fungicides in *Zymoseptoria tritici*. *PLoS Pathog.* 15(12): e1007780.
- Suffert F, Delestre G, et al.** (2016). Fashionably late partners have more fruitful encounters: Impact of the timing of co-infection and pathogenicity on sexual reproduction in *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genetics and Biology* 92:40-49.
- Suffert F, Delestre G, Gélisse S.** (2019). Sexual reproduction in the fungal foliar pathogen *Zymoseptoria tritici* is driven by antagonistic density dependence mechanisms. *Microb. Ecol.* 77: 110-123.
- Suffert F, Sache I.** (2011). Relative importance of different types of inoculum to the establishment of *Mycosphaerella graminicola* in wheat crops in north-west Europe. *Plant Pathol.* 60(5):878-889.
- Torriani SFF, Brunner PC, et al.** (2009). QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manag. Sci.* 65(2): 155-162.
- Vleeshouwers VGAA, Oliver RP.** (2014). Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27(3): 196-206.
- Waalwijk C, Mendes O, et al.** (2002). Isolation and characterization of the mating-type idiomorphs from the wheat *septoria* leaf blotch fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology* 35(3):277-286.
- Wang J, Zhang Z.** (2021). GAPIT version 3: boosting power and accuracy for genomic association and prediction. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 19: 629-640.
- Yang N, McDonald MC, et al.** (2018). Genetic mapping of *Stb19*, a new resistance gene to *Zymoseptoria tritici* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 131: 2765-2773.
- Yang N, Ovenden B, et al.** (2022). Multi-stage resistance to *Zymoseptoria tritici* revealed by GWAS in an Australian bread wheat diversity panel. *Front. Plant Sci.* 13.
- Yates S, Mikaberidze A, et al.** (2022). Precision phenotyping reveals novel loci for quantitative resistance to *Septoria tritici* blotch. *Plant Phenomics* 2019: 3285904
- Zakieh M, Alemu A, et al.** (2023). Exploring GWAS and genomic prediction to improve *Septoria tritici* blotch resistance in wheat. *Sci. Rep.* 13(1): 15651.
- Zhan J, Stefanato FL, McDonald, BA.** (2006). Selection for increased cyproconazole tolerance in *Mycosphaerella graminicola* through local adaptation and in response to host resistance. *Mol. Plant Pathol.* 7(4): 259-268.
- Zhang Z, Ersoz E, et al.** (2010). Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 42: 355-360.
- Zhu T, Wang L, et al.** (2021). Optical maps refine the bread wheat *Triticum aestivum* cv Chinese Spring genome assembly. *The Plant Journal* 107(1): 303-314.
- Zhong Z, Marcel TC, et al.** (2017). A small secreted protein in *Zymoseptoria tritici* is responsible for avirulence on wheat cultivars carrying the *Stb6* resistance gene. *New Phytol.* 214(2): 619-631.
- Zwiers L-H, de Waard MA.** (2001). Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene disruption in the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Curr. Genet.* 39: 388-393.

DivR : Des outils moléculaires pour la sélection de résistances diversifiées et efficaces contre la septoriose du blé

Thierry C. MARCEL^{1*}, Gwilherm GAZEAU¹, Hadjer BELLAH², Jean-Noël THAUVIN³, Sandrine GELISSE¹, Emmie DZIALO¹, Adeline SIMON¹, Reda AMEZROU¹, Ellen GOUEMAND⁴, Benoit FOUCAULT⁵, Nicholas BIRD⁶, Gemma MOLERO MILAN⁵, Sébastien CAIVEAU⁷, Alexander LOLADZE⁷, Andrea SÁNCHEZ-VALLET⁸, Daniel CROLL², Cyrille SAINTENAC³

1 - Univ Paris-Saclay, INRAE, UR BIOGER, Palaiseau, FR
 2 - Univ Neuchâtel, Lab Evol Genet, Neuchâtel, CH
 3 - UCA, INRAE, GDEC, Clermont-Ferrand, FR
 4 - Florimond-Desprez V&F SAS, Cappelle-en-Pévèle, FR
 5 - KWS, Momont Recherche, Mons-en-Pévèle, FR

6 - KWS UK Ltd, Thriplow, Hertfordshire, UK
 7 - Syngenta France SAS, Chartres, FR
 8 - CBGP, UPM-INIA, Campus de Montgancedo UPM, Madrid, ES
 *Coordinateur : thierry.marcel@inrae.fr

La septoriose, causée par le champignon *Zymoseptoria tritici*, est une maladie très nuisible affectant la culture du blé. La sélection de nouvelles variétés résistantes à la septoriose est ralentie par notre méconnaissance des gènes de résistance présents dans nos variétés ainsi que par la complexité à surveiller l'évolution de l'efficacité de ces gènes vis-à-vis des populations de *Z. tritici* génétiquement très diversifiées. Le projet FSOV 2018 S DivR avait pour objectifs le développement d'outils de marquage moléculaire des gènes de résistance présents dans les variétés et de suivi des populations fongiques.

Efficacité des gènes de résistance *Stb*

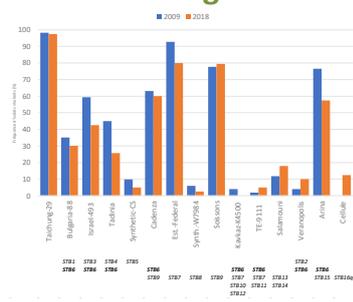


Figure 1. Fréquence de virulence d'isolats Français de *Z. tritici* collectés en 2009 (n=103) et en 2018 (n=40) sur des variétés de blé portant les gènes *Stb1* à *Stb16q*

- La fréquence d'isolats virulents est très variable d'une variété à une autre mais a globalement peu évolué entre 2009 et 2018.
- Des isolats virulents ont été identifiés sur toutes les variétés mais les gènes de résistance *Stb2*, *Stb5*, *Stb8*, *Stb11*, *Stb10* et *Stb12* restent les plus efficaces.

Identification des gènes *AvrStb* chez *Z. tritici*

Une étude GWAS a permis d'identifier 65 gènes candidats pour leur implication dans le pouvoir pathogène de *Z. tritici* sur 15 variétés de blé tendre différentielles pour les gènes de résistance *Stb* qu'elles portent.²

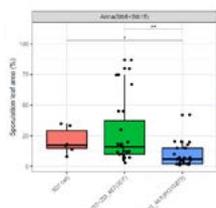


Figure 3. Pourcentage de surface foliaire sporulante sur la variété Arina après inoculation avec la souche ST99CH_3D7 (n=6), les mutants ectopiques portant l'allèle 3D7 (virulent) du gène *Zt3_00467* (n=27) et les mutants ectopiques portant l'allèle IPO10273 (avirulent) (n=27).

- Zt3_0467* encode une petite protéine sécrétée jouant un rôle dans le pouvoir pathogène de *Z. tritici* sur la variété Arina (*Stb6*, *Stb15*).

Articles en lien avec le projet:

¹Thauvin *et al.* En préparation; ²Amezrou *et al.* (2024). *Nat. Comm.* 15(1): 1933; ³Bellah *et al.* (2023). *PLoS ONE* 18(2): e0281181;

Identification des gènes *Stb* dans les variétés françaises

Une étude d'association à l'échelle du génome (GWAS) a été réalisée sur un panel de 285 variétés inoculé avec 10 isolats sur plantules en conditions contrôlées et 2 isolats sur plantes adultes au champ.¹

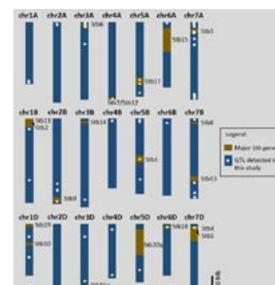


Figure 2. Comparaison entre la position des 57 QTL de résistance, dont 10 nouveaux QTL détectés.

- 57 régions génomiques impliquées dans la résistance, dont 10 nouveaux QTL détectés.
- Les QTL détectés sont fortement dépendants de l'isolat utilisé, du stade de développement du blé, et de l'environnement.

Suivi des populations de *Z. tritici* en France

Nous avons développé un test de séquençage d'amplicons, combinant séquençage à haut débit et PCR multiplexée³, ciblant des SNP associés à des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène (65), la résistance aux fongicides (25), ou répartis aléatoirement le long du génome (691).

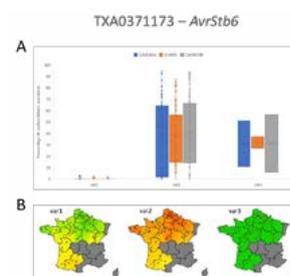


Figure 4. A) Association entre 3 variants identifiés pour l'amplicon TXA0371173 et la virulence sur des variétés portant *Stb6*, et B) répartition géographique des 3 variants.

- Capacité de suivre les fréquences alléliques dans les populations de *Z. tritici*.

FSOV 2018 S



9^{ème} RENCONTRE SCIENTIFIQUE



Fonds de soutien à l'Obtention Végétale

Synthèse des programmes de recherche 2018

Retrouvez l'ensemble des informations
sur les programmes de recherche sur le site :

www.fsov.org



semae

Toutes les semences pour demain



Section Semences de Céréales à paille & Protéagineux

44 rue du Louvre - 75001 Paris

Tél. : 01 42 33 85 05 - E-mail : fsov@gnis.fr

www.fsov.org

ISBN : 978-2-36397-152-4



9 782363 971524

Avril 2024 - D1451