



# Synthèse des programmes de recherche 2016

Mardi 17 Mai 2022

FsoV

## Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale



Depuis sa création en 2001 jusqu'à aujourd'hui, plus d'une centaine de programmes de recherche ont déjà été soutenus par le Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale (FSOV), et pour toutes les céréales paille, que ce soit 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.

Ces programmes contribuent au développement d'innovations et à la création de nouvelles variétés performantes, économes en intrants, adaptées à leur environnement et conduisant à une production de haute qualité technologique, conformément aux attentes de notre filière, du marché et de notre société.

Dans ce recueil, vous pourrez étudier les résultats des programmes retenus lors de l'appel à projets de 2016, et constater par vous-même l'impact de ces travaux pour le développement à court terme de nouveaux outils technologiques, moléculaires ou méthodologiques performants et innovants.

Il me semble également important de rappeler que dans un contexte politique et réglementaire de plus en plus contraignant, et à l'heure où la souveraineté alimentaire ressurgit dans les consciences, l'innovation variétale doit tenir un rôle central, fort et fédérateur au sein de notre filière. Et c'est d'ailleurs sur cette base de l'accord relatif au financement de la recherche dans le domaine des céréales à paille a été renouvelé en mars dernier. Le FSOV symbolise ainsi la volonté et l'engagement de notre filière à promouvoir ce progrès génétique.

Cela fait donc maintenant plus de 20 ans que le FSOV accompagne le progrès variétal pour les agriculteurs, et avec le prochain appel à projets du FSOV 2023, l'aventure va se poursuivre encore un peu...

**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](mailto:fsov@semae.fr)

[www.fsov.org](http://www.fsov.org)



# SOMMAIRE

<b>FSOV 2016 W :</b> MaBrune : Marqueurs diagnostiques des résistances à la rouille brune dans le blé tendre .....	4
<b>FSOV 2016 N :</b> GIEC : sélection assistée par marqueurs et modèles du stade épi à 1 cm pour des blés tendres adaptés au changement climatique .....	13
<b>FSOV 2016 Z :</b> GPDUR : Génétique et Phénotypage du blé dur pour l'amélioration conjointe du rendement et de la teneur en protéines .....	24
<b>FSOV 2016 L :</b> PROSYN : Apport des blés synthétiques à l'amélioration conjointe de la productivité, de la teneur en protéines et l'efficacité d'utilisation de l'azote .....	34
<b>FSOV 2016 A :</b> RenKSeq : Développement d'un outil (RenKSeq) innovant de criblage de gènes à haut débit pour identifier rapidement de nouveaux gènes de résistance à la septoriose.....	41
<b>FSOV 2016 D :</b> PadiJNO : Identification de nouvelles résistances à la jaunisse nanisante et à son vecteur, Rhopalosiphum padi, chez le blé.....	49
<b>FSOV 2016 R :</b> TakeNOTail : Caractérisation de la résistance variétale des céréales à paille au Piétin-Échaudage et prédiction du risque.....	58
<b>FSOV 2016 C :</b> MOSAIC : Développement d'outils phénotypique et génotypique pour améliorer la sélection de la résistance du blé dur à deux virus des mosaïques du blé .....	71
<b>FSOV 2016 K :</b> ArchiRac : Analyse de la diversité d'architecture racinaire chez le blé tendre et le blé dur en lien avec la tolérance au stress hydrique.....	82
<b>FSOV 2016 T :</b> Genomalt : Prédiction génomique du rendement et de la qualité brassicole chez l'orge d'hiver à 6 rangs.....	98
<b>FSOV 2016 Y :</b> GlutNsafe : « Vers la sélection de variétés de blés au gluten plus digestible ? ».....	109
<b>FSOV 2016 U :</b> JNOрге : De nouvelles résistances/tolérances contre la jaunisse nanisante chez l'orge : caractérisation et impacts épidémiologiques.....	120
<b>FSOV 2016 F :</b> Rouille BDT : Recherche de résistances durables à la rouille jaune chez le blé dur et le triticales.....	132

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

Thierry C MARCEL<sup>1</sup>, Roula SHAMSI<sup>1</sup>, Sabine CADOUX<sup>1,2</sup>, Faharidine MOHAMADI<sup>3</sup>, Pierre SOURDILLE<sup>4</sup>, Rémi PERRONNE<sup>5</sup>, Bernard ROLLAND<sup>5</sup>, Philippe DU CHEYRON<sup>6</sup>, GIE RGC<sup>7</sup>, CETAC<sup>2</sup>, Anne-Lise BOIXEL<sup>1</sup>, Henriette GOYEAU<sup>1\*</sup>

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

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

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

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

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

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

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

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

## 1 Introduction

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

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

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

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

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

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

## 2 Matériel et méthode

### ► Suivi annuel des populations de *P. tritricina*

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

### ► Identification de marqueurs diagnostiques des gènes *Lr*

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

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

### ► Cartographie de précision des QTL de résistance

Cinq QTL de résistance à *P. tritricina* ont été choisis parmi ceux identifiés précédemment pour l'amplitude de leur effet (c.à.d. le pourcentage de variabilité expliquée R<sup>2</sup>) et la robustesse de leur effet à travers différents environnements (Tableau 3). Quatre de ces QTL proviennent des populations LD0017003/Ecrin, Tremie/Ecrin et Sideral/Ecrin qui ont été génotypées sur la puce Illumina Infinium iSelect 90K (Wang *et al.*, 2014) ; Ecrin étant le parent sensible. Le cinquième QTL est porté par la variété Renan et a été identifié dans la population Renan/Chinese-Spring, génotypée avec la puce Affymetrix Axiom 410K (Kitt *et al.*, 2021 ; Danguy des Déserts *et al.*, 2021 ; Paux *et al.*, 2022). Afin de construire une carte génétique pouvant servir de pont entre les marqueurs présents sur ces deux puces de génotypage, 159 individus de la population Renan/Chinese-Spring ont également été génotypés sur la puce Illumina Infinium iSelect 90K par TraitGenetics GmbH (Gatersleben, Germany). La nouvelle carte génétique de Renan/Chinese-Spring, combinant les marqueurs des deux puces, a été construite à l'aide du logiciel MultiPoint (Ronin *et al.*, 2017) et a été décrite par Langlands-Perry *et al.* (2022). Pour chacun des 5 QTL choisis, un individu de la population d'origine a été sélectionné qui porte l'allèle de résistance du QTL ciblé et les allèles de sensibilité des autres QTL détectés dans cette même population (Tableau 3) ; Rptq-1B a été identifié dans 5 populations différentes mais c'est



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

### 3 Résultats

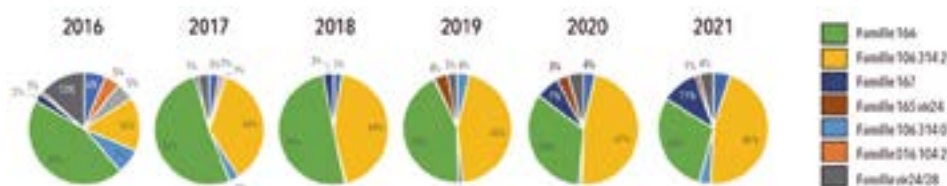
#### ► Suivi annuel des populations de *P. tritricina*

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

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

#### ► Identification de marqueurs diagnostiques des gènes *Lr*

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



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

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

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

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

<sup>1</sup> R : résistant, I : intermédiaire, S : sensible ;

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

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

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

<sup>1</sup> Allèle résistant au SNP ;

<sup>2</sup> Allèle sensible au SNP ;

<sup>3</sup> Valeur diagnostique du SNP ;

<sup>4</sup> Pourcentage de faux négatifs ;

<sup>5</sup> Pourcentage de faux positifs ;

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

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

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

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

<sup>1</sup> Pourcentage de la variabilité phénotypique expliquée par le QTL lors de l'analyse de la population biparentale avant cartographie fine (le R<sup>2</sup> varie selon le trait phénotypique considéré) ;

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

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

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

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

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

### ► Cartographie de précision des QTL de résistance

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

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

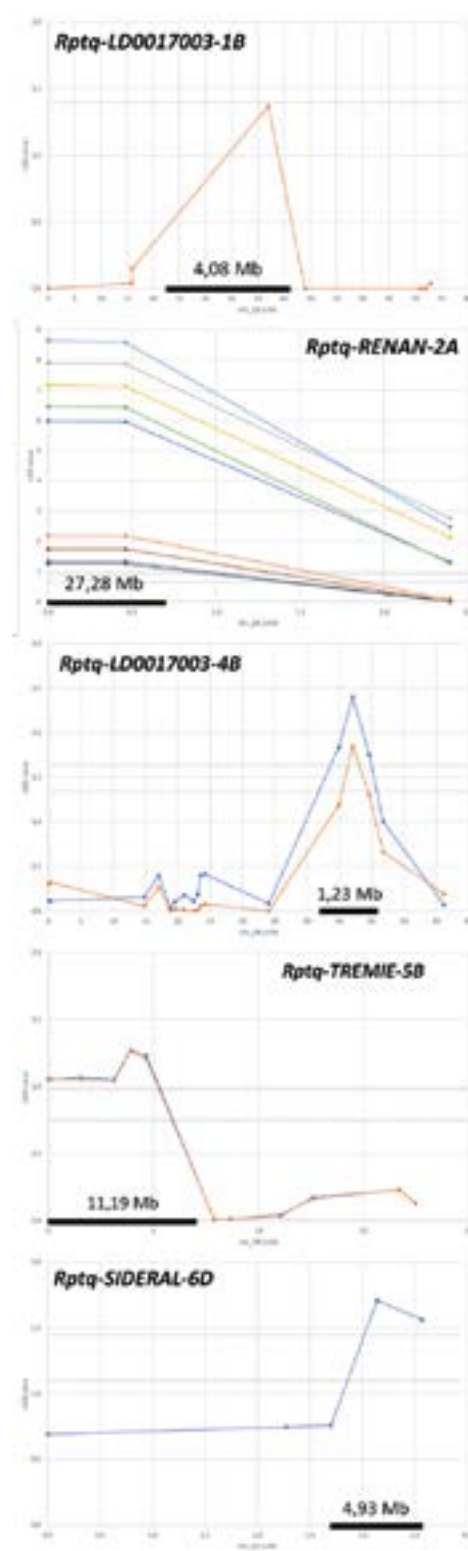
Tous les individus recombinants fixés ont également été évalués en plein champ en 2021, après inoculation avec l'isolat BT06M140. Chaque population recombinante - par QTL - a été évaluée sur 3 sites répartis entre le nord, le centre/ouest et le sud de la France. Des effets significatifs du lieu de phénotypage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

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

## 4 Discussion

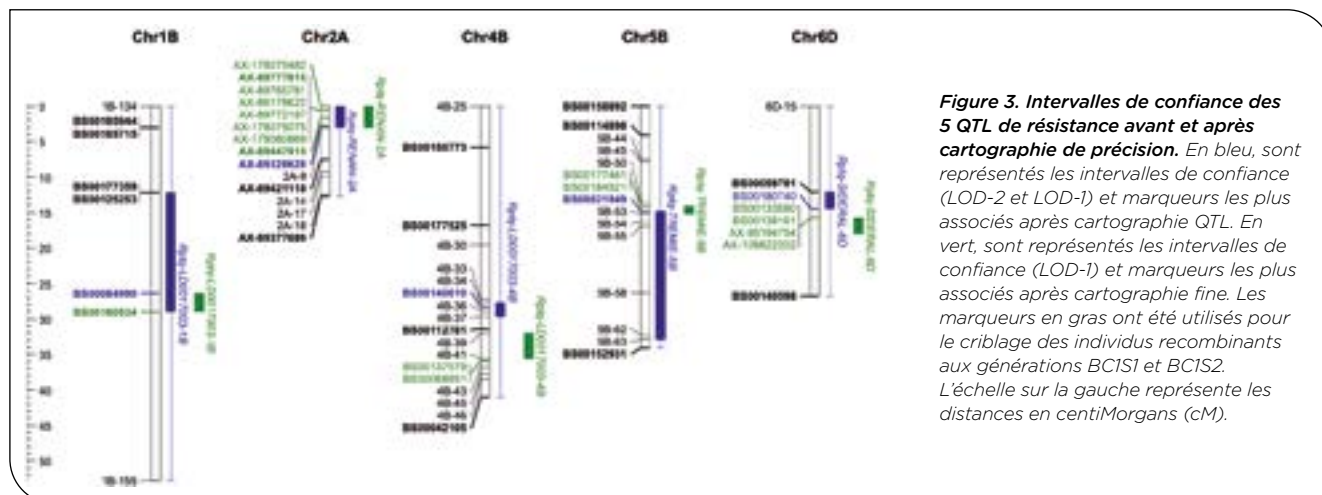
La sélection de variétés résistantes aux maladies est un levier important de la protection des cultures, notamment afin de réduire l'utilisation de produits phytosanitaires. Toutefois, les populations des agents pathogènes peuvent s'adapter aux résistances génétiques qui perdent alors leur efficacité.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

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



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





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

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

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

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

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

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

## Références bibliographiques

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

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



Thierry C MARCEL<sup>1</sup>, Roula SHAMSI<sup>1</sup>, Sabine CADOUX<sup>1,2</sup>, Faharidine MOHAMADI<sup>3</sup>, Pierre SOURDILLE<sup>4</sup>, Rémi PERRONNE<sup>5</sup>, Bernard ROLLAND<sup>5</sup>, Philippe DU CHEYRON<sup>6</sup>, GIE RGC<sup>7</sup>, CETAC<sup>2</sup>, Anne-Lise BOIXEL<sup>1</sup>, Henriette GOYEAU<sup>1\*</sup>

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

**Le champignon basidiomycète *Puccinia triticina* Erikss est responsable de la rouille brune sur le blé tendre, le blé dur et le triticale. L'objectif du projet MaBrune est d'identifier des marqueurs moléculaires diagnostiques de la présence de gènes *Lr* et de QTL de résistance à cette maladie. A ce jour, 80 gènes *Lr* ont été identifiés dans le blé, dont la plupart sont impliqués dans des interactions gène-pour-gène avec les isolats de rouille brune; mais seulement certains de ces gènes *Lr* ont été postulés dans les variétés de blé tendre françaises. Dans un projet FSOV précédent, 15 QTL de résistance ont été identifiés pour expliquer la résistance partielle de 6 variétés de blé tendre (Apache, Tremie, Sideral, LD0017003, PBO4006, Renan; Figure 1).**



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

## « Bulk Segregant Analysis » de 8 gènes *Lr*

Nous avons croisé 8 lignées quasi-isogéniques, portant les gènes de résistance *Lr1*, *Lr3*, *Lr9*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr24*, *Lr28* et *Lr37*, avec la variété récurrente sensible Thatcher. Pour chaque gène, 30 BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> sensibles et 30 BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> résistantes ont été génotypés en « bulk » sur une puce Affymetrix Axiom 410K.

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

**Tableau 1.** Marqueurs diagnostiques pour 5 gènes *Lr*

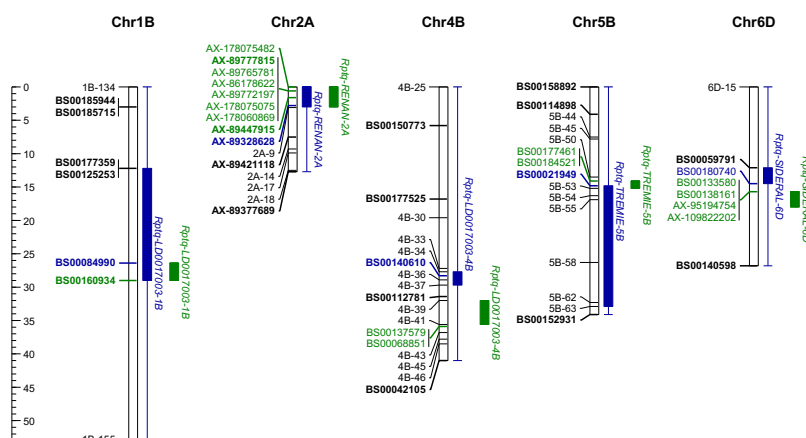
Gène	Chr.	Probe	VD <sup>1</sup>	FN <sup>2</sup>	FP <sup>3</sup>
<i>Lr1</i>	5DL	AX-89495847	99.2 %	5.9 %	5.9 %
		AX-89713092	99.5 %	0 %	5.9 %
<i>Lr3a</i>	6BL	AX-89705828	99.7 %	0 %	3.1 %
		AX-89542260	99.7 %	0 %	3.0 %
		AX-89454213	99.7 %	0 %	2.9 %
<i>Lr9</i>	6BL	AX-89672751	100 %	0 %	0.0 %
		AX-89563490	100 %	0 %	0.0 %
<i>Lr24</i>	3DL	AX-89471973	99.3 %	0 %	8.3 %
		AX-89505010	98.1 %	0 %	26.6 %
<i>Lr28</i>	4AL	AX-89351673	100 %	0 %	0.0 %

<sup>1</sup> Valeur diagnostique du SNP ; <sup>2</sup> Pourcentage de faux négatifs ;

<sup>3</sup> Pourcentage de faux positifs.

## Cartographie fine de 5 QTL de résistance

Nous avons croisé des descendants ne portant l'allèle résistant que pour le QTL ciblé avec le parent sensible (ECRIN ou CHINESE SPRING; Figure 1). Le développement de marqueurs KASP encadrant les QTL a permis d'identifier des individus recombinants (entre 64 et 145 par QTL) que nous avons fixé en BC<sub>1</sub>S<sub>2</sub>. Ces individus recombinants fixés ont été phénotypés au champ et génotypés par une approche de SNP-seq.



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

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

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

FSOV 2016 W

# GIEC : sélection assistée par marqueurs et modèles du stade épi à 1 cm pour des blés tendres adaptés au changement climatique

Matthieu BOGARD<sup>1\*</sup>, Alison BENTLEY<sup>2</sup>, Jacques LE GOUIS<sup>3</sup>, Jérôme AUZANEAU<sup>4</sup>, Simon GRIFFITHS<sup>5</sup>, Jérôme ENJALBERT<sup>6</sup>, Pascal GIRAudeau<sup>7</sup>, Patrice SENELLART<sup>8</sup>, Céline ZIMMERLI<sup>9</sup>, Céline DUQUE<sup>10</sup>, Philippe LEREBOUR<sup>11</sup>, Sébastien CAIVEAU<sup>12</sup>, Ellen GOUEDEMAND<sup>13</sup>

1 - Arvalis Institut du Végétal, 6 chemin de la côte vieille, 31450 Baziège, France

2 - NIAB, Farm Office, Whitehouse Lane, Cambridge, CB3 0LF, United-Kingdom

3 - INRAE, UMR GDEC, 5 chemin de Beaulieu, 63000 Clermont-Ferrand, France

4 - Agri-Obtentions, chemin de la Petite Minière, 78280 Guyancourt, France

5 - John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich, NR4 7UH, United-Kingdom

6 - INRAE, UMR GQE, 12 route 128, 91190 Gif-sur-Yvette, France

7 - Secobra recherche, Le Bois Henry, 78580 Maule, France

8 - KWS-Momont, 7 rue de Martinval, 59246 Mons-en-Pévèle, France

9 - BASF, 21 chemin de la Sauvegarde, 69130 Écully, France

10 - Limagrain, Ferme de l'Étang, 77390 Verneuil-l'Étang, France

11 - Unisigma, 2 Rue du Petit Sorri, 60480 Froissy, France

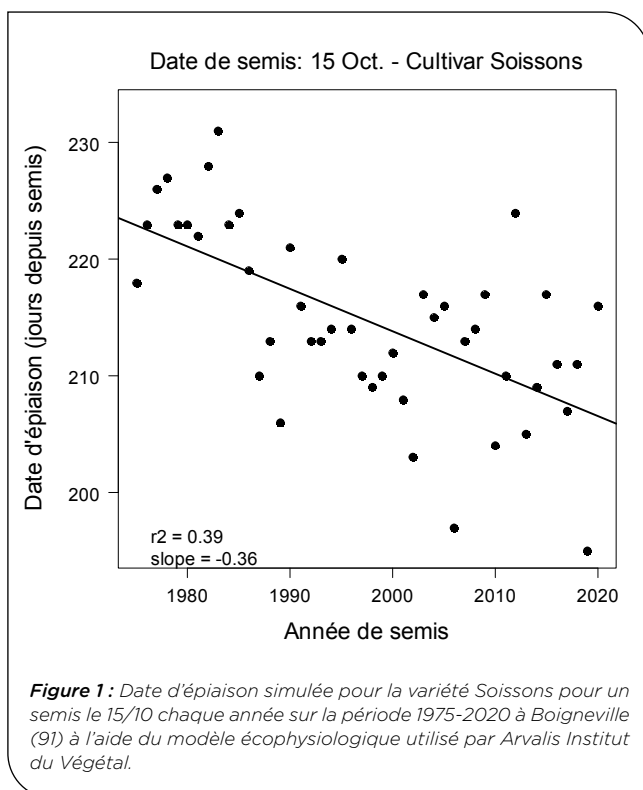
12 - Syngenta France S.A.S., 2 avenue Gustave Eiffel, CS 40346, 28 008 Chartres Cedex

13 - Florimond-Deprez, 3 rue Florimond Desprez, 59242 Cappelle-en-Pévèle, France

\*Coordinateur : Matthieu BOGARD, m.bogard@arvalis.fr

## 1 Introduction

Il a été démontré que les changements climatiques ont un impact sur les productions agricoles et celle des céréales en particulier (Brisson *et al.*, 2010). L'augmentation des températures moyennes du fait des changements climatiques induit notamment une accélération de la croissance et du développement des plantes et l'on estime que la date d'épiaison du blé tendre a été avancée de 15 jours sur la période 1975-2020 (Figure 1).



Cette accélération de la vitesse de développement induit un raccourcissement du cycle de culture et une diminution de la durée d'interception du rayonnement ce qui est susceptible d'affecter le potentiel de rendement. Par ailleurs, du fait des changements climatiques et de l'augmentation des températures moyennes, il est attendu une augmentation de la fréquence et de l'intensité d'événements « extrêmes », en particulier des épisodes de gel d'épis du fait de l'accélération du développement, d'épisodes caniculaires responsables de phénomènes d'échaudage des grains et d'épisodes de sécheresse estivales qui ont un impact négatif sur la productivité des blés (Trnka *et al.*, 2014).

Pour s'adapter à ces changements, les agriculteurs peuvent faire appel à deux leviers principaux : la modification de leurs pratiques agronomiques avec, par exemple, une modulation des dates de semis ou bien l'utilisation de variétés qui présentent une durée de cycle adaptée et/ou des facteurs génétiques de tolérance aux stress abiotiques. Une étude menée par ARVALIS Institut du végétal montre que l'avancement du stade épi à 1cm de 10 à 11 jours et l'avancement du stade épiaison de 5 à 6 jours permettraient de contrecarrer en partie l'occurrence accrue des épisodes de canicule (Gouache *et al.*, 2012). Or, les hivers étant prédits plus doux à l'avenir, ces changements offrent l'opportunité d'avancer la date du stade épi à 1 cm sans augmenter les risques de gel, ce qui pourrait permettre de compenser l'effet de l'avancement du stade épiaison sur la durée de montaison. Cela semble envisageable du fait que le déterminisme génétique des stades « épi à 1 cm » et épiaison est partiellement indépendant.

Si la nécessité d'utiliser à l'avenir des variétés plus précoces afin d'esquiver les stress abiotiques de fin de cycle apparaît clairement, il semble également nécessaire de tenir compte de la stabilité des variétés. En effet, d'autres travaux d'Arvalis ont permis de montrer que les variétés précoces à montaison réagissent d'avantage que les variétés tardives lorsque les conditions environnementales induisent un développement accéléré

des plantes (sous l'effet d'un automne-hiver doux par exemple). Ainsi, lors d'une année plus précoce de 10 jours en moyenne, les variétés les plus instables (qui sont généralement précoces) sont en avance de 18 jours en moyenne alors que les plus stables ne le sont que de quatre jours (données non publiées).

Dans le cadre du projet FSOV GIEC, des modèles basés sur des marqueurs moléculaires permettant de prédire la précocité chez le blé tendre ont été calibrés et une méthode permettant de définir des idéotypes de précocité à l'aide d'un modèle écophysiologique basé sur des marqueurs moléculaires a été proposée. Ces modèles peuvent potentiellement aider les sélectionneurs à identifier des lignées adaptées et stables en termes de développement, à évaluer si la variabilité génétique utilisée aujourd'hui en termes de précocité est suffisante pour faire face aux changements climatiques mais aussi aux agriculteurs afin d'identifier, parmi les variétés disponibles, celles les plus adaptées à leur contexte agro-climatique.

## 2 Matériel et méthode

### ► Matériel végétal et expérimentations pour la calibration et la validation des modèles

Les modèles de prédiction issus du projet ont été calibrés sur des données générées dans le cadre des activités d'Arvalis Institut du Végétal. Ces données correspondent à des observations des dates des stades épi à 1 cm (GS30) et demi-épiaison (GS55) pour des variétés inscrites au catalogue officiel dans différents lieux en France sur la période 1997-2016 (Figure 2), essentiellement pour des dates de semis d'automne. La durée des phases semis – épi à 1 cm (Z30) et semis – épiaison (Z55) a ainsi pu être calculée pour chaque variété dans chaque essai en somme de degrés jours (base 0°C). Ensuite, la durée d'élongation des tiges (StEI) a été calculée comme la différence entre Z55 et Z30. Pour chaque caractère, seules les variétés présentent dans au moins 5 essais ont été sélectionnées pour la suite des analyses soit 438 variétés pour Z30, 718 pour Z55 et 404 pour StEI (Tableau 1).

Caractère	# variétés	# essais (min - max)
Z30	438	5-186
Z55	718	5-825
StEI	404	5-164
b.Z30	144	6-9
b.Z55	212	30-50
b.StEI	143	6-9

**Tableau 1.** Nombre de variétés et nombres minimaux et maximaux d'essais par variétés utilisés pour le calcul des moyennes génotypiques ajustées (Z30, Z55, StEI) et des coefficients de plasticité correspondants (b.Z30, b.Z55, b.StEI) pour le jeu de données de calibration.

Ces modèles ont ensuite été validés sur des données indépendantes acquises dans le cadre du projet sur un panel de 149 lignées issues de 9 populations (Tableau 2) testées dans 20 essais en France et en Angleterre en 2018 et 2019 (Figure 3). Les stades épi à 1 cm (GS30) et demi-épiaison (GS55) ont été mesurés pour chaque variété



**Figure 2 :** Cartographie des données générées dans le cadre des activités d'Arvalis Institut du Végétal et utilisées pour la calibration des modèles. Localisation des essais avec des mesures (A) du stade demi-épiaison (GS55), (B) du stade épi à 1cm (GS30) et (C) des stades GS30 et GS55 permettant de calculer la durée d'élongation des tiges (StEI).

dans chaque essai. De la même manière que pour le jeu de données de calibration, la durée des phases semis – épi à 1 cm (Z30) et semis – épiaison (Z55) a été calculée pour chaque variété dans chaque essai en somme de degrés jours (base 0°C) et la durée d'élongation des tiges (StEI) a été calculée comme la différence entre Z55 et Z30.



Population	Partenaire	Type	Nombre de lignées
HEROS x BELEPI	Florimond	DH	18
STADIUM x SOLEHIO	KWS-Momont	DH	18
FALADO x SHERLOCK	Secobra	F3	14
AUCKLAND x DESCARTES	Limagrain	DH	17
ACCROC x GALIBIER	Agri-Obtentions	F3	13
UN7-3060 x RUBISKO	Unisigma	DH, F4/F5	17
BUENNO x TRIOMPH	syngenta	DH	17
MAGIC_inra	INRA GQE	SSD	17
MAGIC_niab	NIAB	SSD	18
<b>TOTAL</b>			<b>149</b>

**Tableau 2.** Constitution du panel de validation testé dans le cadre du projet FSOV GIEC. Le panel était constitué de 149 lignées issues de 9 populations.

### ► Calcul de moyennes ajustées et de coefficients de plasticité

Une valeur moyenne par génotype ajustée des effets essais a été calculée à l'aide du modèle mixte suivant :

$$Y_{ij} = \mu + g_i + e_j + \varepsilon_{ij}$$

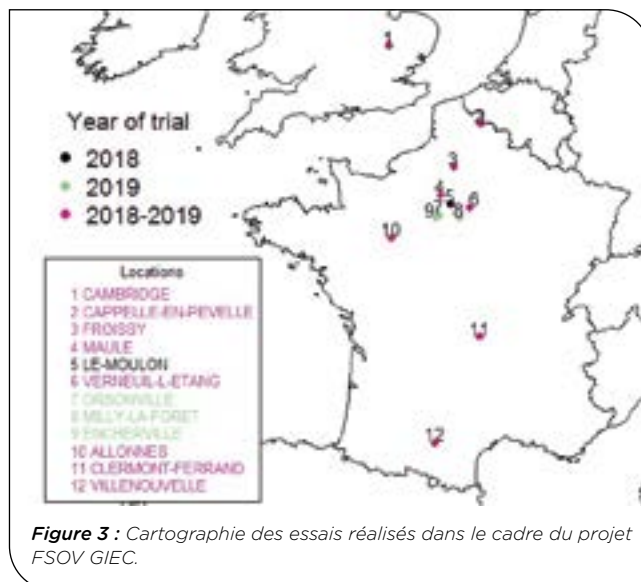
Avec  $Y_{ij}$  le phénotype du génotype  $i$  dans l'essai  $j$ ,  $\mu$  la moyenne générale,  $g_i$  l'effet du génotype  $i$ ,  $e_j$  l'effet aléatoire de l'essai  $j$  et  $\varepsilon_{ij}$  l'erreur résiduelle.

Ensuite, pour chacun des caractères étudiés, un coefficient de plasticité a été calculé selon la méthode de Finlay and Wilkinson (1963). Les données de départ étant fortement déséquilibrées, elles ont d'abord été filtrées de manière à ne garder qu'un ensemble de variétés bien représentées dans un sous-ensemble d'essais. Ainsi, pour Z30, 9 essais ont été retenus avec 144 variétés présentes dans 6 à 9 essais (Tableau 1). Pour Z55, 50 essais ont été retenus avec 212 variétés présentes dans 30 à 50 essais (Tableau 1). Enfin, pour StEl, 9 essais ont été retenus avec 143 variétés présentes dans 6 à 9 essais (Tableau 1). Le modèle utilisé pour le calcul des coefficients de plasticité était le suivant :

$$Y_{ij} = \mu + g_i + e_j + b_i e_j + \varepsilon_{ij}$$

Avec  $Y_{ij}$  le phénotype du génotype  $i$  dans l'essai  $j$ ,  $\mu$  la moyenne générale,  $g_i$  l'effet du génotype  $i$ ,  $e_j$  l'effet de l'essai  $j$ ,  $b_i$  l'écart au modèle additif de la variété  $i$  dans l'essai  $j$  et  $\varepsilon_{ij}$  l'erreur résiduelle. Selon ce modèle,  $1+b_i$  peut être défini comme la variation attendue de la précocité de la lignée  $i$  en fonction de la précocité moyenne dans les différents essais (norme de réaction génotypique). Ainsi, les génotypes avec  $1+b_i$  proche de 1 se comportent comme la moyenne des variétés tandis que celles avec  $1+b_i$  élevé réagissent de manière accentuée aux fluctuations environnementales (plasticité élevée) et celle avec  $1+b_i$  faible sont plus stables (leur précocité est proche d'un environnement à l'autre). Ces coefficients de plasticité calculés pour Z30, Z55 et StEl sont dénommés b.Z30, b.Z55, b.StEl respectivement.

L'ensemble de ce matériel a été caractérisé sur le plan génotypique à l'aide des marqueurs SNP des puces TaBW420K ou TaBW35K (Paux *et al.*, 2022). Dans ce



**Figure 3 :** Cartographie des essais réalisés dans le cadre du projet FSOV GIEC.

dernier cas, une imputation des données des marqueurs TaBW420K a été réalisée à l'aide du logiciel Beagle v5.2. Le matériel végétal étudié a également été caractérisé à l'aide de marqueurs permettant de quantifier le nombre de copies des gènes Ppd-B1, Vrn-A1 et Vrn-A3 (Díaz *et al.*, 2012).

### ► Modèle de génétique d'association

Une analyse de génétique d'association a été réalisée pour les différents caractères étudiés à l'aide du modèle :

$$Y_i = \mu + \sum_{p=1}^p \alpha_p + \beta_m X_{im} + G_i + \varepsilon_i$$

Avec  $Y_i$  le phénotype de la variété  $i$ ,  $\mu$  la moyenne générale,  $\alpha_p$  l'effet du  $p^{\text{ième}}$  axe de l'analyse en coordonnées principales de la matrice d'apparentement,  $\beta_m$  l'effet du marqueur  $m$ ,  $X_{im}$  le génotype de la lignée  $i$  au marqueur  $m$ ,  $G_i$  un effet génotypique aléatoire de la lignée  $i$  et  $\varepsilon_i$  l'erreur résiduelle. Ce modèle a été ajusté avec le package MM4LMM (Laporte and Mary-Huard, 2018) pour chaque marqueur. Un seuil de  $-\log_{10}(p) = 4$  a été fixé arbitrairement afin de déclarer un marqueur comme étant significativement associé au caractère d'intérêt. L'assignation chromosomique et la position des marqueurs a été obtenue à partir du génome de référence RefSeqv1 (IWGSC *et al.*, 2018).

### ► Modèles de prédiction basés sur des marqueurs génétiques

Afin de prédire les caractères phénotypiques étudiés, différents modèles statistiques basés sur des marqueurs moléculaires ont été calibrés :

1 - Un modèle de régression linéaire multiple (GWAS) avec pour variables explicatives des marqueurs identifiés par génétique d'association :

$$Y_i = \mu + \sum_{m=1}^m \beta_m X_{im} + \varepsilon_i$$

2 - Un modèle linéaire mixte de prédiction génomique (GBLUP) :

$$Y_i = \mu + G_i + \varepsilon_i$$

3 - Un modèle linéaire mixte avec pour variables explicatives des marqueurs identifiés par génétique d'association et un effet génotypique aléatoire (GSGWAS) :

$$Y_i = \mu + \sum_{m=1}^m \beta_m X_{im} + G_i + \varepsilon_i$$

Avec  $Y_i$  la moyenne génotypique pour Z30, Z55, StEl, ou le coefficient de plasticité ( $1+b_i$ ) du genotype  $i$ ,  $\mu$  la moyenne générale,  $\beta_m$  l'effet du marqueur  $m$ ,  $X_{im}$  le génotype de la variété  $i$  au marqueur  $m$ ,  $G_i$  un effet génotypique aléatoire du genotype  $i$  calculé sur la base d'une matrice d'apparentement et  $\varepsilon_i$  l'erreur résiduelle. Ces modèles ont été ajustés avec le package BGLR (Pérez and de los Campos, 2013). Les marqueurs inclus dans les modèles GWAS et GSGWAS ont été sélectionnés sur la base des résultats d'études de génétique d'association et de l'analyse du déséquilibre de liaison afin de ne garder qu'un marqueur représentatif de chaque région associée. Les capacités prédictives de ces différents modèles ont été évaluées après validation croisée de type « k-folds » et sur la base de la qualité des prédictions obtenues pour les 149 lignées évaluées au cours du projet.

#### ► Modèle écophysiologique basé sur des marqueurs génétiques et identification d'idéotypes

Un modèle écophysiologique basé sur Weir *et al.* (1984) a été calibré à l'aide de marqueurs génétiques pour 408 variétés. Ce modèle de prédiction de la précocité est basé sur le concept d'accumulation de temps thermique modifié par la sensibilité génotypique à la photopériode et les besoins en vernalisation. Dans ce modèle, la durée des phases de développement est simulée de façon séquentielle et deux paramètres (GDDpv et GDDp) déterminent la durée des phases levée-épi à 1 cm et épi à 1 cm - épiaison. Ces deux paramètres ont été optimisés pour chacune des 408 variétés de manière à minimiser l'erreur quadratique moyenne entre stades observés et stades simulés. Pour chaque paramètre (GDDpv et GDDp), une analyse de génétique d'association et les modèles de prédictions basés sur des marqueurs génétiques décrits précédemment ont été calibrés puis validés sur les données du projet GIEC.

En parallèle, une analyse des risques de gel et de canicule a été réalisée pour 72 lieux en France à l'aide de données météorologiques pour la période 1986-2015. Pour chaque lieu × année, le dernier jour de gel où la température minimale journalière était inférieure à -5°C et le premier jour de canicule où la température maximale journalière était supérieure à 30°C ont été calculés. Pour chaque lieu, la période située entre le 90<sup>ème</sup> percentile du premier jour de gel et le 30<sup>ème</sup> percentile du premier jour de canicule a été définie et les lieux ont été regroupés en fonction des niveaux de risque de gel et de canicule par la méthode k-means.

Enfin, des idéotypes de précocité pour chaque lieu et trois dates de semis ont été définis par simulations à l'aide du modèle écophysiologique basé sur des marqueurs. Les paramètres GDDpv et GDDp pour 1019 variétés ont été prédits à partir des données de génotypage. Pour chaque lieu × variété × date de semis, les stades GS30 et GS65 (demi-floraison) ont été simulés. La date du stade GS65 a été calculée en ajoutant 124°C jours à la date de GS55 simulée (données non publiées). Un

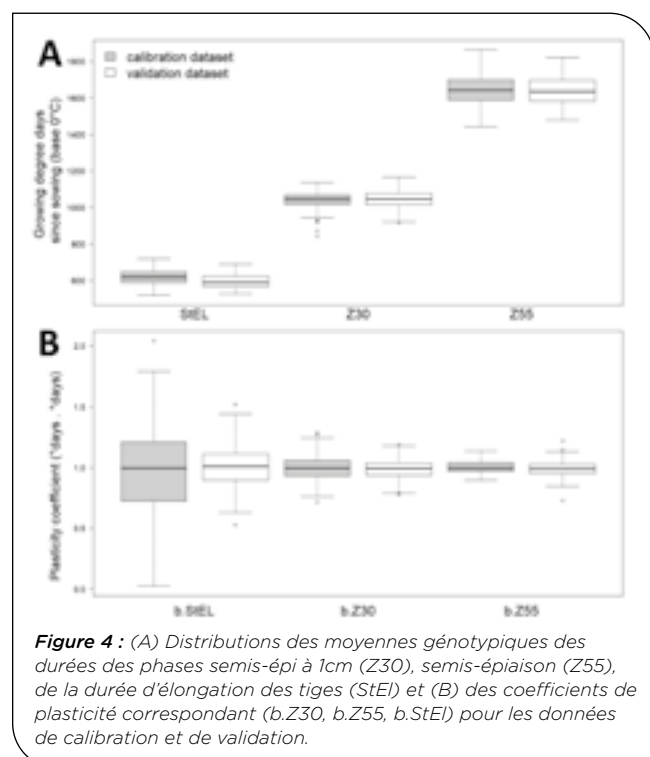
coefficient d'évitement génotypique a été calculé comme le pourcentage d'années où les dates d'occurrence des stades GS30 et GS65 étaient situés entre le 90<sup>ème</sup> percentile du premier jour de gel et le 30<sup>ème</sup> percentile du premier jour de canicule. Des valeurs moyennes ont été calculées pour chaque variété × date de semis × groupe d'environnements et les idéotypes ont été définis comme les variétés (ou les combinaisons alléliques à différents loci) permettant de maximiser l'évitement des épisodes de gel et de canicule. Ce travail méthodologique sur l'identification d'idéotypes de précocité par simulations écophysiologiques basées sur des marqueurs génétiques a été publié dans Bogard *et al.*, (2021).

## 3 Résultats

### ► Statistiques descriptives pour les moyennes génotypiques et les coefficients de plasticité

Les moyennes ajustées pour le jeu de données de calibration variaient de 843 à 1136°C jours pour Z30, de 1443 à 1861°C jours pour Z55 et de 520 à 720°C jours pour StEl entre les différents génotypes (Figure 4). Dans ce même jeu de données, les coefficients de plasticité pour Z30, Z55 et la durée d'élongation des tiges variaient respectivement de 0.75 à 1.33, 0.89 à 1.15 et de 0.18 à 1.92 (Figure 4).

Les moyennes ajustées pour le jeu de données de validation correspondant aux données phénotypiques acquises durant le projet sur 149 lignées testées dans 20 essais en France et en Angleterre pendant deux ans présentaient une gamme de variation similaire au jeu de données de calibration. Les moyennes génotypiques ajustées des effets essais variaient de 916 à 1166°C jours pour Z30, de 1478 à 1819°C jours pour Z55 et de 528 à 688°C jours pour StEl (Figure 4). Les coefficients de plasticité pour Z30, Z55 et la durée d'élongation des tiges variaient respectivement de 0.78 à 1.19, 0.73 à 1.22 et de 0.53 à 1.52 (Figure 4).



**Figure 4 :** (A) Distributions des moyennes génotypiques des durées des phases semis-épi à 1cm (Z30), semis-épiaison (Z55), de la durée d'élongation des tiges (StEl) et (B) des coefficients de plasticité correspondant (b.Z30, b.Z55, b.StEl) pour les données de calibration et de validation.

### ► Impact des variations du nombre de copies de gènes de précocité

Le nombre de copies des gènes Ppd-B1, Vrn-A3 et Vrn-A1 pour les géotypes des jeux de données de calibration et de validation variaient respectivement de 2 à 8, 0 à 8 et de 2 à 6. L'analyse des corrélations entre le nombre de copies de ces gènes et les caractères Z30, Z55, StEl ainsi que les coefficients de plasticité associés ont permis de mettre en évidence des corrélations faibles mais significatives entre Z55 et le nombre de copies de Ppd-B1 et Vrn-A1, entre StEl et le nombre de copies de Ppd-B1, Vrn-A1 et Vrn-A3 et entre le coefficient de plasticité de Z55 et Vrn-A3 (Tableau 3). Les corrélations avec le nombre de copies de Ppd-B1 étaient toujours négatives (les variétés précoces possédaient en moyenne un nombre de copies de Ppd-B1 élevé) tandis que les corrélations avec le nombre de copies de Vrn-A1 ou Vrn-A3 étaient toujours positives (les variétés tardives possédaient en moyenne un nombre de copies de Vrn-A1 ou Vrn-A3 élevé).

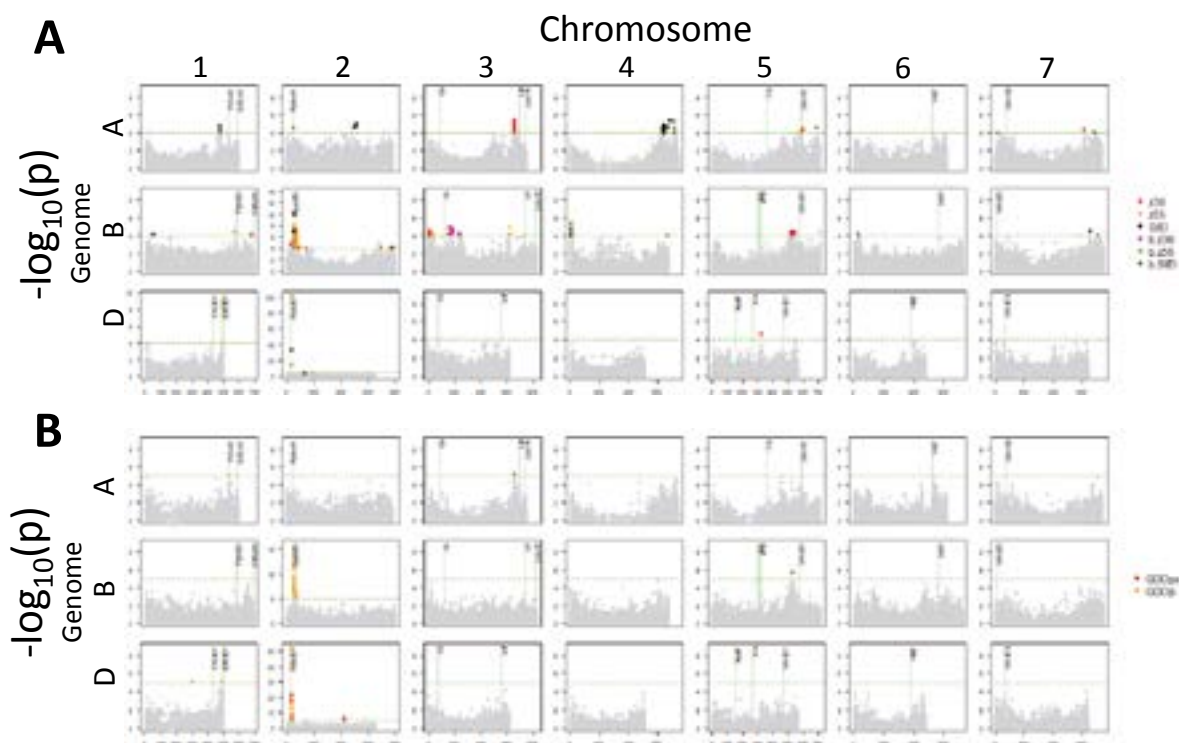
Trait	Ppd-B1	Vrn-A1	Vrn-A3
Z30	-0.01	-0.09	0.03
Z55	<b>-0.14</b>	<b>0.11</b>	-0.01
StEl	<b>-0.20</b>	<b>0.19</b>	<b>0.13</b>
b.Z30	0.04	0.00	0.07
b.Z55	-0.11	0.08	<b>0.12</b>
b.StEl	-0.08	0.10	0.02

**Tableau 3.** Corrélations entre nombre de copies de Ppd-B1, Vrn-A1, Vrn-A3 et les durées des phases semis-épi à 1 cm (Z30), semis-épiaison (Z55), la durée d'élongation des tiges (StEl) et les coefficients de plasticité correspondant (b.Z30, b.Z55, b.StEl). Les corrélations significatives au seuil  $\alpha=0.05$  sont indiquées en gras.

### ► Génétique d'association pour les moyennes génotypiques et les coefficients de plasticité

L'analyse de génétique d'association a permis de mettre en évidence l'importance de Ppd-D1 sur les variations phénotypiques pour Z30, Z55, StEl et b.Z55 (Figure 5A). Un marqueur pour ce gène a ensuite été utilisé comme cofacteur dans le modèle de génétique d'association afin d'identifier des loci supplémentaires. Un second QTL majeur a ainsi été identifié dans la région de Ppd-B1 pour Z30, Z55, StEl et b.Z55 (Figure 5A). D'autres QTL ont également été identifiés à proximité de gènes de précocité connus tels que Ft3-B1 pour b.Z55, Elf3-B1 pour Z30 tous deux situés sur le chromosome 1B, Elf3-D1 sur le 1D pour Z55, Ppd-A1 situé sur le 2A pour Z30, une zone à proximité de Lumini Dependens (LD) sur le 3A pour Z30, une zone proche de Vrn-A1 sur le 5A pour Z30 et Z55 et une zone proche de Vrn-B1 sur le 5B pour Z30 et le coefficient de plasticité correspondant (Figure 5A).

Un marqueur représentatif de chaque QTL a été sélectionné après analyse du déséquilibre de liaison entre marqueurs situés dans la même région. Le nombre de marqueurs sélectionnés était de 18 pour Z30, 17 pour Z55, 13 pour StEl, quatre pour b.Z30 et cinq pour b.Z55 et b.StEl. Seul le marqueur BGABW004965 dans la région de Ppd-D1 était commun aux différents caractères. Néanmoins, il y avait clairement d'autres régions communes à différents caractères et représentés par différents marqueurs. Par exemple, les marqueurs BWS2256 et BGABW020552 sont situés dans la région de Ppd-B1 et ont été sélectionnés pour Z55 et StEl. Les marqueurs sélectionnés ont ensuite été utilisés pour calibrer des modèles de prédiction.



**Figure 5 :** Résultats de génétique d'association pour (A) les moyennes génotypiques des durées des phases semis-épi à 1 cm (Z30), semis-épiaison (Z55), de la durée d'élongation des tiges (StEl) et (B) des coefficients de plasticité correspondants (b.Z30, b.Z55, b.StEl) et (B) pour les paramètres du modèle écophysio-logique (GDDpv et GDDp). Chaque point représente un marqueur positionné selon la carte physique du génome de référence RefSeqv1. L'ordonnée représente le degré de significativité des marqueurs. Les points en couleurs représentent les marqueurs considérés comme significatifs pour les caractères correspondants. L'échelle de l'axe des ordonnées varie en fonction du chromosome considéré.



## ► Génétique d'association pour les moyennes génotypiques et les coefficients de plasticité

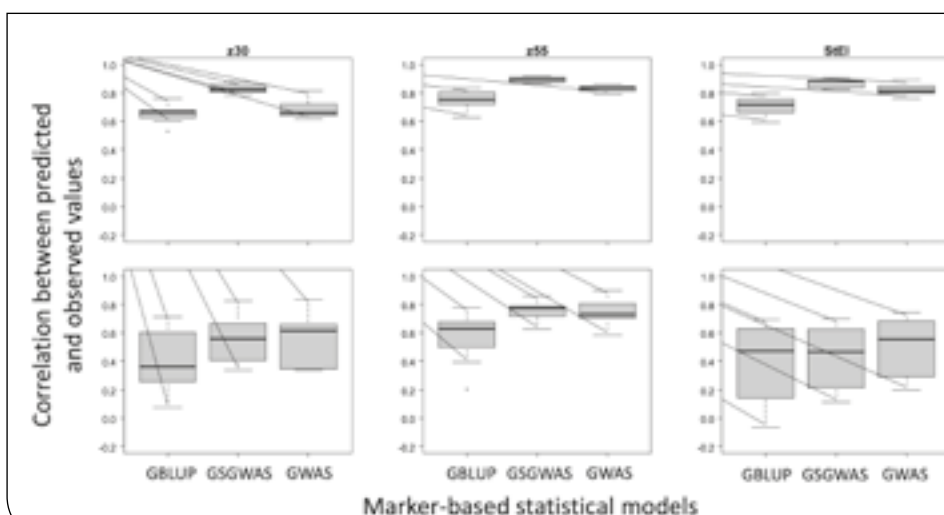
L'analyse de génétique d'association a permis de mettre en évidence l'importance de *Ppd-D1* sur les variations phénotypiques pour Z30, Z55, StEl et b.Z55 (Figure 5A). Un marqueur pour ce gène a ensuite été utilisé comme cofacteur dans le modèle de génétique d'association afin d'identifier des loci supplémentaires. Un second QTL majeur a ainsi été identifié dans la région de *Ppd-B1* pour Z30, Z55, StEl et b.Z55 (Figure 5A). D'autres QTL ont également été identifiés à proximité de gènes de précocité connus tels que *Ft3-B1* pour b.Z55, *Elf3-B1* pour Z30 tous deux situés sur le chromosome 1B, *Elf3-D1* sur le 1D pour Z55, *Ppd-A1* situé sur le 2A pour Z30, une zone à proximité de *Lumini Dependens* (LD) sur le 3A pour Z30, une zone proche de *Vrn-A1* sur le 5A pour Z30 et Z55 et une zone proche de *Vrn-B1* sur le 5B pour Z30 et le coefficient de plasticité correspondant (Figure 5A). Un marqueur représentatif de chaque QTL a été sélectionné après analyse du déséquilibre de liaison entre marqueurs situés dans la même région. Le nombre de marqueurs sélectionnés était de 18 pour Z30, 17 pour Z55, 13 pour StEl, quatre pour b.Z30 et cinq pour b.Z55 et b.StEl. Seul le marqueur BGABW004965 dans la région de *Ppd-D1* était commun aux différents

caractères. Néanmoins, il y avait clairement d'autres régions communes à différents caractères et représentés par différents marqueurs. Par exemple, les marqueurs BWS2256 et BGABW020552 sont situés dans la région de *Ppd-B1* et ont été sélectionnés pour Z55 et StEl. Les marqueurs sélectionnés ont ensuite été utilisés pour calibrer des modèles de prédiction.

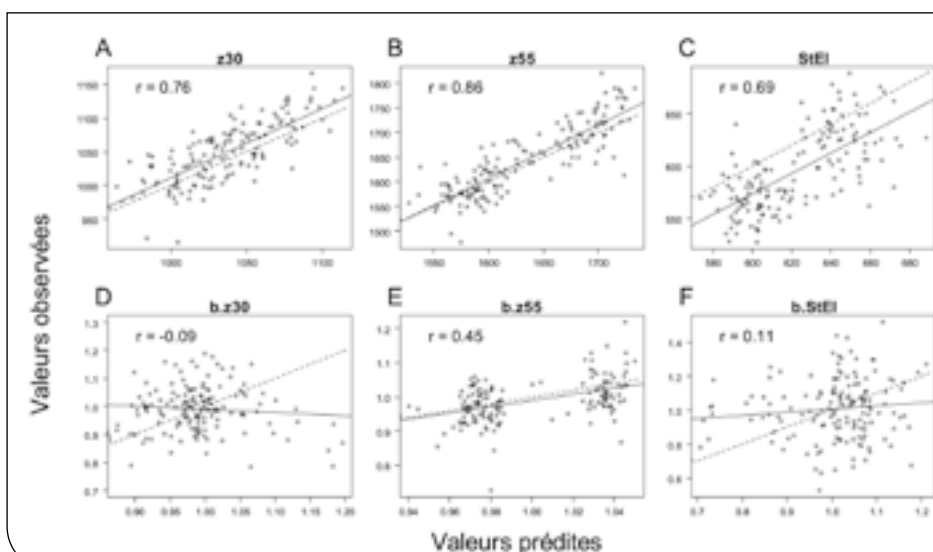
## ► Capacités prédictives des modèles basés sur des marqueurs pour les moyennes génotypiques et les coefficients de plasticité

Les capacités prédictives estimées par validation croisée des modèles statistiques basés sur des marqueurs apparaissaient élevées pour Z30, Z55 et StEl mais faibles pour tous les coefficients de plasticité. Le modèle le plus prédictif était généralement GSGWAS (Figure 6).

Les différents caractères étudiés ont ensuite été prédits avec le modèle GSGWAS pour les 149 lignées testées dans le cadre du projet et ont été comparées aux valeurs observées (Figure 7). La corrélation entre valeurs prédites et observées était élevée pour Z30, Z55 et StEl (respectivement 0.76, 0.86 et 0.69), modérée pour b.Z55 (0.45) et faible voire nulle pour b.Z30 et b.StEl (respectivement -0.09 et 0.11).



**Figure 6 :** Capacités prédictives estimées par validation croisée des modèles statistiques basés sur des marqueurs (GWAS, GBLUP, et GSGWAS) pour les durées des phases semis-épi à 1 cm (Z30), semis-épiaison (Z55), la durée d'élongation des tiges (StEl) et les coefficients de plasticité correspondants (b.Z30, b.Z55, b.StEl)

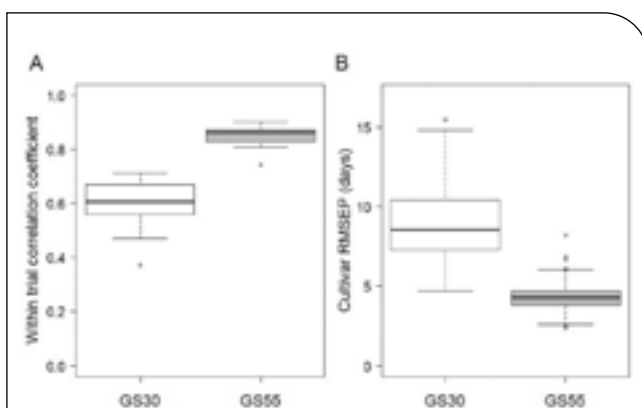


**Figure 7 :** Corrélations entre valeurs observées et valeurs prédites par le modèle GSGWAS pour le jeu de données de validation comprenant 149 lignées testées dans 20 essais en France et en Angleterre pendant deux ans. Les caractères prédits étaient les durées des phases semis-épi à 1 cm (Z30), semis-épiaison (Z55), la durée d'élongation des tiges (StEl) et les coefficients de plasticité correspondant (b.Z30, b.Z55, b.StEl).

### ► Calibration et évaluation d'un modèle écophysiologique basé sur des marqueurs génétiques pour la précocité

L'optimisation des paramètres GDDpv et GDDp du modèle écophysiologique pour 408 variétés a été réalisée. Les médianes des erreurs de prédiction par génotype pour GS30 et GS55 avec les paramètres optimisés s'élevaient à 5.5 et 3.3 jours. L'analyse de génétique d'association a permis de mettre en évidence la forte association de Ppd-D1 avec les variations des paramètres GDDpv et GDDp dans le panel d'étude (Figure 5B). Un marqueur proche de Ppd-D1 a ensuite été utilisé comme cofacteur dans le modèle de génétique d'association et d'autres régions ont pu être identifiées, notamment à proximité de gènes de précocité connus. Ainsi, en plus de Ppd-D1, GDDpv est apparu associé à trois autres régions sur les chromosomes 2D, 3A (à 38Mbp de LD) et 5B à 46Mbp de Vrn-B1 (Figure 5B) tandis que GDDp est apparu associé à 4 autres régions dont une sur le chromosome 1A (à 5Mbp de Ft3-A1), deux régions sur le 1D dont une proche de Elf3-D1 (à 5Mbp) et quatre associations sur le 2B dans la région de Ppd-B1 (Figure 5B). D'autres loci proches de Hd-1 sur les chromosomes 6A et 6B présentaient un niveau de significativité proche du seuil choisi dans cette étude (Figure 5B).

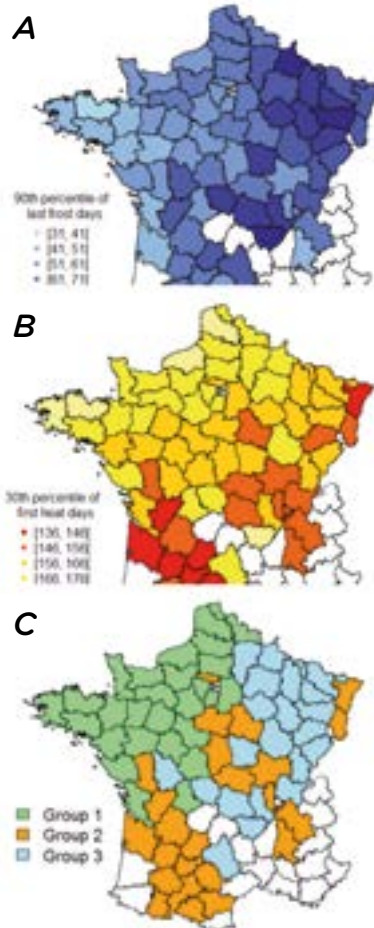
Les modèles GWAS, GBLUP et GSGWAS ont été ajustés et leurs capacités prédictives ont été évaluées par validation croisée. Les meilleures capacités prédictives ont été obtenues avec le modèle GSGWAS. Ce modèle a été utilisé afin de prédire les paramètres GDDpv et GDDp pour chacune des 149 lignées évaluées dans le cadre du projet FSOV GIEC. Les stades GS30 et GS55 de ces lignées ont ensuite été simulés pour les 20 essais du projet et comparés aux stades observés. Les corrélations intra-essais entre valeurs prédites et observées pour GS30 et GS55 variaient de 0.37 à 0.71 (médiane 0.60) et de 0.74 à 0.90 (médiane 0.86) (Figure 8A). Les médianes des erreurs de prédiction par génotype pour GS30 et GS55 avec les paramètres prédits sur la base des données de génotypage pour ce jeu de données indépendant s'élevaient à 8.5 et 4.2 jours respectivement (Figure 8B).



**Figure 8 :** (A) Corrélations intra-essais et (B) racine carrée de l'erreur quadratique moyenne entre valeurs observées pour GS30 et GS55 et prédites à l'aide d'un modèle écophysiologique basé sur des marqueurs pour 149 génotypes testés dans 20 essais.

### ► Analyse des risques de gel et de canicule

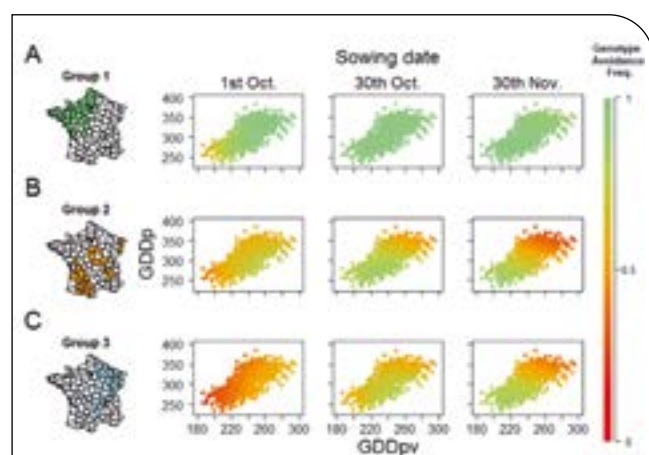
L'analyse des risques de gel et canicule dans les régions productrices de blé tendre en France a permis de mettre en évidence des situations contrastées. Ainsi, Le 90<sup>ème</sup> percentile du dernier jour de gel et le 30<sup>ème</sup> percentile du premier jour de canicule variaient du 30<sup>ème</sup> au 100<sup>ème</sup> jour calendaire (Figure 9A) et du 136<sup>ème</sup> au 182<sup>ème</sup> jour calendaire (Figure 9B). Les différentes régions ont ensuite été classées en trois groupes avec des niveaux de risques contrastés (Figure 9C). Le groupe 1 rassemblait 27 lieux avec des niveaux de risques gel et canicule faibles (dernier jour de gel variant du 31<sup>ème</sup> au 68<sup>ème</sup> jour de l'année et premier jour de canicule variant du 158<sup>ème</sup> au 182<sup>ème</sup> jour de l'année ; Figure 9C). Le groupe 2 (24 lieux) présentait un risque de gel modéré et un risque de canicule élevé (dernier jour de gel variant du 45<sup>ème</sup> au 75<sup>ème</sup> jour de l'année et premier jour de canicule variant du 136<sup>ème</sup> au 160<sup>ème</sup> jour de l'année ; Figure 9C). Enfin, le groupe 3 rassemblant 21 lieux était caractérisé par un risque de gel élevé et un risque de canicule modéré (dernier jour de gel variant du 72<sup>ème</sup> au 100<sup>ème</sup> jour de l'année et premier jour de canicule variant du 149<sup>ème</sup> au 177<sup>ème</sup> jour de l'année ; Figure 9C).



**Figure 9 :** Analyse des risques (A) de gel et (B) de canicule pour 72 lieux de référence. Pour chaque lieu, une analyse basée sur 30 années de données météorologiques (période 1986-2015) a permis de calculer le 90<sup>ème</sup> percentile du dernier jour de gel (température minimum < -5°C) et le 30<sup>ème</sup> percentile du premier jour de canicule (température maximum > 30°C) exprimés en jour de l'année. (C) L'ensemble des lieux ont ensuite été classés selon 3 groupes à l'aide de la méthode des k-means. Les régions en blanc n'ont pas été considérées dans l'analyse.

## ► Identification d'idéotypes par simulation pour maximiser l'échappement des stress gel et canicule

Les stades GS30 et GS65 de 1079 variétés pour trois dates de semis ont été simulés dans le réseau de 72 lieux à l'aide des données climatiques historiques (période 1986-2015). Les fréquences d'échappement génotypiques ont ensuite été calculées pour chaque lieu × date de semis puis des valeurs moyennes ont été obtenues pour chacun des groupes d'environnements. Les résultats indiquent qu'il est possible d'atteindre la fréquence d'échappement maximale quelle que soit la date de semis pour les lieux du groupe 1 (Figure 10A). Dans les lieux des groupes 2 et 3, l'utilisation de variétés précoces et d'une date de semis tardive semble avantageuse puisqu'elle offre une plus grande flexibilité dans le choix variétal. Dans ces régions, il apparaît nécessaire d'optimiser le couple variété × date de semis afin d'atteindre la fréquence d'échappement maximale (Figures 10B et 10C).



**Figure 10 :** Moyenne des fréquences d'échappement génotypiques pour 1019 variétés × 3 dates de semis × trois groupes de lieux. (A) Les lieux du groupe 1 sont caractérisés par des risques gel et canicule faibles, (B) le groupe 2 par un risque de gel modéré et un risque de canicule élevé et (C) le groupe 3 par un risque de gel élevé et un risque de canicule modéré. Des simulations des stades épi à 1cm (GS30) et floraison (GS65) à l'aide d'un modèle écophysologique basé sur des marqueurs génétiques ont été réalisées pour chaque variété représentant une combinaison des paramètres GDDpv et GDDp du modèle dans 72 lieux pour 30 années climatiques (période 1986-2015) et trois dates de semis (1<sup>er</sup> octobre, 30 octobre et 30 novembre). La fréquence d'échappement génotypique a été calculée pour chaque variété × lieu × date de semis comme la fréquence où les stades GS30 et GS65 étaient simulés entre le 90<sup>ème</sup> percentile du dernier jour de gel et le 30<sup>ème</sup> percentile du premier jour de canicule. Une valeur moyenne a été calculée pour chaque variété × groupe de lieux et représentée à l'aide d'une échelle de couleur allant du rouge (fréquence d'échappement égale à zéro) au vert (fréquence d'échappement égale à un).

## 4 Discussion

Identifier le déterminisme génétique et être en mesure de prédire la phénologie revêt une importance cruciale dans la sélection et la production des blés. En effet, du point de vue des sélectionneurs, il est capital de pouvoir proposer une variabilité génétique suffisante afin de couvrir les besoins du marché avec des variétés adaptées aux différents contextes culturels rencontrés

(température, photopériode, dates de semis). De même il est important de pouvoir anticiper si cette variabilité génétique sera suffisante pour faire face aux changements climatiques qui vont induire des effets importants sur la précocité mais aussi sur les dates d'occurrence, la fréquence et l'intensité des stress abiotiques de fin de cycle notamment. Du côté des agriculteurs, cette capacité à prédire la phénologie est également cruciale. En effet, les outils d'aide à la décision utilisés par les agriculteurs pour optimiser différents aspects de la culture des blés (choix variétal, fertilisation, protection des cultures) reposent largement sur des modèles de prédiction de la précocité.

Les analyses de génétiques d'association réalisées dans le cadre du projet ont mis en évidence le rôle majeur des gènes de sensibilité à la photopériode du groupe 2 (Ppd-D1, Ppd-B1 et dans une moindre mesure Ppd-A1) dans le matériel inscrit en France. Ces régions étaient associées à de nombreux caractères, que ce soit à la précocité moyenne ou aux paramètres du modèle écophysologique. D'autres études ont pu montrer l'importance de ces régions sur le déterminisme de la précocité chez les céréales (Turner *et al.*, 2005 ; Beales *et al.*, 2007 ; Le Gouis *et al.*, 2012). D'autres régions du génome identifiées par génétique d'association ont pu être reliées à des gènes de précocité connus tels que Ft3-A1, Elf3-B1 et Elf3-D1 sur les chromosomes du groupe 1 (Bonnin *et al.*, 2008 ; Alvarez *et al.*, 2016 ; Wang *et al.*, 2016), LD sur le chromosome 3B (Rousset *et al.*, 2011), ou à proximité des gènes Vrn-A1 et Vrn-B1 sur le groupe 5 (Rousset *et al.*, 2011). Dans ces derniers cas, même si ces gènes sont connus pour fortement structurer la variabilité au niveau mondial (en séparant les types hiver/printemps), le panel étudié étant exclusivement de type hiver et les degrés d'association relativement modérés, ces associations pourraient s'expliquer par la présence d'autres allèles différenciant les types hivers entre eux (Rousset *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'analyse des corrélations entre durées de phases et polymorphisme de nombre de copies pour les gènes Ppd-B1, Vrn-A1 et Vrn-A3 ont permis de mettre en évidence des effets faibles mais significatifs sur différents caractères liés à la précocité et à sa plasticité, ce qui a pu être démontré par ailleurs (Díaz *et al.*, 2012 ; Würschum *et al.*, 2015, 2019).

Les travaux réalisés au cours du projet ont permis d'une part de travailler sur la précocité moyenne des variétés mais aussi sur la stabilité de la précocité à travers l'étude de coefficients de plasticité. Néanmoins, les résultats obtenus n'ont pas permis d'aboutir à des capacités prédictives satisfaisantes (sauf peut-être pour b.Z55). Cette incapacité à produire des modèles pour ces caractères de stabilité peut s'expliquer en partie du fait d'une quantité de données plus faible en nombre de variétés étudiées et en nombre d'environnements par variété mais aussi parce que le jeu de données sélectionné était encore déséquilibré (toutes les variétés n'étaient pas présentes dans tous les environnements). Or, compte tenu de la méthode de calcul des coefficients de plasticité, cela est susceptible d'affecter la qualité d'estimation des coefficients.

En plus des travaux effectués sur la précocité moyenne et les coefficients de plasticité, ce projet a permis d'aborder l'identification d'idéotypes de précocité adaptés à différents lieux × dates de semis afin de maximiser l'échappement



aux stress abiotiques. Depuis que le concept d'idéotype a été proposé par Donald, (1968), les approches développées pour parvenir à des idéotypes adaptés à différents types d'environnement ont évoluées et impliquent largement des modèles écophysiologiques (Semenov and Stratonovitch, 2013 ; Semenov *et al.*, 2014; Martre *et al.*, 2015; Rötter *et al.*, 2015). Ainsi, la recherche dans ce domaine est passée de l'expertise sur les caractères morpho-physiologiques désirables dans un environnement donné à la simulation des performances dans des réseaux d'essais virtuels et à l'identification des combinaisons de paramètres ou des combinaisons d'allèles les plus favorables pour un type d'environnement donné. L'approche suivie dans le cadre du projet était largement inspirée de Zheng *et al.* (2012). Néanmoins, les capacités prédictives du modèles écophysiologique basé sur des marqueurs semblent clairement supérieures à ce qui a pu être publié à ce jour pour la France (Bogard *et al.*, 2014, 2015). Par ailleurs, la méthode d'identification d'idéotype qui repose sur le calcul d'une fréquence d'évitement génotypique est nouvelle et offre une certaine flexibilité. Ainsi, ces travaux à visée méthodologique devraient pouvoir être étendus à d'autres séries climatiques, notamment des séries futures afin d'évaluer si la variabilité génétique actuelle est suffisante pour faire face aux évolutions induites par le changement

climatique, mais également à d'autres stress abiotiques comme les dégâts de gel sur épi qui sont susceptibles de devenir plus fréquent à l'avenir du fait d'un développement accéléré.

## 5 Conclusions

Le projet FSOV GIEC a ainsi permis de produire des modèles avec des capacités prédictives satisfaisantes pour la durée des phases semis-épi à 1cm (Z30), semis-épiaison (Z55) et pour la durée d'élongation des tiges (StEl). En revanche, les modèles pour les coefficients de plasticité correspondants présentaient des capacités prédictives moindre, en particulier pour Z30 et StEl. Le travail réalisé dans le cadre de ce projet a également permis de calibrer un modèle écophysiologique à l'aide de marqueurs génétiques avec de bonnes capacités prédictives, en particulier pour prédire le stade épiaison. Enfin, une méthode d'identification d'idéotypes de précocité visant à maximiser l'échappement aux stress abiotiques (gel et canicule) a été proposée. Cette méthode présente une certaine flexibilité et pourrait être appliquée à d'autres stress abiotiques et pour des séries climatiques futures.

## Références bibliographiques

- Alvarez MA, Tranquilli G, Lewis S, Kippes N, Dubcovsky J. 2016. Genetic and physical mapping of the earliness per se locus Eps-Am1 in *Triticum monococcum* identifies EARLY FLOWERING 3 (ELF3) as a candidate gene. *Functional & Integrative Genomics* 16, 365–382.
- Beales J, Turner A, Griffiths S, Snape JW, Laurie DA. 2007. A Pseudo-Response Regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive Ppd-D1a mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 115, 721–733.
- Bogard M, Hourcade D, Piquemal B, Gouache D, Deswartes J-C, Throude M, Cohan J-P. 2021. Marker-based crop model-assisted ideotype design to improve avoidance of abiotic stress in bread wheat. *Journal of Experimental Botany* 72, 1085–1103.
- Bogard M, Pierre J-B, Huguenin-Bizot B, Hourcade D, Paux E, Le Bris X, Gouache D. 2015. A simple approach to predict growth stages in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) combining prediction of a crop model and marker based prediction of the deviation to a reference cultivar: A case study in France. *European Journal of Agronomy* 68, 57–68.
- Bogard M, Ravel C, Paux E, Bordes J, Balfourier F, Chapman SC, Le Gouis J, Allard V. 2014. Predictions of heading date in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using QTL-based parameters of an ecophysiological model. *Journal of Experimental Botany* 65, 5849–5865.
- Bonnin I, Rousset M, Madur D, Sourdille P, Dupuits C, Brunel D, Goldringer I. 2008. FT genome A and D polymorphisms are associated with the variation of earliness components in hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 116, 383–394.
- 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 Research* 119, 201–212.
- Díaz A, Zikhali M, Turner AS, Isaac P, Laurie DA. 2012. Copy number variation affecting the photoperiod-B1 and vernalization-A1 genes is associated with altered flowering time in wheat (*Triticum aestivum*). *PLOS ONE* 7, e33234.
- Donald CM. 1968. The breeding of crop ideotypes. *Euphytica* 17, 385–403.
- Finlay KW, Wilkinson GN. 1963. The analysis of adaptation in a plant-breeding programme. *Australian Journal of Agricultural Research* 14, 742–754.
- 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, 62–70.
- IWGSC, Appels R, Eversole K, *et al.* 2018. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* 361, eaar7191.
- Laporte F, Mary-Huard T. 2018. MM4LMM: inference of linear mixed models through MM algorithm. R package version 1.0.5.
- Le Gouis J, Bordes J, Ravel C, *et al.* 2012. Genome-wide association analysis to identify chromosomal regions determining components of earliness in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 124, 597–611.
- Martre P, Quilot-Turion B, Luquet D, Memmah M-MO-S, Chenu K, Debake P. 2015. Chapter 14 - Model-assisted phenotyping and ideotype design. Editors: Sadras VO, Calderini DF. *Crop Physiology* (Second Edition). San Diego: Academic Press, 349–373.
- Paux, E.; The Breedwheat Consortium; Lafarge, S.; Balfourier, F.; Derory, J.; Charmet, G.; Alaux, M.; Perchet, G.; Bondoux, M.; Baret, F.; *et al.* Breeding for economically and environmentally sustainable wheat varieties: an integrated approach from genomics to selection. *Biology* 2022, 11, 149, doi:10.3390/biology11010149.

**Pérez P, de los Campos G.** 2013. *BGLR: A Statistical Package for Whole Genome Regression and Prediction*. R package version.

**Rötter RP, Tao F, Höhn JG, Palosuo T.** 2015. Use of crop simulation modelling to aid ideotype design of future cereal cultivars. *Journal of Experimental Botany* **66**, 3463–3476.

**Rousset M, Bonnin I, Remoué C, et al.** 2011. Deciphering the genetics of flowering time by an association study on candidate genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **123**, 907–926.

**Semenov MA, Stratonovitch P.** 2013. Designing high-yielding wheat ideotypes for a changing climate. *Food and Energy Security* **2**, 185–196.

**Semenov MA, Stratonovitch P, Alghabari F, Gooding MJ.** 2014. Adapting wheat in Europe for climate change. *Journal of Cereal Science* **59**, 245–256.

**Trnka M, Rötter RP, Ruiz-Ramos M, Kersebaum KC, Olesen JE, Žalud Z, Semenov MA.** 2014. Adverse weather conditions for European wheat production will become more frequent with climate change. *Nature Climate Change* **4**, 637–643.

**Turner A, Beales J, Faure S, Dunford RP, Laurie DA.** 2005. The Pseudo-Response Regulator Ppd-H1 Provides Adaptation to Photoperiod in Barley. *Science* **310**, 1031–1034.

**Wang J, Wen W, Hanif M, Xia X, Wang H, Liu S, Liu J, Yang L, Cao S, He Z.** 2016. TaELF3-1DL, a homolog of ELF3, is associated with heading date in bread wheat. *Molecular Breeding* **36**, 161.

**Weir AH, Bragg PL, Porter JR, Rayner JH.** 1984. A winter wheat crop simulation model without water or nutrient limitations. *The Journal of Agricultural Science* **102**, 371–382.

**Würschum T, Boeven PHG, Langer SM, Longin CFH, Leiser WL.** 2015. Multiply to conquer: Copy number variations at Ppd-B1 and Vrn-A1 facilitate global adaptation in wheat. *BMC Genetics* **16**.

**Würschum T, Rapp M, Miedaner T, Longin CFH, Leiser WL.** 2019. Copy number variation of Ppd-B1 is the major determinant of heading time in durum wheat. *BMC Genetics* **20**, 64.

**Zheng B, Chenu K, Dreccer MF, Chapman SC.** 2012. Breeding for the future: what are the potential impacts of future frost and heat events on sowing and flowering time requirements for Australian bread wheat (*Triticum aestivum*) varieties? *Global Change Biology* **18**, 2899–2914.

**GIEC : sélection assistée par marqueurs et modèles du stade épi à 1 cm pour des blés tendres adaptés au changement climatique**

Matthieu BOGARD<sup>1\*</sup>, Alison BENTLEY<sup>2</sup>, Jacques LE GOUIS<sup>3</sup>, Jérôme AUZANEAU<sup>4</sup>, Simon GRIFFITHS<sup>5</sup>, Jérôme ENJALBERT<sup>6</sup>, Pascal GIRAudeau<sup>7</sup>, Patrice SENELLART<sup>8</sup>, Céline ZIMMERLI<sup>9</sup>, Céline DUQUE<sup>10</sup>, Philippe LEREBOUR<sup>11</sup>, Sébastien CAIVEAU<sup>12</sup>, Ellen GOUEMAND<sup>13</sup>

**\*Coordinateur : Matthieu BOGARD, [m.bogard@arvalis.fr](mailto:m.bogard@arvalis.fr)**

## CONTEXTE ET OBJECTIFS

L'augmentation des températures moyennes du fait des changements climatiques induit une accélération de la croissance et du développement des blés et une augmentation de la fréquence et de l'intensité des stress abiotiques de fin de cycle. Ce projet vise à proposer des modèles de prédictions basés sur des marqueurs génétiques pour des caractères de précocité ainsi qu'une méthode d'identification d'idéotypes afin de maximiser l'échappement aux stress abiotiques (Figure 1).

## MATERIELS ET METHODES

Les modèles de prédiction ont été calibrés sur des données d'Arvalis Institut du Végétal puis validés sur un panel de 149 lignées (Tableau 1) testées dans 20 essais (Figure 2). Ces données correspondaient à des observations des stades épi à 1cm et épiaison qui ont permis de calculer la durée des phases semis-épi à 1cm, semis-épiaison, la durée d'élongation des tiges et les coefficients de plasticité correspondants. Un modèle écophysologique paramétré avec des marqueurs génétiques a été utilisé afin d'identifier des idéotypes de précocité permettant de maximiser l'échappement au gel et à la canicule après analyse de ces risques climatiques en France.

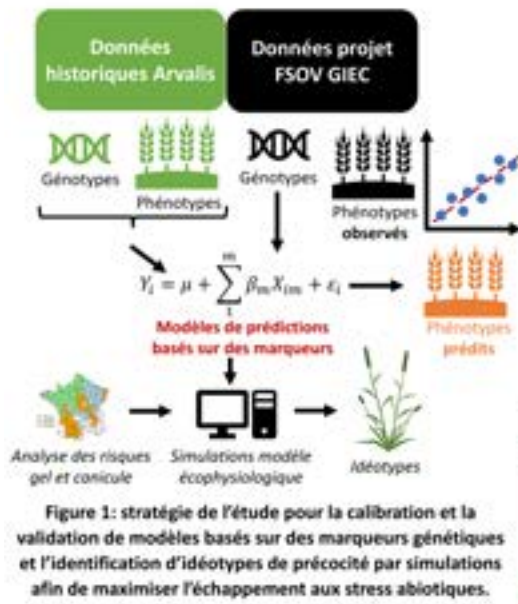


Figure 1: stratégie de l'étude pour la calibration et la validation de modèles basés sur des marqueurs génétiques et l'identification d'idéotypes de précocité par simulations afin de maximiser l'échappement aux stress abiotiques.

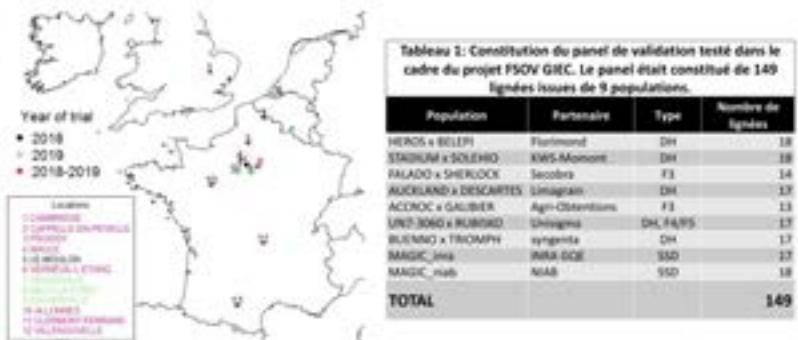


Tableau 2: Constitution du panel de validation testé dans le cadre du projet FSOV GRC. Le panel était constitué de 149 lignées issues de 9 populations.

Population	Partenaire	Type	Nombre de signés
HEROS x BELLEF	Flammond	DH	18
STAGIUM x SOLEIRO	KWS-Monmont	DH	18
PALADO x SHERLOCK	Secobra	F3	14
AUGELAND x DESCARTES	Limagrain	DH	13
ACROC x GALIBER	Agri-Obtentours	F3	13
UN7-3040 x RUBERIO	Shingora	DH, 44, F5	13
BUEMBO x THROMPI	syngenta	DH	17
MAGIC_ina	IRMA GCE	S50	27
MAGIC_nab	NAB	S50	18
<b>TOTAL</b>			<b>149</b>

## RESULTATS

Des modèles statistiques de prédiction basés sur des marqueurs génétiques de la durée des phases semis-épi à 1 cm (Z30), semis-épiaison (Z55), de la durée d'élongation des tiges (StEl) et les coefficients de plasticité correspondant (b.Z30, b.Z55, b.StEl) ont été testés sur un panel indépendant et montrent de bonnes capacités prédictives sauf pour b.Z30 et b.StEl (Figure 3).

Une méthode d'identification d'idootypes de précocité basée sur des simulations avec un modèle écophysiologique paramétré avec des marqueurs génétiques permettant de maximiser l'échappement aux stress abiotiques a été développée. Elle a été appliquée pour des environnements contrastés en termes de risque de gel et de canicule (Figure 4).

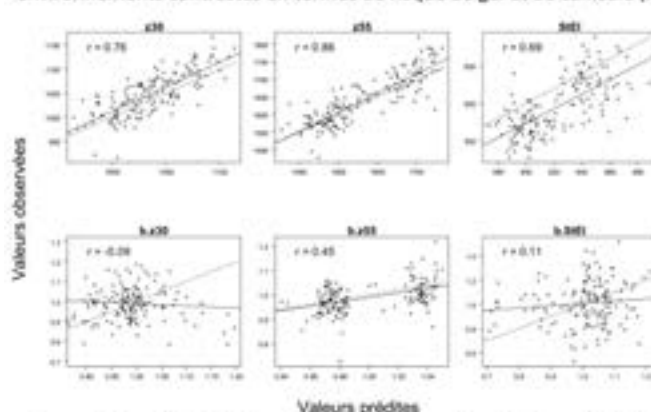


Figure 3: Capacités prédictives des modèles sur les données du panel FSOV GIEC. Le coefficient de corrélation entre valeurs prédites et observé est indiqué.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le projet FSOV GIEC a permis de produire des modèles avec des capacités prédictives satisfaisantes pour la durée des phases semis-épi à 1cm, semis-épilaison, la durée d'élongation des tiges et la plasticité à épilaison. Les travaux ont également permis de proposer une méthode d'identification d'idéotypes de précocité visant à maximiser l'échappement aux stress abiotiques. Cette méthode pourrait être appliquée à d'autres stress et pour des séries climatiques futures.

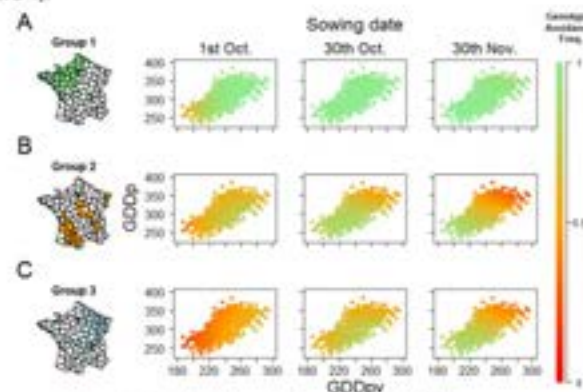


Figure 4: Identification d'idéotypes pour différents groupes d'environnements avec des risques gel et canicule contrastés et trois dates de semis. Chaque point représente une variété, l'échelle de couleur représente le niveau d'échappement aux stress.



# GPDUR : Génétique et Phénotypage du blé dur pour l'amélioration conjointe du rendement et de la teneur en protéines

**Delphine HOURCADE<sup>\*1</sup>, Boris DEMENOU<sup>1</sup>, Damien EYBALIN<sup>1</sup>, Matthieu BOGARD<sup>1</sup>, Thierry LEFEVRE<sup>2</sup>, Marion CHAPUS<sup>2</sup>, Carine ANDRE<sup>3</sup>, Andrea MASSI<sup>3</sup>, Jacques DAVID<sup>4</sup>, Pierre ROUMET<sup>4</sup>, Céline DUQUE<sup>5</sup>**

1 - ARVALIS - 6 Chemin de la Cote Vieille - 31450 Baziège

2 - RAGT 2n - 1740 Route du Canal - 82700 Montbartier

3 - SYNGENTA - 12 Chemin de l'Hobit, 31790 Saint-Sauveur / Società Produttori Sementi S.p.A. Via Macero,

1 - 40050 Argelato (Bologna) - Italy

4 - INRAE - Bâtiment Arcad, 10 rue Arthur Young, 34090 Montpellier

5 - LIMAGRAIN Europe - Ferme de l'Etang - BP3 - 77390 Verneuil l'Etang

**\*Coordinateur : Delphine HOURCADE, d.hourcade@arvalis.fr**

## 1 Introduction

La France est le 2<sup>ème</sup> producteur de l'Union Européenne (UE) de blé dur et c'est la 4<sup>ème</sup> céréale cultivée en France. Ainsi, 2 millions de tonnes sont produites sur le territoire dont 600 000 t/an sont utilisées par les industries de transformations (6 semouleries, 8 usines de fabrication de pâtes alimentaires, 4 de couscous et 2 de grains de blé dur précuits). L'autre partie de la récolte est exportée à parts égales vers les pays de l'UE (Italie et Benelux) et les pays du sud de la Méditerranée (Maghreb principalement).

Depuis quelques années, les surfaces françaises emblavées en blé dur diminuent et les exigences qualitatives des utilisateurs ont été à l'origine d'une structuration de la filière au sein de laquelle toutes les parties prenantes ont visé une production de haut niveau qualitatif, recherchant notamment de hauts niveaux de teneur en protéines.

Malheureusement, la base génétique du matériel végétal cultivé en France, étroite, semble arriver à ses limites. En effet, les résultats des dernières années d'inscription de variétés montrent que les gains de rendement se font systématiquement au détriment du taux de protéines. Ce second critère étant majeur pour l'accès au marché, le progrès génétique en matière de rendement est de fait très réduit. Or, l'absence de progrès en rendement sur le blé dur risque de mettre à mal la compétitivité de la culture vis-à-vis des autres cultures qui s'offrent au choix des producteurs, mettant en danger les volumes d'approvisionnement nécessaires au bon fonctionnement des industries d'aval. Evaluer une plus large diversité dans les conditions de culture française, afin d'identifier des sources génétiques pouvant amener à rompre cette corrélation négative entre rendement en grains et teneur en protéines semble donc essentiel. La relation négative entre rendement et protéine n'est pas une spécificité du blé dur. C'est également un sujet de préoccupation en blé tendre. Or, les travaux conduits par l'INRAE, les semenciers et Arvalis ont permis de développer des méthodes et des hypothèses permettant d'identifier les variétés non plus individuellement pour chacun des deux critères, mais conjointement pour les deux. Brièvement, il s'agit de caractériser la relation négative sur l'ensemble des données disponibles, puis de calculer, pour chaque variété, son écart à la tendance globale. Ce critère, dit « Grain Protein Deviation » (GPD) peut faire l'objet

d'études génétiques et d'amélioration variétale (Oury *et al.*, 2007, Bogard *et al.*, 2011). Sur blé tendre, la focalisation sur ce critère a également permis de montrer que l'absorption d'azote post-floraison est un facteur clé de la détermination du GPD (Bogard *et al.*, 2010), et que celle-ci est elle-même en partie liée à la dynamique de sénescence (Bogard *et al.*, 2011 ; Gaju *et al.*, 2013). Cette dynamique de la sénescence peut désormais être évaluée de manière fine sur des dispositifs de grandes tailles grâce aux outils de phénotypage haut débit (Comar *et al.*, 2012 ; Vilnius *et al.*, 2014). L'étude du critère GPD en blé dur n'a pas fait l'objet d'autant de travaux qu'en blé tendre. Bien que celui-ci soit relativement facile à calculer, par exemple sur les données d'inscription et post-inscription, il semble utile de mieux caractériser la diversité disponible aux sélectionneurs sur ce critère. La génétique d'association est une approche désormais utilisée en routine pour identifier des zones génomiques sous-tendant les variations de traits quantitatifs comme le rendement ou le GPD (Maccaferri *et al.*, 2011 ; Cormier *et al.*, 2014). Les panels d'association sont en général issus d'échantillonnage au sein de collections préétablies et présentent souvent une structuration génétique due à l'âge ou à l'origine du matériel (Buckler et Thornsberry 2002). Chez le blé dur, la structuration génétique est marquée, notamment entre les blés durs élités, les cultivars anciens et autres formes de *Turgidum* (Thuillet *et al.*, 2005, Maccaferri 2005). Plusieurs sources de diversité sont aujourd'hui disponibles pour constituer un panel de diversité génétique élitée, adaptée ou rapidement adaptable aux conditions françaises. Depuis 2010, l'université de Bologne a constitué puis intensément étudié un panel de variétés adaptées aux conditions méditerranéennes, tant sur des critères de réponse au stress hydrique (Maccaferri *et al.*, 2011) que sur diverses résistances (rouilles – Maccaferri *et al.*, 2010 ; mosaïque des céréales SBCMV – Ratti *et al.*, 2006). L'intérêt majeur de ce panel réside à la fois dans sa représentation de la diversité élitée (Royo *et al.*, 2010) et dans la fenêtre de floraison restreinte qui a été choisie (Maccaferri *et al.*, 2006, 2011) qui permet de limiter les effets de confusion lors des études sur le rendement et les stress abiotiques.

Le panel EPO (Evolutionary Pre-breeding Population) (David *et al.*, 2014) a été spécialement conçu dans le but d'intégrer un maximum de diversité élargie et originale par rapport au compartiment élitée du blé dur (Thuillet *et al.*, 2005, Haudry *et al.*, 2007). Il est issu de

14 cycles de brassage avec un taux d'allogamie estimé de 20 % d'inter-croisements d'une population composite fondée par l'introgression d'accessions entre les sous espèces de blé dur *T. turgidum* sp. ayant divergé avant l'apparition de la forme moderne de blé dur (*T. turgidum durum*) correspondant aux différentes étapes évolutives de ce lignage. Ce composite de l'espèce permet d'avoir une base génétique élargie avec un déséquilibre de liaison peu étendu (David *et al.*, 2014, David *et al.*, 2015). Environ 200 lignées correspondant à du matériel génétique fixé, ayant des caractéristiques (taille, précocité, sensibilité à la verse, et facilité de récolte) compatibles avec les modalités expérimentales ont été caractérisées dans le projet et génotypées avec la puce Axiom Breedwheat 420K.

Ce projet a donc pour objectif d'évaluer un panel combinant lignées élites et lignées ancêtres améliorées, par la mise en place d'un réseau d'essais rendement/protéines pour caractériser le GPD des lignées. Par ailleurs des modèles de prédiction génomique et des études de génétique d'association ont été réalisés afin de faciliter la sélection de lignées d'intérêt et l'introgression d'allèles absents du compartiment élite.

## 2 Matériel et méthode

Un panel de 300 génotypes a été constitué à partir de 3 sources :

- le Panel EPO (UMR AGAP) (ci-après dénommé EPO) : 178 lignées issues de 14 cycles d'inter-croisements réalisés grâce à la présence d'un gène de stérilité mâle au sein d'une population présentant une base génétique large. Ces lignées ont été fixées et la stérilité mâle éliminée.
- Panel élite français (ci-après dénommé French) : 55 variétés, cela correspond à l'ensemble des lignées ayant été inscrites en France dans les 50 dernières années.
- Panel « Tuberosa » (ci-après dénommé Unibo) : ensemble de 216 lignées élites assemblées par le groupe de Roberto Tuberosa à l'Université de Bologne, ayant une fenêtre de date de floraison assez restreinte et adaptée aux conditions méditerranéennes.

La sélection des 300 génotypes est basée sur : la proximité génétique par analyse de similarité (IBS), la précocité (variation de 10 jours d'écart maximum), la hauteur (gamme 60 à 100 cm), le potentiel de rendement et ses composantes, les connaissances à dire d'expert pour le GPD.

Pour des raisons de taille de dispositif, le panel final évalué dans les essais rendement/protéines comprenait 238 variétés dont 77 variétés du panel Unibo, 51 variétés françaises et 110 lignées EPO. La répartition des origines génétiques des variétés sélectionnées du panel Tuberosa et variétés élites est représentée sur la figure 1.

Le panel a été évalué au champ entre 2016 et 2019. La campagne 2016-2017 était dédiée à la multiplication des semences des 300 génotypes sélectionnés pour assurer les essais rendement/protéines prévus ensuite et a été l'opportunité d'évaluer la tolérance vis-à-vis de la rouille jaune, la septoriose et la fusariose. Les années 2 et 3 ont été consacrées à la mise en place d'essais rendement/protéines sur 238 génotypes.

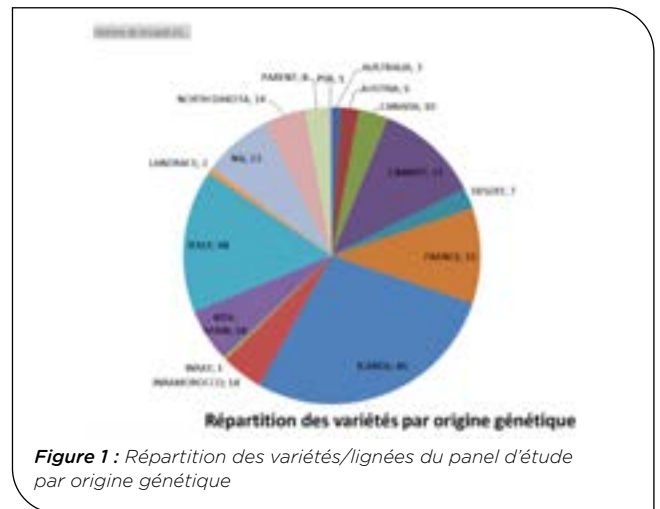


Figure 1 : Répartition des variétés/lignées du panel d'étude par origine génétique

Ainsi 8 essais ont été conduits (Tableau 1). Les sites RAGT (Montbartier,81), QUALPREST (Baignolet et Sancheville, 28) et SYNGENTA (Argelato, Nord Italie) ont été conduits en pluvial et en fertilisation azotée optimale, alors que dans les sites INRAE (Mauguio, 34) et ARVALIS (Gréoux-les-Bains, 04) qui sont des sites naturellement séchant, une modalité irriguée et une modalité pluviale ont été conduites. Deux répétitions ont été implantées dans chaque essai ainsi que 4 à 6 témoins de précocité.

	2016 -2017	2017 -2018	2017 -2018
<b>RAGT</b>	Multiplication : Rouille jaune et Septoriose	Rdt / Prot	Rdt / Prot
<b>Limagrain / QUALPREST</b>	Rouille jaune	Rdt / Prot	Rdt / Prot
<b>INRAE</b>			Rdt / Prot
<b>SYNGENTA</b>	Fusariose	Rdt / Prot	Rdt / Prot
<b>ARVALIS</b>			Rdt / Prot

Tableau 1. Récapitulatif des essais conduits sur le panel

Les notations réalisées sur chacun des sites sont: Rendement (GY), PMG (TKW), Poids spécifique (PS), Teneur en protéines (GPC), Indice de sédimentation SDS, Gluten Index et humide (WG), Mitadin (Yellow-Berry), Moucheture (Black-point), Hauteur, Epiaison (Z55). Spécifiquement, un suivi NDVI a été conduit sur les essais INRAE (Greenseeker), ARVALIS (Phénomobile) et SYNGENTA (Greenseeker). La teneur en protéines a été mesurée par l'INRAE par infrarouge pour tous les essais sauf pour celui d'ARVALIS 2019 pour lequel les échantillons ont été analysés par le laboratoire AUREA. Les taux de mitadin et moucheture ont été mesurés par SYNGENTA en Italie, le SDS et les mesures sur le Gluten par RAGT à Montbartier.

### ► Caractérisation des environnements

Afin d'identifier le type de stress subit dans chacun des sites, le modèle CHN (ARVALIS) a été utilisé. Les données météorologiques, les données sol (texture, réserve utile), de stades phénologiques, d'itinéraire cultural des essais ont été utilisées comme paramètres d'entrées du modèle afin de calculer des indices de stress hydriques et azotés tout au long du cycle de la culture.

## ► Méthode d'évaluation des essais, du réseau et calcul du GPD

Pour calculer une moyenne par variété dans le réseau d'essai, différentes étapes se sont succédé : 1 - Calcul des moyennes ajustées par essai ; 2 - Calcul du GPD par essai ; 3 - Calcul de moyennes ajustées sur le réseau.

### 1 - Calcul des moyennes ajustées par essai

Les sites d'ARVALIS, RAGT, QUALPREST sont des dispositifs en bloc complet, bloc incomplet pour l'INRAe (un bloc avec 40 % des variétés). Par ailleurs, nous disposons des informations sur les caractéristiques du terrain notamment la réserve utile de chacune des microparcelles pour le site de Gréoux-les-bains. La réserve utile (RU) peut avoir un impact sur certains caractères tel que le rendement ou le taux de protéines. La sélection du meilleur modèle (avec ou sans RU) est basée sur le critère d'information d'Akaike ou AIC.

Le modèle testé est :

$$Y(ij) = g(i) + rep(j) + \varepsilon(ij)$$

avec  $i$ , l'indice des variétés et  $j$ , l'indice des répétitions.  $g(i)$  effet fixe du génome et  $rep(j)$  effet aléatoire des répétitions, avec ou sans la RU en effet fixe.

Le plan expérimental mis en place par Syngenta est un faux lattice carré ce qui implique la création d'un modèle sur mesure pour cet essai.

Le modèle utilisé est :

$$Y(ijkl) = g(i) + rep(j) + gp(k) + rep \times gp(jk) + rep \times gp \times incbloc(jkl) + \varepsilon(ijkl)$$

avec  $g$  l'effet fixe du génotype,  $rep$  l'effet fixe de la répétition,  $gp$  l'effet fixe du sous-bloc,  $rep \times gp$  l'interaction entre la répétition et le sous-bloc et enfin un effet aléatoire  $rep \times gp \times incbloc$  avec « incbloc » qui représente l'effet de chaque colonne dans la répétition.

Tous les caractères pour lesquels les postulats de normalité des erreurs et d'homoscédasticité ne sont pas vérifiés pour réaliser l'analyse de variance, ne sont pas pris en compte dans l'analyse. Des moyennes ajustées sont ainsi calculées sur chacun des traits par essais.

### 2 - Calcul du GPD par essai

Pour calculer le GPD, la méthode de Oury *et al.*, 2007 a été utilisée. Cette méthode itérative permet de limiter l'effet de levier de certaines observations sur le calcul des paramètres de la droite de régression. Elle consiste à ajuster une droite de régression puis à mettre de côté les observations dont la valeur absolue des résidus standardisés est supérieure à seuil (ici, 1.96). Ces étapes sont répétées jusqu'à ce qu'aucun point ne présente un résidu standardisé supérieur au seuil. Les paramètres de la droite de régression sont alors déterminés et les résidus (GPD) sont calculés pour l'ensemble des observations.

### 3 - Calcul des moyennes ajustées sur le réseau

Un modèle mixte a été utilisé avec en effet fixe le génotype et en effet aléatoire un effet essai, selon la formule :

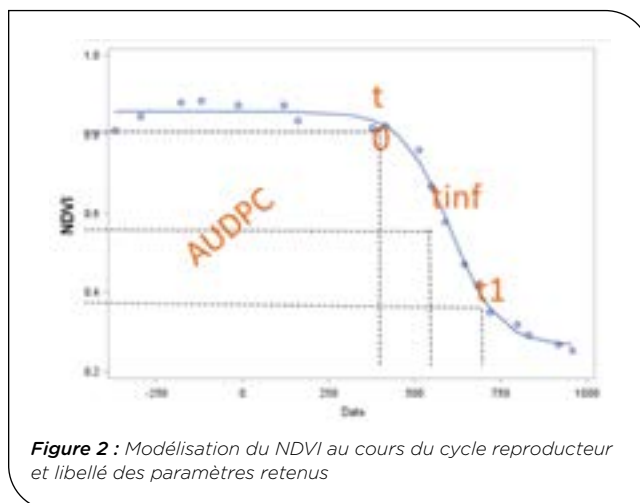
$$Y(ij) = g(i) + essai(j) + e$$

Une valeur par variété a ainsi été obtenue.

## ► Modélisation des données NDVI

Les données NDVI acquises par l'INRAe sont utilisées pour ajuster une courbe logistique afin d'en extraire les

paramètres indiqués sur la figure 2. Le paramètre  $t_0$  est la valeur de NDVI au début de la sénescence,  $t_1$  la valeur de NDVI à maturité et  $t_{inf}$ , le point d'inflexion entre ces 2 bornes.



Les données NDVI acquises par Arvalis sont modélisées avec une courbe double logistique afin de prendre en compte la montaison.

## ► Génotypage du panel d'étude

Le panel a été génotypé à l'aide de la puce TaBW420K développée dans le cadre du projet français Breedwheat (Rimbert *et al.*, 2018). Une petite partie du panel a été génotypée avec la puce TaBW35K issue de la 420K puis imputée avec le logiciel BEAGLE. Une matrice d'apparentement a été calculée et utilisée dans le modèle de génétique d'association (Yu *et al.*, 2006). Les marqueurs utilisés en génétique d'association ont été sélectionnés de manière à ne garder que les plus informatifs, ce qui a conduit à éliminer : les marqueurs avec une MAF (« minor allele frequency ») inférieure à 5 %, les marqueurs avec un taux d'hétérozygotie supérieur à 20 % (Turner *et al.*, 2017) (Edae *et al.*, 2014). Ainsi, un set de 68 093 SNPs a été sélectionné.

## ► Analyse d'association génétique (GWAS)

La procédure de GWAS utilisée est similaire à celle proposée par (Segura *et al.*, 2012). L'association génétique entre le GPD et les autres traits mesurés et les marqueurs SNP de la matrice finale est réalisée. Le modèle statistique Q+K a été utilisé :

$$Y = \mu + X\beta + S\tau + Zg + \varepsilon$$

Avec  $Y$  le vecteur des valeurs phénotypiques,  $\mu$  la moyenne générale,  $g$  un vecteur d'effets aléatoires de variance  $K\sigma^2$  (avec  $K$  la matrice d'apparentement des variétés),  $\tau$  l'effet du SNP testé en effet fixe,  $\beta$  l'effet du contraste entre les différentes populations constituant le panel et  $\varepsilon$  la variance résiduelle. Dans ce modèle  $X$ ,  $Z$  et  $S$  sont des matrices de contrastes pour les composantes respectives du modèle.

Le seuil de significativité utilisé usuellement est calculé sur la méthode de correction de Bonferroni soit  $-\log_{10}(0.05 / 68\,093) = 6$  qui est très stringente notamment sur les traits complexes étudiés dans ce projet, un seuil de 4 a donc été choisi comme cela a été fait par Rapp *et al.*, 2018. Les marqueurs SNP



significatifs pour chacun des traits ont été identifiés, de même que les QTL après l'analyse de déséquilibre de liaison (LD) entre marqueurs significatifs pour le même trait. Les effets et les proportions de variances expliquées des meilleurs QTL ont été estimés.

### ► Prédiction génomique (GS) des traits étudiés

Pour inclure et valoriser l'effet de tous les QTL y compris les QTL à effet mineurs (expliquant une proportion faible de variance phénotypique), une approche de prédiction génomique a été utilisée à l'aide du package R BGLR (Bayesian Generalized Linear Regression) (Perez and De Los Campos, 2014). Différents modèles ont été comparés et le meilleur modèle a été identifié par validation croisée. Une validation croisée en 10 ensembles sans remplacement a été utilisée, où neuf des dix ensembles ont été utilisés comme jeu d'entraînement pour construire le modèle et estimer les effets de marqueurs pour prédire les GEBV (genomic estimated breeding values) du dixième ensemble. La précision de chaque modèle a été estimée comme la moyenne des valeurs de capacité de prédiction.

## 3 Résultats

### ► Réseau d'essai

Les essais pépinières de la campagne 2016-2017 conduits sur 300 génotypes ont permis, au-delà de multiplier les semences, de collecter des notations maladie.

Les pépinières Rouille jaune (Verneuil/Limagrain), Septoriose (Montbartier/RAGT) et Fusariose (Saint Sauveur/Syngenta) ont subi une forte pression maladie et les symptômes se sont bien développés.

À l'inverse, la pression rouille brune et jaune était très faible à Montbartier / RAGT.

La variabilité de notations sur le panel permet d'identifier des lignées potentiellement tolérantes, mais une évaluation supplémentaire permettrait de confirmer cette caractérisation.

Concernant les essais Rendement / Protéines, les données d'itinéraire cultural collectées sur l'ensemble des essais ont été rassemblées dans des bases de données après validation des valeurs individuelles (Tableau 2).

### ► Caractérisation des environnements

Les indices de stress en Azote et en Eau ont été calculés pour chacun des sites. Ainsi 3 scénarii de stress ont été identifiés :

- Pas de stress : Montbartier 2018, Argelato 2019, Greoux IRR 2019 ;
- Stress Hydrique à Floraison : Baignolet 2018, Argelato 2018, Gréoux SEC 2019, Montbartier 2019 ;
- Stress Hydrique dès Montaison : Mauguio IRR et SEC 2019 .

Un clustering des essais sur la base de la typologie de stress subi a été effectué mais n'a pas permis de mettre en évidence un effet sur la variation du rendement observé dans les essais. L'analyse est donc poursuivie à l'échelle du réseau complet.

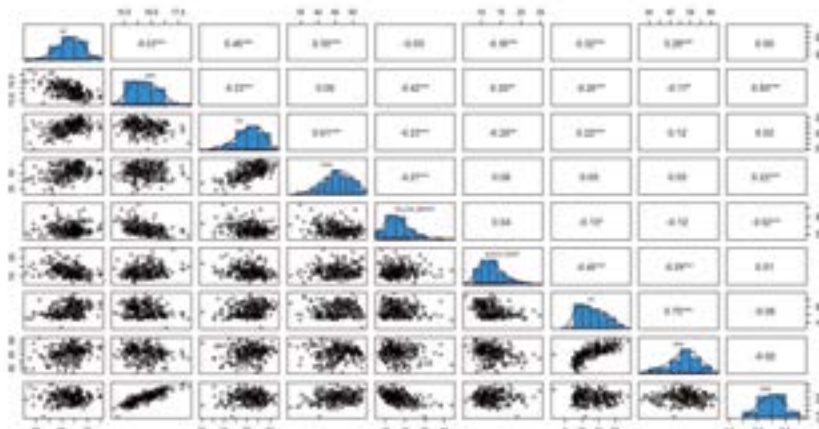
### ► Analyse du réseau d'essai

Selon les modèles d'analyse de variance décrits dans le matériels et méthodes, une moyenne ajustée a été calculée pour tous les traits mesurés pour l'ensemble du réseau d'essai. La corrélation négative rendement-protéines est significative avec un coefficient de 0,53 (Figure 3).

Récolte	Partenaire	Lieux	Semis	Parcelle récoltée (m²)	Fongicides	Pesticides	Fertilisation Azotée (U)	Irrigation (mm)
2018	Syngenta	Argelato	03/11/2017	6	oui	oui	260	0
2018	Qualprest	Baignolet	26/10/2017	13.6	oui	oui	246	35
2018	Ragt	Montbartier	26/10/2017	7.5	oui	oui	150	0
2019	Arvalis	greoux_irr	19/11/2018	11.88	oui	oui	250	210
2019	Arvalis	greoux_sec	19/11/2018	11.88	oui	oui	250	0
2019	Inrae	Mauguio_optimal	11/12/2018	5.6	oui	oui	240	60
2019	Inrae	Mauguio_limitant	11/12/2018	5.6	oui	oui	60	30
2019	Syngenta	Argelato	17/11/2018	6	oui	oui	130	0
2019	Qualprest	Sancheville	19/11/2018	13.6	oui	oui	246	35
2019	Ragt	Montbartier	29/10/2018	7.5	oui	oui	150.7	0

**Tableau 2.** Itinéraires culturaux des essais Rendement/Protéines du réseau

**Figure 3 :** Corrélation phénotypique entre le rendement (GY), la teneur en protéines (GPC), le GPD et les autres traits étudiés



Les traits GPD et GPC montrent une corrélation très significative et positive ( $R=0.85$ ). Il existe également une corrélation moyenne très significative et négative ( $R=-0.52$ ) entre la GPD et le mitadin.

Pour répondre aux objectifs du projet, il est important d'identifier les génotypes qui ont des performances intéressantes pour le rendement et la teneur en protéines conjointement. Pour cela, nous avons évalué la régression entre ces 2 traits (Figure 4).

Un seuil équivalent à 85 % du rendement du meilleur génotype a été appliqué et pour la teneur en protéines un seuil à 15.49 % correspondant à la variété témoin RGT Voilur a été utilisé. Les génotypes positionnés au-delà de ces seuils et de la droite de régression sont considérés comme GPD+ car elles présentent un taux de protéines significativement supérieur pour un niveau rendement donné. Ces variétés ont un taux de protéines supérieur de l'ordre de 0.5 à 0.75 points de protéines par rapport à la variété référence du moment, RGT Voilur. Parmi ces génotypes, six variétés appartiennent au groupe EPO, 10 sont des variétés élites inscrites en France et deux appartiennent au panel Unibo. Il n'existe pas vraiment de corrélation entre la nature des populations étudiées et leur écart à la relation « rendement-protéines ». On peut préciser toutefois que les lignées EPO présentent une variabilité plus importante des valeurs de GPD mais aussi les valeurs les plus élevées (Figure 5).

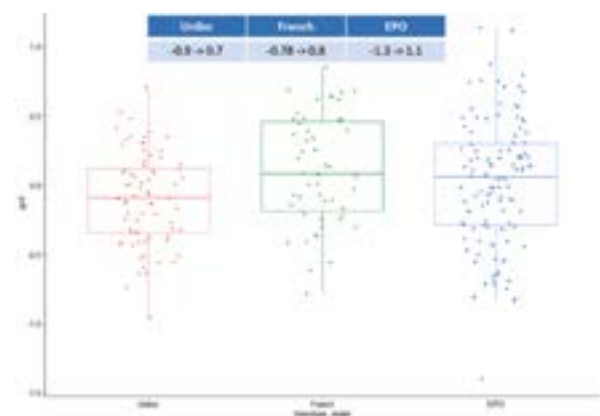
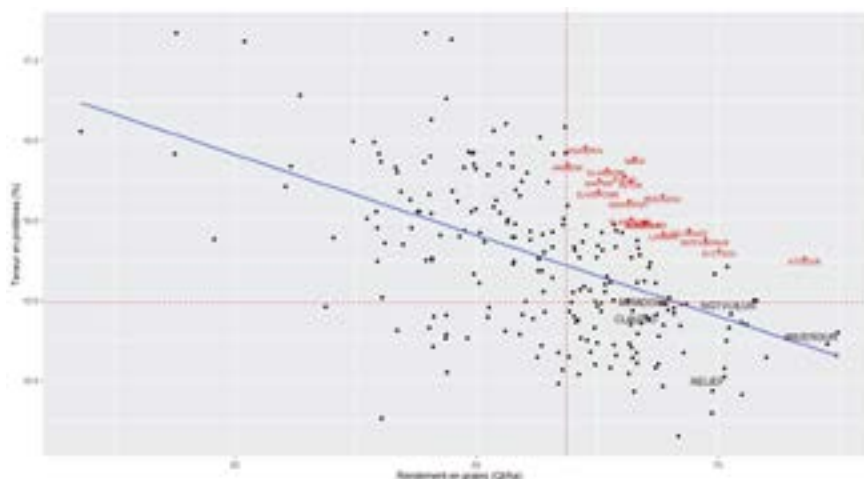
## ► Analyse de la sénescence

L'analyse de la sénescence des variétés a pu être réalisée par l'acquisition d'indices de l'évolution de la surface verte tout au long de la culture : Le site INRAe de Mauguio avec des acquisitions NDVI avec un greenseeker pour 16 dates à partir de Z55, sur les 2 modalités et le site ARVALIS de Gréoux-les-bains avec des acquisitions NDVI grâce à la Phénomobile pour 20 dates entre Z30 et maturité, sur les 2 modalités.

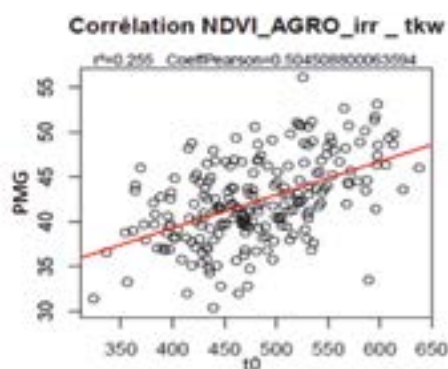
Concernant le site INRAe, les données ont été ajustées à l'aide d'une fonction logistique pour en extraire différents paramètres. Des corrélations entre les valeurs de ces paramètres et les variables agronomiques ont été calculées. Elles sont nulles avec le GPD quel que soit le paramètre de la courbe étudiée mais certaines sont intéressantes avec le PMG par exemple, c'est le cas pour deux points, l'un correspondant au maximum de surface verte ( $t_0$ ) et l'autre au début d'inflexion ( $t_{inf}$ ) pour la modalité irriguée (Figure 6). En d'autres termes, une variété qui maintient un appareil végétatif vert le plus longtemps possible favorise le remplissage de ses grains. Pour la modalité stressée, les corrélations sont quasi inexistantes pour tous les paramètres et les traits agronomiques.

Concernant le site de Gréoux-les-bains, un ajustement de courbe double-logistique a été réalisé. Différents paramètres ont été extraits de ces courbes et mis en relation avec les variables agronomiques mesurés sur l'essai.

**Figure 4 :** Régression Rendement/Teneur en protéines calculée sur l'ensemble des variétés du panel. En noir, variétés françaises de référence actuelles. En rouge, les variétés GPD+.

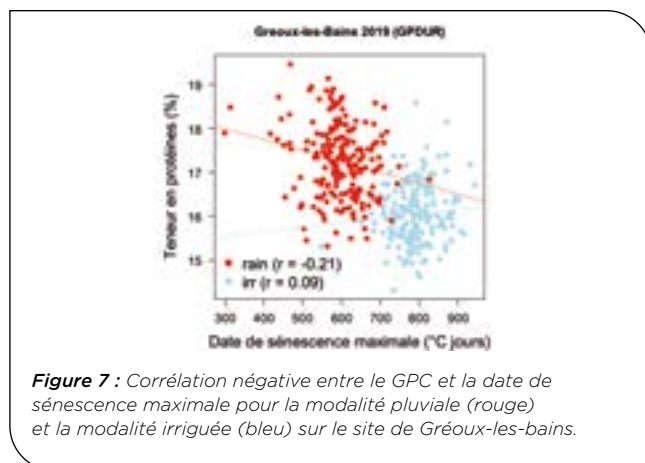


**Figure 5 :** Variation des valeurs de GPD par origine génétique



**Figure 6 :** Corrélation entre le PMG et NDVI au temps  $t_0$  de maximum de surface verte pour la modalité irriguée sur le site INRAe de Mauguio.

Une relation négative significative a été identifiée entre la date de sénescence maximale et la teneur en protéines en condition de stress hydrique (Figure 7). Cela pourrait traduire que des variétés ayant une sénescence précoce ont tendance à favoriser l'accumulation de protéines.



**Figure 7 :** Corrélation négative entre le GPC et la date de sénescence maximale pour la modalité pluviale (rouge) et la modalité irriguée (bleu) sur le site de Gréoux-les-bains.

### ► Génétique d'association

Au total, 12 QTL ont été identifiés pour quatre traits parmi les onze étudiés. Pour le trait "Hauteur de la plante", 1 QTL (CFN2441455) identifié sur le chromosome 4B avec un LOD de 12.2 expliquant une variance phénotypique de 19 % a été identifié. Neuf QTL ont été identifiés pour le SDS sur les chromosomes 1A, 1B, 2B, 4A, 5B et 6B avec un LOD allant de 7.45 à 14.46 pour une variance phénotypique expliquée de près de 15 %. Un QTL a été identifié respectivement pour le PMG (CFN1520694 ; chr. 2A) et le Mitadin (CFN0559919 ; chr. 1B) avec un LOD de 10 et 6.1 pour une variance phénotypique expliquée respectivement de 21 % et 15 %. Pour les sept autres traits y compris le GY, GPD, GPC et Z<sub>55</sub>, aucun QTL n'a été identifié (Figure 8).

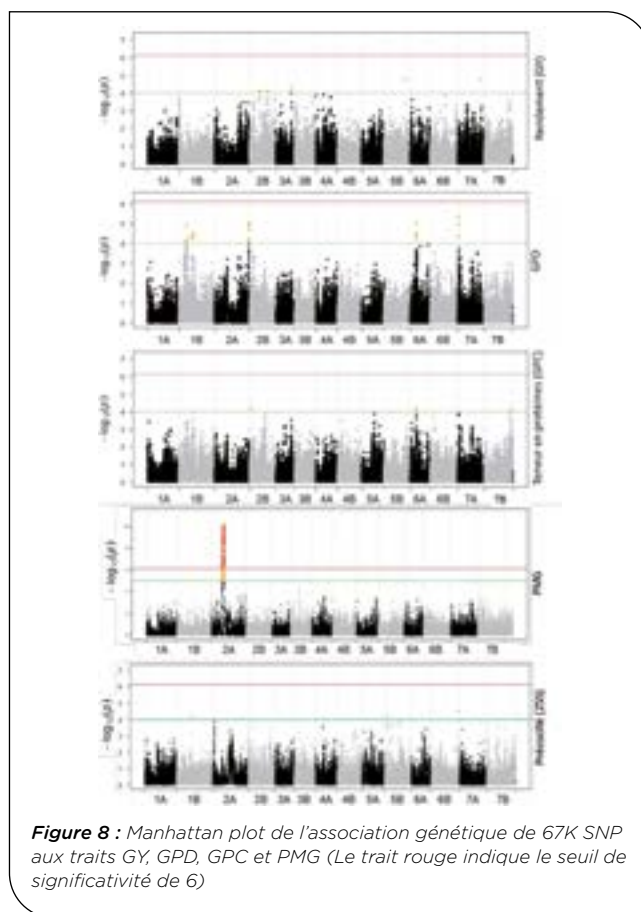
Au seuil de 4, de 3 à 26 QTL sont obtenus pour les traits étudiés. Quatre QTL sont obtenus pour le GPD avec des LOD de 4,91 à 5.33 sur les chromosomes 1B, 2A, 6A et 7A. Trois QTL pour le GPC et 5 pour le GY sont également obtenus. Un QTL associé à un seuil de 4.3 pour Z<sub>55</sub> sur le chromosome 2A (CFN0378505) colocalise avec le QTL majeur connu *Ppd-A1*.

L'effet allélique du meilleur QTL (LOD >4) estimé pour les traits étudiés, comme pour le GY, GPD, GPC, PMG et Z<sub>55</sub> (Figure 9) permet d'identifier pour ces QTL les allèles favorables au trait (à l'exception du GPC). En effet pour le PMG par exemple, il y a une différence significative entre les états alléliques A et G, avec l'allèle A en faveur des meilleurs poids de mille grains ( $46.4 \pm 3.45$  contre  $40.3 \pm 3.31$  pour le génotype GG).

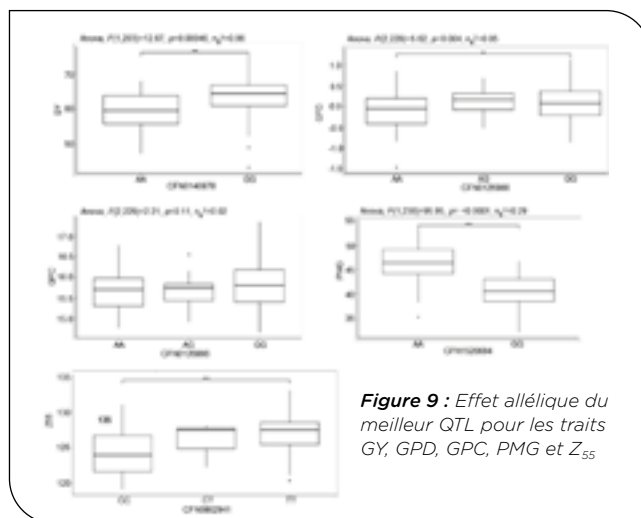
### ► Prédiction génomique

Les QTL identifiés au seuil de 4 ont été utilisés en effet fixe pour les 2 modèles l'incluant (QTL et GBLUP-QTL). La prédiction génomique des traits étudiés révèle des capacités prédictives moyennes comprises entre 0.61 et 0.78 avec le modèle GBLUP-QTL (Tableau 3).

L'intégration des marqueurs génétiques dans le modèle de prédiction génomique améliore ainsi les capacités prédictives pour tous les traits (Tableau 3).



**Figure 8 :** Manhattan plot de l'association génétique de 67K SNP aux traits GY, GPD, GPC et PMG (Le trait rouge indique le seuil de significativité de 6)



**Figure 9 :** Effet allélique du meilleur QTL pour les traits GY, GPD, GPC, PMG et Z<sub>55</sub>

Trait	$r_{(QTL)}$	$r_{(GBLUP)}$	$r_{(QTL+GBLUP)}$
Moucheture	0.44	0.43	0.61
Teneur en protéines (GPC)	0.21	0.52	0.63
GPD	0.34	0.45	0.63
Rendement (GY)	0.32	0.56	0.61
Hauteur	0.48	0.23	0.48
Poids spécifique (PS)	0.40	0.71	0.77
SDS	0.50	0.49	0.65
Poids de mille grains (PMG)	0.51	0.68	0.75
Gluten humide	0.60	0.46	0.64
Mitadin	0.55	0.37	0.63
Précocité (Z <sub>55</sub> )	0.62	0.72	0.78

**Tableau 3.** Capacité prédictive ( $r$ ) du GPD et des dix autres traits étudiés. Trois modèles QTL, GBLUP et QTL-GBLUP ont été testés.



## 4 Discussion

Cette étude avait pour objectif d'identifier de la variabilité génétique pour le caractère GPD pour l'amélioration conjointe du rendement et de la teneur en protéines du blé dur dans les programmes de sélection. Un panel constitué de génotypes de trois origines différentes (EPO, French et Unibo) a été évalué dans des environnements optimaux et sous stress hydrique sur 3 années et 5 sites (France et Italie), soit un total de 8 essais.

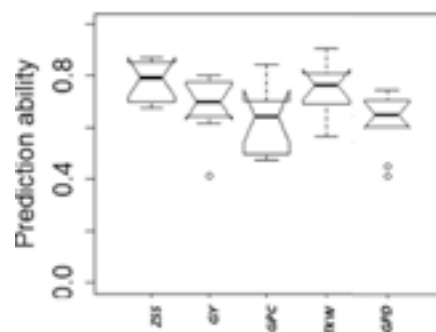
La mise en place du réseau d'essai a permis de générer des données suffisantes pour caractériser le GPD des variétés. Cette étude met en évidence que la sélection française est déjà efficace sur ce critère et qu'il reste compliqué d'identifier des géniteurs marquants pour ce caractère. Néanmoins les lignées EPO, parce qu'elles disposent d'un fond génétique ancestral et sûrement plus diversifié que celui des variétés inscrites, peuvent présenter un réel potentiel vis-à-vis de l'équilibre entre métabolismes azoté et carboné. Cela représente une source de variabilité génétique intéressante à intégrer dans les programmes de sélection.

Une étude complémentaire est nécessaire pour décortiquer les processus physiologiques qui sous-tendent la capacité de certains génotypes à mieux valoriser l'azote disponible sans pénaliser le métabolisme carboné. Le jeu de données généré dans le cadre de ce projet ne permet pas notamment de valider l'hypothèse de l'influence de l'azote absorbé post-floraison sur la GPD démontrée sur blé tendre.

Le choix de constituer un panel d'association diversifié de 300 accessions à partir de différentes origines génétiques (notamment EPO versus Unibo et French) est donc intéressant, mais peut par ailleurs générer quelques contraintes de structuration au sein du panel. Il a été nécessaire de prendre en compte cet effet de structuration et donc d'adapter le modèle d'analyse d'association génétique. Avec notre jeu de données, aucun QTL n'a été identifié pour le GPD pour le seuil de significativité de 6. Quatre QTL au seuil de LOD de 4 ont par ailleurs été trouvés et faiblement associés au trait GPD ; avec un LOD compris entre 4.9 et 5.33 sur les chromosomes 1B, 2A, 6A et 7A. Ce type de résultats a été déjà mentionné dans de précédentes études : Nigro *et al.* (2019) n'ont pu identifier que 4 QTL avec des associations faibles (entre 3 et 5.9) sur un panel de 240 accessions de blé dur évalué dans 7 environnements ; Rapp *et al.* (2018) quant à eux sur deux panels de 189 et 159 génotypes ont pu identifier respectivement 6 QTL sur cinq chromosomes (5A, 5B, 6A, 6B et 7A) et 5 QTL sur 4 chromosomes (2A, 3B, 4A et 7A). Ces résultats sont un peu attendus étant donné que les traits dérivés (ou secondaires) de traits primaires comme le GPD montrent généralement un pouvoir de détection de QTL plus faible. D'autres études ont signalé ce type de résultats sur d'autres traits dérivés (Rapp *et al.* 2018) ou encore sur d'autres cultures comme le maïs (Wang *et al.* 2012). Cependant pour les 4 QTL concernant la GPD, une proportion de variance phénotypique expliquée pouvant aller jusqu'à 11 % chacun ( $R^2$  compris entre 8.5 et 10.6) est observée, avec un effet de substitution d'allèles positif sur le GPD (allant de 0.15 à 0.29).

Au seuil de LOD de 4, 3 QTL ont été identifiés pour le GPC parmi lesquels le QTL CFN0126866 (6A) détecté également pour le GPD. Ce QTL explique une variance phénotypique de 7.4 % pour le GPC et 10.6 % pour le GPD avec un effet allélique positif sur les deux traits, ce qui implique qu'il pourrait augmenter le GPC sans effet négatif sur le rendement. Pour ce même QTL il y a une différence significative entre les états alléliques A et G (allèle G en faveur du GPD +) ; il existe une différence non significative entre la forme hétérozygote AG (allèle avec un effet meilleur que l'allèle G) et A et G. Les variétés French présentent une fréquence allélique proche des EPO pour l'allèle G (44 % contre 50 %) mais une fréquence allélique pour AG nettement meilleure que les EPO (38 % contre 1 %). Des observations similaires sont également faites par exemple pour le PMG (QTL CFN1445884) et d'autres traits. Ce qui confirme que les variétés françaises sont déjà assez efficaces sur le GPD, mais également sur d'autres traits analysés. Toutefois, la taille des sous-panel d'origine pourrait induire un biais d'interprétation étant donné que le sous-panel EPO est surreprésenté dans le panel d'étude.

Enfin, nous avons évalué un autre moyen de valoriser ces QTL à effets faibles. La prédiction génomique du GPD donne une valeur de capacité prédictive moyenne de 0.63 ; (Figure 10).



**Figure 10 :** Boxplots montrant les capacités de prédictions génomiques après validations croisées en 10 ensembles du modèle BGLR+QTL

Un niveau suffisamment intéressant pour son utilisation par les sélectionneurs pour une évaluation génétique précoce des jeunes plants dans les programmes de sélection. Pour les autres traits, les capacités prédictives plus élevées ( $> 0.75$ ) ont été obtenues par exemple pour le PMG, la précocité et le poids spécifique, montrant une plus forte capacité prédictive.

Ces valeurs de capacités prédictives obtenues restent toutefois à affiner par l'utilisation de jeux de données complémentaires pour la calibration ou la validation des modèles.

## Annexe

Marqueurs significatifs ( $LOD \geq 4$ ) obtenus par l'association marqueur-trait pour le GPD et dix autres traits (modèle MLMM + K + Q) sur une collection de blé dur.

Chr. Chromosome ; LOD :  $-\log_{10}(p\text{-value de l'association génétique})$  ;  $R^2$  (%) : Proportion de la variance phénotypique expliquée par le QTL ;  $\alpha$ -effect : effet de la substitution d'allèle du QTL sur le trait.

Trait	Markers	Chr.	Position physique (bp)	Alleles	LOD	R2	$\alpha$ -effect
Moucheture	CFN0600943	2A	5 692 141	G/T	4.38	0.07	-1.79
	CFN0736436	4A	24 825 935	C/T	4.03	0.06	-0.78
	CFN0768832	5A	706 492 258	C/T	4.03	0.09	-0.95
	CFN0384675	5B	598 154 425	A/G	4.06	0.07	-1.74
	CFN3365544	7A	68 853 295	T/C	4.25	0.08	-2.02
	CFN0886687	7A	689 946 443	T/C	4.45	0.07	-1.55
GPC	CFN0146921	2B	17 891 360	G/A	4.15	0.07	0.13
	CFN0126866	6A	35 352 128	G/A	4.16	0.07	0.17
	CFN0925222	7B	736 139 240	C/T	4.05	0.05	-0.20
GPD	CFN0166791	1B	231 665 909	T/A	4.91	0.11	0.29
	CFN1414835	2A	775 368 565	A/G	5.00	0.08	0.14
	CFN0126866	6A	35 352 128	G/A	5.03	0.11	0.16
	CFN0398866	7A	13 550 455	T/C	5.33	0.10	0.28
GY	CFN0630403	2B	161 418 539	G/T	4.12	0.05	2.77
	BOBWHITEC 18540351	2B	682 848 604	A/G	4.07	0.07	1.38
	CFN0140878	3A	700 901 902	A/G	4.32	0.08	2.30
	CFN2082330	3B	760 594 177	C/G	4.25	0.05	2.54
	RAC875REPC 91630132	5B	622 555 946	A/G	4.81	0.07	1.61
	CFN0885410	7A	699 297 937	A/C	4.81	0.07	2.64
Hauteur	CFN0639167	2B	175 458 307	C/T	4.45	0.08	-4.70
	CFN2281473	4A	720 135 097	C/G	4.92	0.07	-3.49
	CFN2242431	4A	723 732 515	G/A	4.49	0.07	-2.07
	CFN0219360	4B	28 739 411	C/G	4.17	0.07	-3.12
	CFN2441455	4B	31 123 857	C/T	12.22	0.19	-5.67
	CFN2427933	4B	36 158 061	C/T	4.23	0.07	-2.44
	CFN2510590	5A	567 889 764	A/G	4.41	0.07	-2.90
	CFN0220091	5A	588 751 574	G/A	4.14	0.07	-3.41
	CFN0825318	6A	608 117 162	G/C	4.11	0.06	-3.15
	CFN0859003	6B	662 028 930	T/A	4.08	0.07	-4.88
	CFN0102075	7B	33 797 593	T/C	4.42	0.07	-3.47
	CFN3533081	7B	120 394 333	G/A	4.50	0.06	1.88
	CFN0917559	7B	639 278 318	T/C	4.35	0.06	-2.37
PS	CFN0539874	1B	675 765 706	C/A	4.31	0.06	-0.67
	CFN1192478	1B	678 235 993	G/A	5.52	0.06	-0.62
	CFN0542607	1B	678 319 040	C/G	4.88	0.05	-0.82
	CFN0534696	1B	687 071 879	T/C	5.70	0.07	0.58
	CFN0602122	2A	82 130 364	C/T	4.00	0.05	0.57
	CFN0636494	2B	133 019 317	T/C	4.28	0.05	0.53
	CFN0609085	2B	742 172 008	A/G	4.81	0.05	-0.67
	CFN0614490	2B	751 314 123	G/C	4.47	0.04	-0.73
	CFN0530094	1A	2 476 089	C/T	4.45	0.08	2.16
SDS	CONTIG24763566						
	BS00085346	1A	7 184 769	A/T	7.45	0.14	4.06
	CFN0500149	1A	534 544 595	T/C	4.00	0.08	2.68
	CFN0354778	1B	730 263	C/T	4.55	0.08	3.26
	CFN0550291	1B	5 054 319	T/C	11.72	0.15	5.12
	CFN0338945	1B	6 791 669	T/C	14.46	0.28	4.78
	RAC875C636241002	1B	11 859 931	A/G	4.90	0.05	3.43
	IAAV2838	1B	41 642 534	A/G	5.21	0.11	2.52
	KUKRIC19181074	1B	548 968 557	A/G	4.46	0.07	-2.43
	CFN0292064	1B	553 545 277	C/A	4.78	0.07	-2.46
	CFN1137302	1B	554 581 714	T/C	8.16	0.14	2.96
	CFN1155111	1B	557 418 957	A/G	4.22	0.06	2.20
	CONTIG475478						
	1BS00037246	1B	668 200 656	A/C	4.70	0.06	4.01
	CFN0600533	2A	4 949 841	G/A	4.29	0.07	2.25
	CFN0426975	2B	2 532 314	G/A	4.44	0.05	2.26
	CFN1671235	2B	48 291 276	T/C	10.70	0.21	4.73
	CFN1630005	2B	647 614 398	T/G	5.59	0.08	4.43
	CFN2327938	4A	687 201 240	G/A	8.52	0.19	4.19
	CFN0803022	5B	641 027 197	A/T	10.68	0.21	4.73
	CFN2676300	5B	700 000 172	A/G	4.33	0.05	2.71
	CFN0845828	6A	13 735 202	C/G	4.14	0.05	3.82
	CFN0825310	6A	608 118 538	T/A	4.07	0.05	3.94
	CFN0869301	6B	19 056 495	T/G	4.50	0.05	-3.54
	CFN0294642	6B	22 107 347	T/C	5.39	0.09	-3.43
	CFN0874001	6B	22 231 683	T/G	6.69	0.08	-5.19
	CFN0294258	6B	28 059 431	A/G	7.43	0.11	5.93
PMG	CFN1520694	2A	149 394 582	G/A	9.99	0.21	2.64
	CFN0746355	4B	660 727 474	G/C	4.02	0.04	1.33
	CFN0332040	6A	554 567 996	G/A	4.07	0.06	-1.68
Gluten humide	CFN0515986	1A	592 312 894	T/A	4.04	0.05	-0.88
	CFN0364249	1B	555 237 630	A/C	5.13	0.09	-0.86
	CFN0533509	1B	615 126 866	T/G	4.88	0.09	0.84
	CFN0608940	2B	610 021 362	G/A	4.40	0.09	-0.87
	CFN0710183	3B	28 540 220	T/G	5.27	0.07	1.15
	CFN0735095	4A	710 412 088	A/T	4.40	0.08	1.11
	BOBWHITEC 2314684	7A	448 098 049	A/G	4.84	0.09	1.32
Mitadin	CFN0559919	1B	212 662 522	T/G	6.04	0.15	-4.50
	CFN0585285	2A	699 512 193	G/T	4.67	0.08	-4.50
	CFN1676428	2B	73 068 593	T/C	5.69	0.10	-3.55
	CFN0697901	3B	470 853 819	A/T	4.79	0.10	-3.57
	CFN0191527	7A	15 678 656	G/A	4.46	0.09	-4.02
	CFN0884952	7A	679 897 363	A/G	4.74	0.09	3.46
Z55	CFN0922193	7B	743 476 186	G/C	4.06	0.08	-1.95
	CFN0545134	1B	390 384 518	A/G	4.34	0.05	0.90
	CFN0378505	2A	36 691 989	A/G	4.28	0.05	-0.79
	CFN0816949	5B	23 367 796	C/G	4.57	0.06	-0.84
	CFN0862941	6B	712 270 064	C/T	4.56	0.09	0.85

## Références bibliographiques

- Bogard, M., Allard, V., ..., Gate P. Le Gouis, J.** (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*.
- Bogard, M.,..., Ravel, C., Le Gouis, J.** (2011). Anthesis date mainly explained correlations between post-anthesis leaf senescence, grain yield, and grain protein concentration in a winter wheat population segregating for flowering time QTLs, 1-16.
- Buckler, E.S.T. and J.M. Thornsberry,** Plant molecular diversity and applications to genomics. *Curr Opin Plant Biol*, 2002. 5(2): p. 107-11.
- Comar, A., Burger, P., de Solan, B., Baret, F., Daumard, F., & Hanocq, J. F.** (2012). A semi-automatic system for high throughput phenotyping wheat cultivars in-field conditions: description and first results. *Functional Plant Biology*.
- Cormier, F., Le Gouis, J., Dubreuil, P., Lafarge, S., & Praud, S.** (2014). A genome-wide identification of chromosomal regions determining nitrogen use efficiency components in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 127(12), 2679-2693.
- Cormier, F.** (2015). Nitrogen use efficiency in wheat in bread wheat : breeding & gene discovery (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II).
- David, J., Holtz Y., Ranwez V., ...,Tavaud-Pirra M.** (2014). Genotyping by sequencing transcriptomes in an evolutionary pre-breeding durum wheat population. *Molecular Breeding*, 34(4) :1531-1548.
- Gaju, O., Allard, V., Martre, P., Le Gouis, J., Moreau, D., Bogard, M., ... Foulkes, M. J.** (2013). Nitrogen partitioning and remobilization in relation to leaf senescence, grain yield and grain nitrogen concentration in wheat cultivars. *Field Crops Research*.
- 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 massive loss of nucleotide diversity since domestication. *Molecular biology and evolution* 24 (7):1506-1517.
- Kang, H. M. et al.** Variance component model to account for sample structure in genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 42, 348-54 (2010).
- Maccaferri, M., Sanguineti, M. C., ..., Tuberosa, R.** (2011). Association mapping in durum wheat grown across a broad range of water regimes. *Journal of experimental botany*, 62(2), 409-38.
- Maccaferri, M., Sanguineti, M. C., Mantovani, P., Czembor, J. H., Ezrati, S., & Tuberosa, R.** (2010). Association mapping of leaf rust response in durum wheat, 189-228.
- Maccaferri, M., Sanguineti, M. C., Natoli, V., Ortega, J. L. A., Salem, M. Ben, Bort, J., Tuberosa, R.** (2006). A panel of elite accessions of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) suitable for association mapping studies. *Plant Genetic Resources: characterization and utilization*, 4(1), 79-85.
- Maccaferri M, Sanguineti M.C., Noli E., R Tuberosa** 2005. Population structure and long-range linkage disequilibrium in a durum wheat elite collection. :*Molecular Breeding*
- Maccaferri, M., Ricci, A., Salvi, S., ..., Ammar, K.** (2015). A high-density, SNP-based consensus map of tetraploid wheat as a bridge to integrate durum and bread wheat genomics and breeding. *Plant biotechnology journal*, 13(5), 648-663.
- Mackay, I. and W. Powell,** Methods for linkage disequilibrium mapping in crops. *Trends Plant Sci*, 2007. 12(2): p. 57-63.
- Mangin, B., et al.,** Novel measures of linkage disequilibrium that correct the bias due to population structure and relatedness. *Heredity (Edinb)*, 2012. 108(3): p. 285-91.
- Nigro, D., Gadaleta, A., Mangini, G. et al.** (2019). Candidate genes and genome-wide association study of grain protein content and protein deviation in durum wheat. *Planta* 249, 1157-1175.
- Oury, F. X., & 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(1-2), 45-57.
- Perez P., de los Campos G.** (2014). Genome-wide regression and prediction with the BGLR statistical package. *Genetics*, 198(2) :483-495.
- Rapp, M., Lein, V., Lacoudre, F., Lafferty, J., Müller, E., Vida, G., Leiser, W.L.** (2018) Simultaneous improvement of grain yield and protein content in durum wheat by different phenotypic indices and genomic selection. *Theor Appl Genet* 131(6):1315-1329.
- Ratti, C. et al.** 2006. Reaction of 111 cultivars of *Triticum durum* Desf. from some the world's main genetic pools to soil-borne cereal mosaic virus. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 113(4), 145-149.
- Royo, C., Maccaferri, M., Álvaro, F., Moragues, M., Corinna, M., Tuberosa, R., ... Villegas, D.** (2010). Understanding the relationships between genetic and phenotypic structures of a collection of elite durum wheat accessions, 119, 91-105.
- Segura, V. et al.** An efficient multi-locus mixed-model approach for genome-wide association studies in structured populations. *Nat. Genet.* 44, 825-30 (2012).
- Taulemesse, F.** (2015). Analyse écophysiological et génétique de l'absorption d'azote post-floraison chez le blé tendre en relation avec la concentration en protéines des grains (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II).
- Thuillet, A.C., et al.,** Estimation of long-term effective population sizes through the history of durum wheat using microsatellite data. *Genetics*, 2005. 169(3): p. 1589-99.
- Vilmus, I., Ecarnot, M., Verzelen, N., & Roumet, P.** (2014). Monitoring Nitrogen Leaf Resorption Kinetics by Near-Infrared Spectroscopy during Grain Filling in Durum Wheat in Different Nitrogen Availability Conditions. *Crop Science*, 54(1), 284-296.
- Wang, S., Wong, D., ..., Mastrangelo, A. M.** (2014). Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90 000 single nucleotide polymorphism array. *Plant biotechnology journal*, 12(6), 787-796.
- Yu, J., et al.,** A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat Genet*, 2006. 38(2): p. 203-8.



# GPDUR : Génétique et Phénotypage du blé dur pour l'amélioration conjointe du rendement et de la teneur en protéines

Delphine HOURCADE<sup>1</sup>, Boris DEMENOU<sup>1</sup>, Damien EYBALIN<sup>1</sup>, Matthieu BOGARD<sup>1</sup>, Thierry LEFEVRE<sup>2</sup>, Marion CHAPUS<sup>3</sup>, Carine ANDRE<sup>3</sup>, Andrea MASSI<sup>3</sup>, Jacques DAVID<sup>4</sup>, Pierre ROUMET<sup>4</sup>, Céline DUQUE<sup>5</sup>

1 - ARVALIS - 6 Chemin de la Cote Vieille - 31450 Baziège

2 - RAGT 2n - 1740 Route du Canal - 82700 Montbartier

3 - SYNGENTA - 12 Chemin de l'Habit, 31790 Saint-Sauveur / Società Produttori Sementi S.p.A. Via Macero,

1 - 40050 Argelato (Bologna) - Italy

4 - INRAE - Bâtiment Arcad, 10 rue Arthur Young, 34090 Montpellier

5 - LIMAGRAIN Europe - Ferme de l'Etang - BP3-77390 Verneuil l'Etang

\*Coordinateur : Delphine HOURCADE, d.hourcade@arvalis.fr

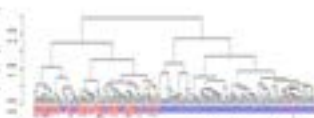
## Introduction :

Les exigences qualitatives des utilisateurs ont été à l'origine d'une structuration de la filière au sein de laquelle toutes les parties prenantes ont visé une production de haut niveau qualitatif, recherchant notamment de hauts niveaux de teneur en protéines. Malheureusement, la base génétique du matériel végétal cultivé en France, étroite, semble arriver à ses limites. Le taux de protéines est un critère majeur pour l'accès au marché, le progrès génétique en matière de rendement est de fait très réduit. Évaluer une plus large diversité dans les conditions de culture française, afin d'identifier des sources génétiques pouvant amener à rompre cette corrélation négative entre rendement et protéine semble donc essentiel. L'analyse de la GPD (Grain protein deviation) permet d'évaluer l'écart à la tendance globale de chaque variété à partir de la régression Rendement/Protéine. Il semble utile de mieux caractériser la diversité disponible aux sélectionneurs sur ce critère. Plusieurs sources de diversité étaient disponibles pour constituer un panel de diversité génétique élitée, adaptée ou rapidement adaptable aux conditions françaises : le panel de diversité élitée mondiale constitué par l'Université de Bologne et la population EPO (Evolutionary Pre-breeding Population) qui a été spécialement conçue dans le but d'intégrer un maximum de diversité élargie et originale par rapport au compartiment élitée du blé dur. Il est issu de 14 cycles de brassage avec un taux d'allopatie estimé de 20% d'inter-croisements d'une population composite fondée par l'introgession d'accessions entre les sous espèces de blé dur *T. turgidum* sp. ayant divergé avant l'apparition de la forme moderne de blé dur (*T. turgidum durum*) correspondant aux différentes étapes évolutives. Le panel sera complété par un choix de variétés élitées cultivées ou plus anciennes. L'ensemble de ces génotypes est phénotypé dans plusieurs sites, sur 3 ans puis génotypés pour être analysé avec des approches de génétique d'association et de prédiction génomique.

## Définition du panel

Différents critères ont permis de sélectionner les génotypes constituant le panel d'étude :

- Analyse de diversité basée sur les données de génotypage, puis sélection des génotypes représentant des groupes génétiques différents (Graphique 1).
- Précocité (variation de 20 jours maximum)
- Hauteur : gamme 60 à 100 cm
- Potentiel rendement
- Connaissance a priori GPD « ou GPD »



Graphique 1 : Classification hiérarchique de la population EPO (en bleu) et des variétés françaises (en rouge)

## Phénotypage du panel

Tableau 1 : Réseau d'essai du panel

Site	Environnement (Sécheresse)	Mois	Température	Humidité
2016-2017	Montbartier (France)	Septembre	18°C	70%
2017-2018	Argelato (Italie)	Septembre	22°C	65%
2018-2019	Verneuil (France)	Septembre	18°C	70%

La campagne 2016-2017 a été consacrée à la multiplication des semences (300 variétés) en pépinière et à été l'opportunité d'évaluer la tolérance aux maladies. Les campagnes 2017-2018 et 2018-2019 ont été consacrées à la mise en place de 8 essais Rendement/Protéines sur 235 variétés.

- Les sites RAGT (Montbartier, 81), QUALPREST (Baignolet et Sancherville, 28) et SYNGENTA (Argelato, Nord Italie) sont conduits en pluvial et fertilisation Azotée optimale
- Les sites INRAE (Mauquios, 34) et ARVALIS (Gréoux-les-Bains, 04) naturellement séchant, une modalité irriguée et une modalité pluviale sont conduites.
- 2 répétitions ont été implantées dans chaque essai ainsi que 4 à 6 témoins de précocité.
- Mesures : Rendement (GY), PMG (TKW), Poids spécifique, Teneur en protéines (GPC), Indice de sédimentation SDS, Gluten humide (WGL), Mitadin (Yellow-Berry), Moucheture (Black-point), Hauteur, Epilaison (ZSS). Spécifiquement, un suivi NDVI a été conduit sur les essais INRAE et Syngenta (Greenseeker) et ARVALIS (Phénomobile).

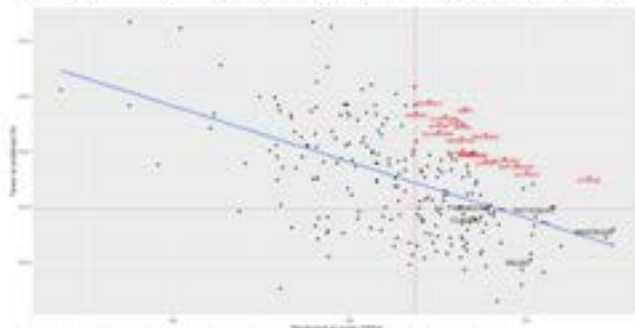
## Évaluation du critère GPD

Pour calculer le caractère GPD (grain protein deviation), une méthode itérative est utilisée afin de neutraliser l'effet des valeurs aberrantes sur la pente de la relation rendement-taux en protéines. À la fin, on obtient la régression linéaire qui explique le plus d'observations, on peut calculer les résidus de tous les individus.

Afin d'avoir des données moyennées à l'échelle du réseau d'essai, un modèle mixte a été utilisé avec en effet fixe le génotype et en effet aléatoire chaque essai, selon la formule :

$Y(i) = \mu + \alpha(i) + \epsilon(i)$  Une valeur par variété et pour tout le réseau est ainsi obtenue.

Pour identifier les génotypes qui s'écarteraient significativement de la régression globale, un seuil est fixé à 15% du meilleur rendement, à la teneur en protéine du meilleur témoin et GPD>0.5.



Graphique 2 : Régression Rendement/Teneur en protéine à l'échelle du réseau d'essai

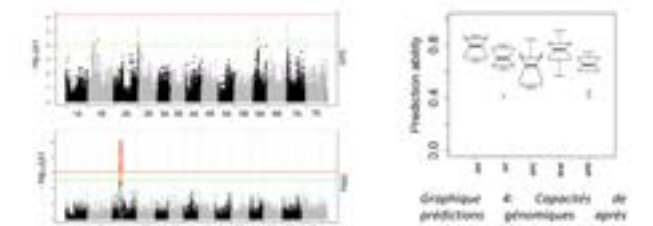
Sur le graphique 2, les génotypes positionnés au-delà de ces seuils et de la droite de régression sont considérés comme GPD+, car elles présentent un taux de protéines significativement supérieur pour un niveau rendement donné. Ces variétés ont un taux de protéines supérieur de l'ordre de 0.5 à 0.75 points de protéines par rapport à la variété référence du moment, RGT Volcan. Parmi ces génotypes, 6 variétés appartiennent au groupe EPO, 10 sont des variétés élitées inscrites en France et 2 appartiennent au panel Umbo. Il n'existe pas vraiment de corrélation entre la nature des populations étudiées et leur écart à la relation « rendement-protéines ». On peut préciser toutefois que les lignées EPO présentent une variabilité plus importante des valeurs de GPD mais aussi les valeurs les plus élevées.

## Génétique d'association et prédiction génomique

Le panel a été génotypé à l'aide de la puce TaBW420K développée dans le cadre du projet français Bredwheat. Le set de 124923 marqueurs de départ est filtré selon plusieurs critères (MAF (« minor allele frequency ») < 5%, taux d'hétérozygotie > 20%). La matrice finale contient 68093 SNPs. La procédure de GWAS utilisée est similaire à celle proposée par [Segura et al., 2012]. Le modèle statistique Q+K a été utilisé prenant en compte la matrice de Kinship et l'appartenance à l'une des 3 origines génétiques.

Le seuil de significativité utilisé usuellement est calculé sur la méthode de correction de Bonferroni soit  $-\log_{10}(0.05 / 68\ 093) = 6$  mais il est très strictement notamment sur les traits complexes étudiés dans ce projet. Par conséquent, un seuil de 4 est communément choisi pour GY, GPD et GPC.

Au total, 12 QTL sont identifiés pour quatre traits parmi les onze étudiés. Pour le trait "Hauteur de la plante", 1 QTL (CFN2441455) détecté sur le chromosome 4B avec un LOD de 12.2 expliquant une variance phénotypique de 19%. Neuf QTL sont identifiés pour le SDS sur les chromosomes 1A, 1B, 2B, 4A, 5B et 6B avec un LOD allant de 7.45 à 14.46 pour une variance phénotypique expliquée de près de 15%. Un QTL est identifié respectivement pour le PMG (CFN1520694, chr. 2A; Graphique 3) et le Mitadin (CFN0559959 ; chr. 1B) avec un LOD de 10 et 6.1 pour une variance phénotypique expliquée respectivement de 21% et 15%.



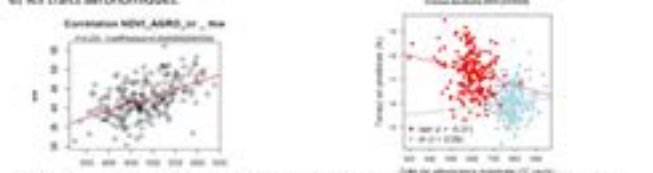
Graphique 3 : Manhattan plots issus des analyses de génétique d'association sur les traits GPD et PMG

Pour un seuil de LOD de 4, de 3 à 26 QTL sont observés. Quatre QTL sont obtenus pour le GPD avec des LOD de 4.95 à 5.33 sur les chromosomes 1B, 2A, 6A et 7A (Graphique 3). Trois QTL pour le GPC et 5 pour le GY sont également obtenus. Le QTL CFN0126866 (6A) est détecté pour le GPC et le GPD ; avec une variance phénotypique expliquée de 7.4% et 10% respectivement, et un effet allélique positif sur les deux traits, impliquant qu'il pourrait augmenter le GPC sans effet négatif sur le rendement. Un QTL associé à un seuil de 4.3 pour ZSS sur le chromosome 2A colocalise avec un QTL majeur de précocité connu Ppd-A1.

Un autre moyen de valoriser ces QTL à effet faible a été évalué. La prédiction génomique du GPD donne une valeur de capacité prédictive moyenne de 0.63 (Graphique 4) et montre que l'intégration des marqueurs génétiques améliore ces capacités. Cette valeur prédiction du GPD est suffisamment intéressante pour son utilisation par les sélectionneurs dans les programmes de sélection.

## Phénotypage haut débit

Concernant le site INRAE, une analyse d'ajustement de courbe logistique a été réalisée par l'INRAE sur les données NDVI pour en extraire différents paramètres. Des corrélations entre les valeurs de ces paramètres et les variables agronomiques ont été calculées. Elles sont nulles avec le PMG qui est le paramètre de la courbe étudiée mais certaines sont intéressantes avec le PMG par exemple, c'est le cas pour 2 points, l'un correspondant au maximum de surface verte (M) et l'autre au début d'inflexion (Inf) pour la modalité irriguée (Graphique 5). En d'autres termes, une variété qui maintient un appareil végétatif vert le plus longtemps possible favorise le remplissage de ses grains. Pour la modalité stressée, les corrélations sont quasi inexistantes pour tous les paramètres et les traits agronomiques.



Graphique 5 : Relation linéaire entre les paramètres de courbes calculées sur les données NDVI et les traits agronomiques mesurés à Mauquios (INRAE) et Gréoux-les-Bains (Arvalis)

Concernant le site de Gréoux-les-Bains, un ajustement de courbe double-logistique est réalisé. Différents paramètres sont également extraits de ces courbes et sont mis en relation avec les variables agronomiques mesurées sur l'essai. Une relation négative significative existe entre la date de sénescence maximale et la teneur en protéines en condition de stress hydrique, traduisant qu'une sénescence précoce des variétés favorise une accumulation de protéines.

ARVALIS  
Institut du rendement

syngenta

INRAE

RAGT

Limagrain

# PROSYN : Apport des blés synthétiques à l'amélioration conjointe de la productivité, de la teneur en protéines et l'efficacité d'utilisation de l'azote

Jérémy DERORY<sup>1\*</sup>, Matthieu BOGARD<sup>2</sup>, Katia BEAUCHENE<sup>2</sup>, Philippe MOMONT<sup>3</sup>, Jacob LAGE<sup>3</sup>, Sebastien CAIVEAU<sup>4</sup>, Olga ZHADENOVA<sup>4</sup>, Phil HOWELL<sup>5</sup>, Céline DUQUE<sup>1</sup>, Constance LAVERGNE<sup>1</sup>

1 - Limagrain Europe - CS50005 St Beauzire 63360 GERZAT, France

2 - ARVALIS-Institut du végétal - 3 rue Marie & Joseph Hackin 75016 Paris, France

3 - KWS Momont - 7 rue de Martinval 59246 Mons en Pévèle, France

4 - Syngenta - 2 Avenue Gustave Eiffel CS 40346 28008 Chartres Cedex, France

5 - NIAB - Huntingdon Road CB3 0LE CAMBRIDGE, Royaume Uni

\*Coordinateur : Jérémy DERORY, jeremy.derory@limagrain.com

## 1 Introduction

La création variétale a été relativement efficace pour accroître les rendements pour le blé en Europe avec en moyenne un progrès génétique estimé à 1 % par an. Cependant on observe une stagnation des rendements due aux effets combinés du changement climatique et de l'utilisation raisonnée des intrants (Brisson *et al.*, 2010).

Chez le blé, les rendements observés sont fortement dépendants des niveaux d'azote, nécessaire au développement optimal de la plante et à l'obtention d'un niveau suffisant de protéines dans les grains à la récolte. En effet, les variétés modernes ont besoin en moyenne de 150 à 180 Kg N/ha pour produire 7 à 8 tonnes/ha de grains avec une teneur de 11 à 13 % de protéines (Agreste 2011 ; Dampney *et al.*, 2006 ; Hawkesford *et al.*, 2014). En France, une teneur minimum en protéines de réserves de 11 % est exigée pour l'exportation et la fourniture d'azote reste l'un des postes majeurs d'investissement énergétique des producteurs. Ce dernier est estimé à environ 25-30 % des charges opérationnelles d'une exploitation.

Pour la sélection, l'enjeu est double, il s'agit d'améliorer le rendement, tout en s'émancipant de la relation négative entre rendement et teneur en protéines des grains généralement observée pour les variétés modernes (Simmons, 1995 ; Krapp *et al.*, 2005). Une piste explorée dans le programme Anglais WISP (Moore 2015) consiste à élargir la base génétique disponible pour la création variétale en croisant des blés élités avec des populations de pays, des espèces apparentées et des blés synthétiques.

A ce jour, plus d'une centaine d'études scientifiques témoignent de l'intérêt des blés synthétiques. Les blés synthétiques ont ainsi permis l'identification de nombreux gènes de résistances pour des maladies et leur potentiel d'utilisation en création variétale a été abondamment décrit (Dreisigacker *et al.*, 2008 ; Mujeeb-Kazi *et al.*, 2008 ; Ogonnaya *et al.*, 2008 ; Plamenov and Spetsov, 2011). L'exploitation intensive de cette ressource dans des programmes de sélection conduits au CIMMYT, à l'ICARDA, mais aussi aux USA, en Australie et en Chine a conduit à une amélioration du rendement et de ses composantes, notamment dans des environnements avec des stress de forte

température, de sécheresse ou de salinité (Trethowan and Mujeeb-Kazi, 2008 ; Rattey *et al.*, 2011 ; Cooper *et al.*, 2012).

L'objectif du projet PROSYN est de caractériser la collection de lignées produites au NIAB en France et en Angleterre pour les caractères de rendement, d'efficacité d'utilisation de l'azote et de GPD (Grain Protein Deviation) mais aussi de tolérance aux maladies. Nous espérons ainsi identifier de nouvelles lignées et allèles favorables pour les caractères cibles du projet, exploitables dans les programmes de création variétale.

## 2 Matériel et méthode

### ► Le Matériel Végétal et les observations en pépinière

Le matériel végétal étudié dans PROSYN a été développé dans le cadre du projet anglais WISP, financé par le BBSRC. Dans ce vaste programme autour des ressources génétiques, il y avait trois sources de matériel :

- ✓ NIAB 'Synthétiques'
- ✓ JIC Land Races
- ✓ Nottingham Wild Parents

Le matériel synthétique auquel le projet PROSYN s'est intéressé a été produit par le NIAB dans le cadre de ces travaux sur les ressources génétiques en combinant soit des blés synthétiques issus du CIMMYT soit des blés tétraploïdes avec du matériel européen type hiver (Robigus) ou printemps (Paragon).

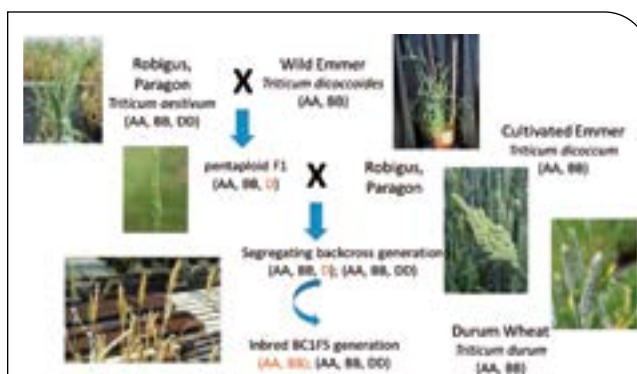


Figure 1 : Illustration d'un croisement entre blé tétraploïde et hexaploïde

La lignée récurrente Robigus a été choisie en raison de son utilisation très large dans le matériel de sélection au Royaume Uni. Robigus présente en effet un bon potentiel de rendement ainsi qu'un bon niveau de tolérance à la Septoriose ainsi qu'à la cécidomyie orange. De plus, Robigus ne présente pas de niveau élevé de nécrose hybride, ce qui en fait un bon géniteur pour des croisements avec des lignées synthétiques ou tétraploïdes. En revanche, la variété est très sensible à la rouille jaune ainsi qu'au mildiou et à la rouille brune.

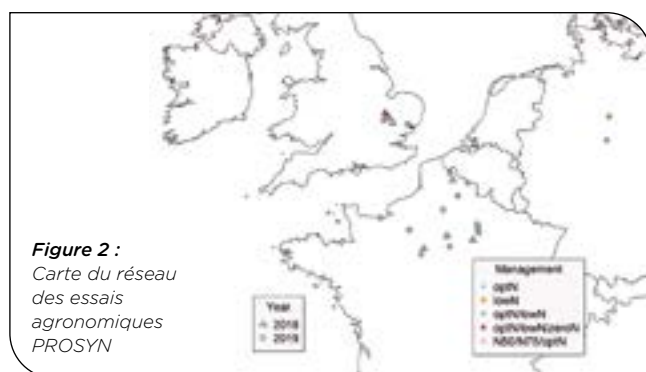
Préalablement au projet PROSYN, lors de la saison 2016, les lignées ont été cultivées en pépinière sous protection fongicide réduite ce qui a permis d'éliminer les plus susceptibles. La cible était de sélectionner 400 entrées pour le projet mais seules 231 lignées ont été conservées du fait des pressions rouille jaune ou des problèmes de verse et/ou d'hétérogénéité des lots. Parmi ces 231 lignées, 188 de ces lignées provenaient d'un croisement entre Robigus et une lignée synthétique tandis que 43 provenaient d'un croisement de Robigus avec un blé tétraploïde.

Dans le cadre de PROSYN, lors de la saison 2017, les 231 lignées ont été observées dans 8 dispositifs différents (5 au Royaume Uni et 3 en France) et notées pour des caractères de hauteur, date d'épiaison, présence de barbes, pureté, glaucescence, verse et maladies opportunistes (essentiellement rouilles jaune et brune). Au total, dans ces pépinières, environ 6000 données d'observations ont été réalisées et ont permis la sélection de 121/231 lignées pour la mise en place des essais rendement de la deuxième année. L'ensemble des données ont été synthétisées et rendues disponibles à l'ensemble des partenaires du projet.

En parallèle de ces observations en pépinière, les 231 lignées ont été multipliées afin de produire environ 5kg de semences de chacune des lignées pour couvrir les besoins des essais prévus en 2018 et 2019.

### ► Des essais rendement sous différentes modalités d'apport d'azote

Le réseau d'essais multi local comprenait 23 combinaisons lieu x année avec des conditions variées d'apport en azote conduisant à un total de 36 combinaisons lieu x année x conduite azotée, comprenant 14 conduites a priori faible azote et 22 conduites a priori optimales. Le rendement des grains et la teneur en protéines du grain ont été mesurés respectivement dans 23 et 18 combinaisons. La plupart des essais ont été mesurés pour la date d'épiaison, le poids de mille grains et quelques scores opportunistes de verse et maladies.



Toutes les données phénotypiques ont été analysées et certaines valeurs suspectes ont été supprimées afin de disposer d'un jeu de données exploitables et analysables. Un essai en particulier, l'essai sans apport d'azote effectué à Cambridge en 2018 (CAMzeroN) a été retiré des analyses en raison du rendement très faible observé. L'analyse a été limitée aux 45 lignées évaluées en troisième année du projet et aux cinq variétés contrôles (KWS SANTIAGO, SKYFALL, CELLULE, RUBISKO, ROBIGUS). Les 45 lignées étudiées étaient présentes dans 30 à 36 essais selon la lignée considérée.

Dans l'ensemble des essais individuels, les données ont été ajustées à l'effet bloc déclaré en aléatoire et les valeurs phénotypiques estimées (BLUEs) de chaque génotype ont été calculées. Ensuite, une valeur par génotype a été calculée pour l'ensemble des essais avec l'effet essai déclaré en aléatoire. Ces valeurs moyennes de rendement et de teneur en protéines par génotype ont permis de calculer l'écart à la relation entre teneur en protéines et rendement, autrement appelé GPD pour Grain Protein Deviation, en suivant la procédure itérative proposée par Oury et Godin (2007).

La tolérance des génotypes à la carence en azote a été évaluée comme suit :

$$\delta V = (V_{optN} - V_{lowN}) / V_{optN} \times 100$$

avec  $V_{optN}$  est la variable considérée mesurée sous conditions optimales en azote,  $V_{lowN}$  est la variable considérée mesurée sous conditions carencées, pour une même combinaison lieu x année. Seules les combinaisons lieu x année qui montraient un effet négatif significatif de l'application réduite en azote ont été conservées pour calculer ces indices de tolérance. Pour le rendement, cela inclut JAL19, LAV19, CAM18, FER18, MOI18 and VER18 et pour la teneur en protéine, cela AUB19, JAL19, SAI19, CAM18, FER18, MOI18, MON19 and VER18.2.3.

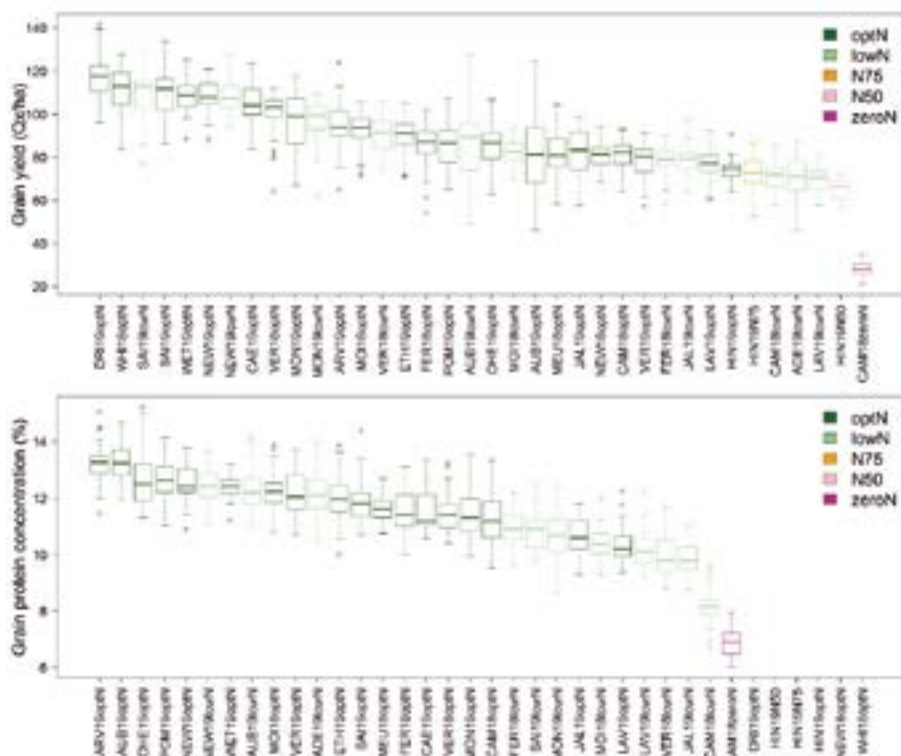
## 3 Résultats

### ► Statistiques descriptives des essais

Les corrélations entre les rendements mesurés dans les différents essais ont été en moyenne de 0,52 en 2019 (-0,11 à 0,97) et de 0,26 en 2018 (-0,13 à 0,75) et les corrélations entre les deux années étaient assez faibles (effet annuel). Les corrélations pour la teneur en protéines étaient en moyenne de 0,61 en 2018 (0,35 à 0,78) et de 0,54 en 2019 (-0,11 à 0,94) et aucun effet apparent de l'année n'a été trouvé. On peut noter que la teneur en protéines a été mesurée dans un nombre moindre d'essais en 2018.

Dans les différents essais, le rendement moyen variait de 20 à 140 Qx/ha et aucune structuration évidente n'est apparue avec la fertilisation de l'essai en azote. L'essai CAM18zeroN sans fertilisation présentait des rendements très faibles variant de 20 à 40. Certaines combinaisons année x lieu présentaient un rendement plus élevé en faible azote par rapport à la modalité azote optimal (SAI19, MON19). La teneur en protéines moyenne variait de 9 à 15 % et les essais de faible teneur en azote ont toujours présenté une teneur en protéines (GPC) plus faible que celui de la modalité optimale pour un lieu d'essai donné une même année.





**Figure 3 :** Distribution des rendements et teneurs en protéines dans les différents essais du réseau PROSYN

### ► Analyse de variance

Les analyses de variance pour le rendement et la teneur en protéines ont montré que le facteur principal explicatif des variations observées est l'essai. Pour ce facteur, le pourcentage de variance expliqué est de 76,3 % et 80,9 %, respectivement pour le rendement et la teneur en protéines. Le facteur génotype est également très significatif et explique 9,99 % et 9,75 % de la variance observée, respectivement pour le rendement et la teneur en protéines.

plantes (-0,50). Ainsi, les lignées précoces et de petite taille ont tendance à avoir un rendement moyen plus élevé. La teneur en protéines est négativement corrélée au rendement (-0,63) comme attendu.

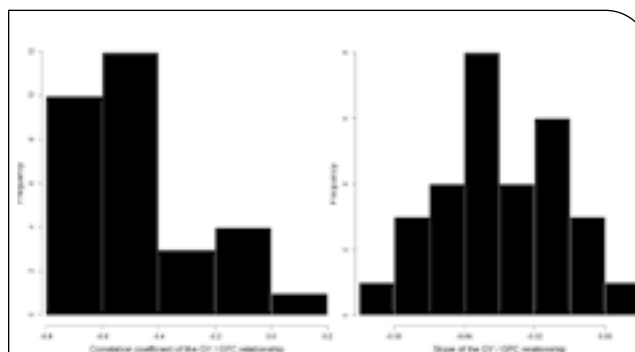
Pour ce qui concerne cette dernière relation rendement - teneur en protéines, les coefficients de corrélation et les pentes mesurées intra essais présentent une grande variabilité avec des relations non significatives et/ou positives dans certains essais. La figure suivante montre la répartition des coefficients de corrélation et des pentes de la relation teneur en protéines=f(rendement).

FACTEUR	DF	SUM SQ	MEAN SQ	F VALUE	PR(>F)
GENOTYPE	49	62222	1269.8	23.0	< 2.2e-16 ***
ESSAI	35	475217	13577.6	245.6	< 2.2e-16 ***
RESIDUELLE	1545	85403	55.3		

**Tableau 1.** Tableau d'analyse de variance du caractère rendement.

FACTEUR	DF	SUM SQ	MEAN SQ	F VALUE	PR(>F)
GENOTYPE	49	325	6.6	26.8	< 2.2e-16 ***
ESSAI	29	2698	93.1	375.5	< 2.2e-16 ***
RESIDUELLE	1258	311	0.2		

**Tableau 2.** Tableau d'analyse de variance du caractère teneur en protéines rendement.



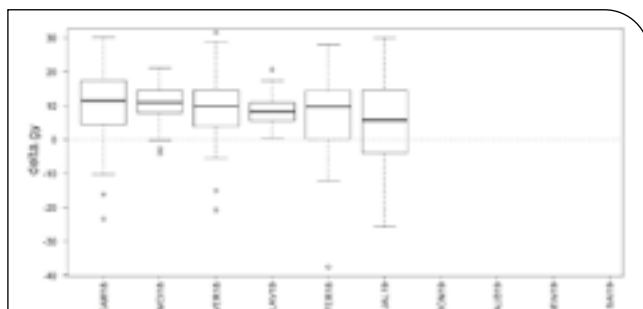
**Figure 4 :** Coefficient de corrélation et pentes de la relation teneur en protéines=f(rendement)

### ► Corrélations entre caractères

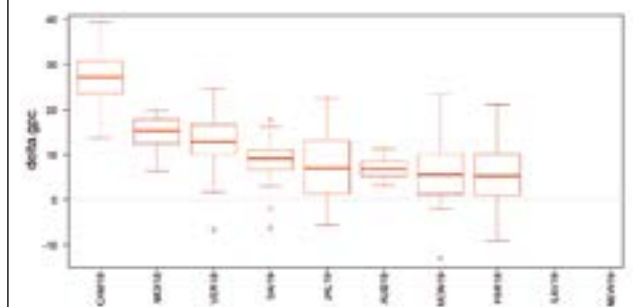
Les corrélations phénotypiques entre les moyennes ajustées des caractères dans les différents essais sont faibles à élevées selon les caractères. Le rendement est négativement corrélé à la date d'épiaison (-0,49), à la teneur en protéines GPC (-0,63) ainsi qu'à la hauteur de

### ► Effet de la carence en azote

On peut mesurer l'écart de performances sous dose optimale vs dose réduite pour le rendement ( $\delta GY$ ) ou pour la teneur en protéine ( $\delta GPC$ ). Les valeurs observées pour ces écarts sont majoritairement positives et les quelques valeurs négatives observées reflètent probablement des erreurs de mesure.



**Figure 5 :** Distribution des écarts de rendement entre modalités optimale et carencée en azote



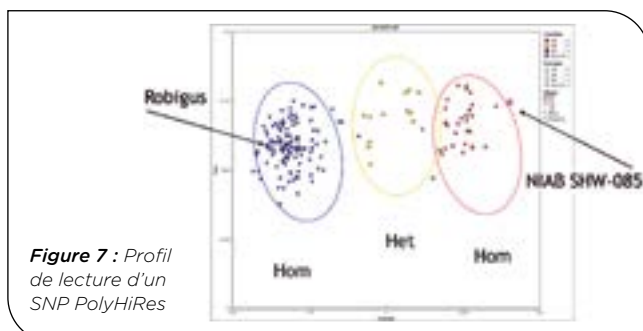
**Figure 6 :** Distribution des écarts de teneur en protéines entre modalités optimale et carencée en azote

L'effet du facteur essai est significatif à la fois pour les écarts de rendement et de teneur en protéines mais la proportion de variance expliquée est bien plus élevée pour le GPC (61.5 %) que pour le rendement (4.4 %). En revanche, le facteur génotype n'est significatif que pour la variable écart de rendement pour laquelle il explique 21.9 % de la variance.

### ► Génotypage des lignées PROSYN

Les 121 lignées sélectionnées pour la deuxième année d'essai (2017-2018) ont été génotypées. Les échantillons proviennent des pépinières conduites au NIAB dans lesquelles les lots de semences ont été purifiées pour éliminer les plantes hors type. Pour 17 de ces lignées, 2 familles ont été génotypées. Il s'agit de lignées qui présentaient de bonnes performances en essais ou pépinière en 2018 mais qui étaient trop hétérogènes du point de vue du type. En effet, il existait soit des mélanges barbus/non barbus soit des hétérogénéités de glaucescence. La plupart de des lignées ont été fixées après 2018.

L'ensemble de ce matériel a été génotypé à l'aide de la puce 35k Axiom Affy Wheat Breeders développé à Bristol dans l'équipe de Keith Edwards. Tous les échantillons ont passé avec succès le contrôle qualité. Plus de 16 500 SNPs sont apparus polymorphique parmi le jeu de données dont plus de 13 500 de haute qualité (PolyHiRes), comme sur l'exemple suivant.



**Figure 7 :** Profil de lecture d'un SNP PolyHiRes

### ► Cartographie des marqueurs SNPs

Les marqueurs monomorphiques et ceux qui présentaient des profils ambigus ont été retirés des analyses. Dans un premier temps, l'ordre et la position des 16 678 marqueurs restants ont été déterminés selon quatre méthodes différentes :

- Position sur la carte génétique de la population Avalon x Cadenza ;
- Position sur la carte génétique de la population Savannah x Rialto ;
- Position physique sur le génome de référence en comparant la séquence du marqueur à la RefSeq
- Blast sur IWGSC

Les résultats obtenus avec les différentes méthodes se sont révélés être sources de confusion et la position physique sur le génome de référence a finalement été retenue.

	A	B	D	TOTAL
1	772	1197	512	2481
2	1189	1363	609	3161
3	803	1147	454	2404
4	713	616	231	1560
5	983	1304	436	2723
6	719	963	397	2079
7	959	874	437	2270
<b>TOTAL</b>	<b>6138</b>	<b>7464</b>	<b>3076</b>	<b>16678</b>

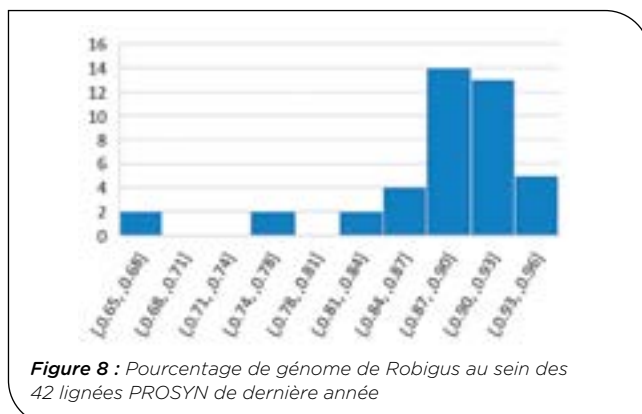
**Tableau 3.** Effectif des marqueurs positionnés sur les différents chromosomes

### ► Analyses génétiques

La première analyse concerne la similarité des lignées PROSYN au parent récurrent Robigus. Il y a quelques autofécondations de Robigus détectées, comme cela a déjà été le cas dans des projets similaires. Robigus est toujours utilisé comme femelle lors du premier backcross avec la F1.

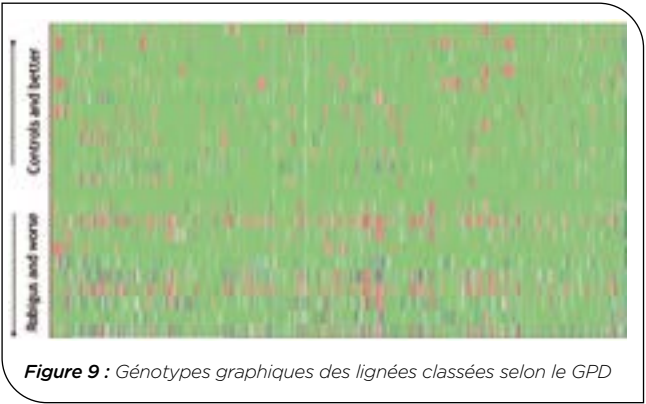
Il est à noter que 3 lignées sont similaires à plus de 99 % à Robigus : PRO-006, PRO-012, PRO-061 et que ces trois lignées ont été sélectionnées parmi les 45 lignées expérimentées en dernière année. En dehors de ces trois lignées, parmi les 42 autres lignées, le génome de Robigus représente en moyenne 88 % du génome de ces lignées contre 56 % pour l'ensemble des lignées dérivées des croisements avec du matériel synthétique.

La sélection opérée dans le cadre du projet a clairement favorisé les lignées porteuses du génome de Robigus dans une large proportion avec cependant 12 % du génome provenant des lignées synthétiques.



**Figure 8 :** Pourcentage de génome de Robigus au sein des 42 lignées PROSYN de dernière année

Pour ce qui concerne le caractère de GPD, on remarque que les variétés les plus performantes présentent un pourcentage du génome de la lignée parentale Robigus supérieur aux lignées moins performantes. On remarque également que ces lignées semblent partager des régions du génome enrichies en allèles issus du matériel synthétique.



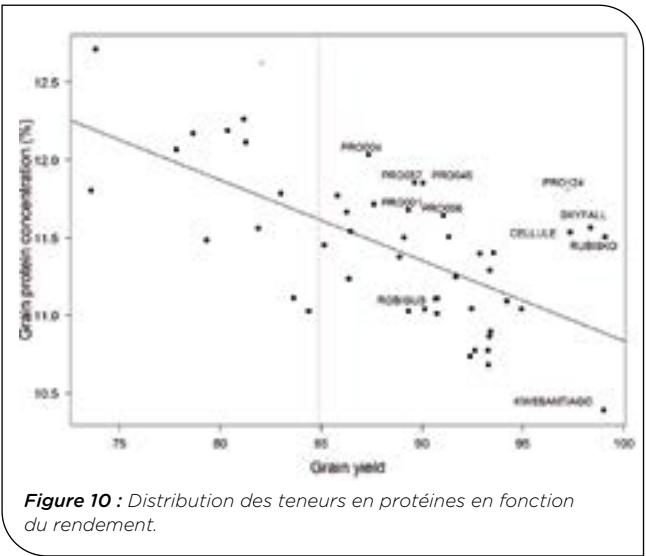
Sur la base de ces résultats, des analyses génétiques complémentaires sont nécessaires afin de déterminer plus précisément les régions génomiques impliquées dans la variation des caractères clés de l'efficacité d'utilisation de l'azote.

#### 4 Discussion

##### ► Identification des lignées GPD+

Les lignées qui présentaient à la fois un rendement en grains supérieur à 95 % du rendement du parent récurrent Robigus et un GPD supérieur à 0.5 ont été identifiées et analysées plus en détail.

La figure suivante présente les teneurs en protéines vs le rendement des 45 lignées étudiées en troisième année du projet. Les lignées étiquetées sont les 6 lignées qui répondaient aux deux critères énoncés ci-dessus. La ligne verticale en pointillés rouge est située à 95 % du rendement de Robigus.



Les 6 lignées suivantes ont donc été identifiées pour leur GPD supérieur et un rendement acceptable : PRO001, PRO004, PRO045, PRO056, PRO057, PRO124.

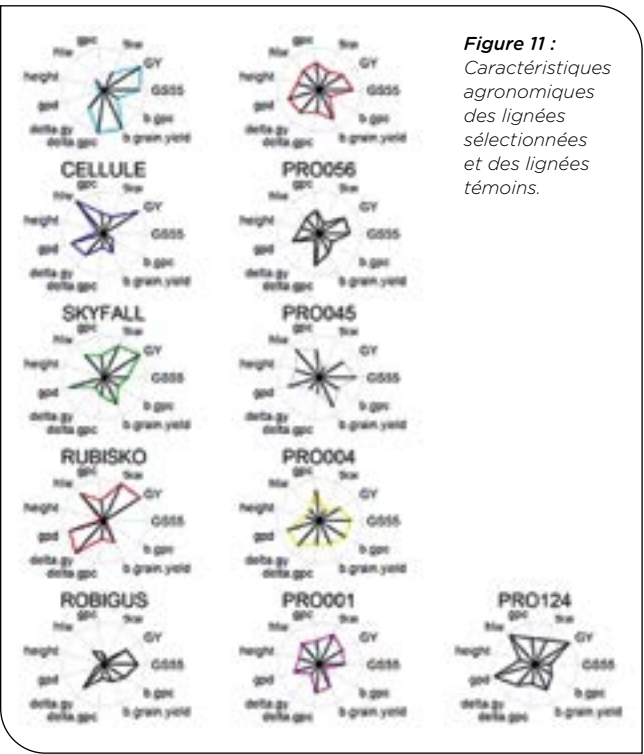
##### ► Caractérisation phénotypique des lignées GPD+

PRO004 présente un rendement inférieur à celui du contrôle ROBIGUS mais une teneur en protéines et un GPD bien plus élevés. PRO001, PRO045, PRO056 et PRO057 ont à peu près le même rendement que ROBIGUS, avec une teneur en protéines supérieure de presque 1 point. La ligne PRO124 quant à elle montre à la fois un rendement et une teneur en protéines plus élevés que le parent récurrent ROBIGUS. Cette lignée est du même niveau que CELLULE, SKYFALL et RUBISKO en termes de rendement avec une teneur en protéines légèrement supérieure.

Lignée	Date d'épiaison (J JULIEN)	Rendement (QX/HA)	Teneur en protéines (%)	GPD
CELLULE	143.6	97.3	11.5	0.56
RUBISKO	143.7	99.1	11.5	0.62
PRO001	149.3	89.3	11.7	0.29
PRO056	150.3	91.1	11.6	0.34
PRO004	150.6	87.4	12.0	0.54
PRO045	151.8	90.0	11.9	0.50
PRO057	151.0	89.6	11.9	0.48
PRO124	146.9	97.2	11.8	0.83
ROBIGUS	151.1	89.3	11.0	-0.36
SKYFALL	149.0	98.4	11.6	0.64
KWSSANTIAGO	151.6	99.0	10.4	-0.50

Tableau 4. Caractéristiques agronomiques des 6 lignées GPD+

Les performances de ces lignées peuvent également être visualisées via un graphique radar, sur lequel toutes les variables ont été indépendamment réduites à l'échelle 0-1. Les lignées PRO001 et PRO056 présentent un GPD modéré et sont relativement hautes et tardives. PRO004 a un GPD élevé, est relativement courte et tardive. PRO045 et PRO057 présentent un GPD élevé, une hauteur élevée et sont tardives. PRO124 a un GPD élevé, est de taille modérée et relativement précoce.





## 5 Conclusions

L'analyse des données du projet PROSYN a permis l'identification de 6 lignées d'intérêt pour améliorer conjointement le rendement et la teneur en protéines des variétés. Douze pour cent du génome de ces lignées provient de blés synthétiques et est potentiellement porteur d'allèles exotiques non encore présents dans les blés cultivés.

Sur le plan de la recherche, de nombreuses questions restent à élucider concernant les caractéristiques physiologiques et génétiques de ces lignées : Est-ce l'absorption ou la remobilisation d'azote qui est favorisée et leur permet d'accumuler plus de protéines dans le grain ? Quels sont les allèles exotiques responsables de ces caractéristiques améliorées ?

Sur le plan de l'innovation variétale, il reste un long travail de validation des résultats puis de sélection variétale avant de voir ces innovations entre les mains des agriculteurs à travers une variété commerciale. Mais les partenaires du projet disposent dès à présent de lignées amélioratrices de la teneur en protéines et ceci a été rendu possible par la caractérisation approfondie d'une collection de blés synthétiques.

Origine	OBS 2017	YLD 2018	YLD 2019	Final selection
SHWS DERIVED	81 % (188)	75 % (91)	77 % (35)	100 % (6)
TETRAPLOIDS DERIVED	19 % (43)	25 % (30)	23 % (10)	

**Tableau 5.** Tableau récapitulatif des effectifs de lignées sélectionnées au cours du projet

## Références bibliographiques

- Agreste.** 2011. <http://www.agreste.agriculture.gouv.fr/>
- 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 (2010), pp. 201-212.
- Cooper J.K., Ibrahim A., Rudd J., Malla S., Hays D.B. and Baker J.** 2012. Increasing hard winter wheat yield potential via synthetic wheat: I. Path-coefficient analysis of yield and its components. *Crop Sci.* 52:2014-2022.
- Dampney P.M.R., Edwards, A., Dyer C.J.** 2006. Managing nitrogen applications to new Group 1 and 2 wheat varieties. HGCA PROJECT REPORT 400.
- Dreisigacker S., Kishii M., Lage J., Warburton M.** 2008. Use of synthetic hexaploid wheat to increase diversity for CIMMYT bread wheat improvement. *Australian Journal of Agricultural Research*, 59 : 413-430.
- Hawkesford M.J.** 2014. Reducing the reliance on nitrogen fertilizer for wheat production. *Journal of Cereal Science.* 276-283.
- Krapp, A., Saliba-Colombani, V., Daniel-Vedele, F.** 2005. Analysis of C and N metabolisms and of C/N interactions using quantitative genetics. *Photosynth. Res.* 83, 251-263.
- Moore G.** 2015. Strategic pre-breeding for wheat improvement. *Nature Plants* 1: 15018. doi:10.1038/nplants.2015.18.
- Mujeeb-Kazi A., Gul A., Farooq M., Rizwan S., Ahmad I.** 2008. Rebirth of synthetic hexaploids with global implications for wheat improvement. *Australian Journal of Agricultural Research* 59:391-398.
- Ogbonnaya, F.C., Imtiaz M., Bariana H.S., McLean M., Shankar M.M., Hollaway G.J., Trethowan R.M., Lagudah E.S., van Ginkel M.** 2008. Mining synthetic hexaploids for multiple disease resistance to improve wheat. *Aust. J. Agr. Res.* 59:421-431.
- Oury, F-X, 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. 10.1007/s10681-007-9395-5.
- Plamenov D. and Spetsov P.** 2011. Synthetic Hexaploid Lines are valuable resources for biotic stress resistance in Wheat improvement. *Journal of Plant Pathology*, 93 (2), 251-262.
- Rathey A., Shorter R., Chapman S.** 2011. Evaluation of CIMMYT conventional and synthetic spring wheat germplasm in rainfed sub-tropical environments. I. Grain yield components and physiological traits. *Field Crop Res.* 124:195-204.
- Simmonds N.W.** 1995. The relation between yield and protein in cereal grain. *J. Sci. Food Agric.*, 67 (1995), pp. 309-315.
- Trethowan R.M., Mujeeb-kazi A.** 2008. Novel germplasm resources for improving environmental stress tolerance of hexaploid wheat. *Crop Science* 48, 1255-1265.

# PROSYN : Apport des blés synthétiques à l'amélioration conjointe de la productivité, de la teneur en protéines et l'efficacité d'utilisation de l'azote

Jérémy DERORY<sup>1\*</sup>, Matthieu BOGARD<sup>2</sup>, Katia BEAUCHENE<sup>2</sup>, Philippe MOMONT<sup>3</sup>, Jacob LAGE<sup>3</sup>, Sebastien CAIVEAU<sup>4</sup>, Olga ZHADENOVA<sup>4</sup>, Phil HOWELL<sup>5</sup>, Céline DUQUE<sup>1</sup>, Constance LAVERGNE<sup>1</sup>

1 - Limagrain Europe - CS50005 St Beauzire 63360 GERZAT, France  
2 - ARVALIS-Institut du végétal - 3 rue Marie & Joseph Hackin 75016 Paris, France  
3 - KWS Momont - 7 rue de Martinval 59246 Mons en Pévèle, France  
4 - Syngenta - 2 Avenue Gustave Eiffel CS 40346 28008 Chartres Cedex, France  
5 - NIAB - Huntingdon Road CB3 0LE CAMBRIDGE, Royaume Uni  
\*Coordinateur : Jérémy DERORY, jeremy.derory@limagrain.com

## INTRODUCTION

PROSYN se propose de caractériser des ressources génétiques développées par le NIAB dans le cadre du projet anglais WISP. Leur étude vise à terme l'amélioration de la productivité via une meilleure valorisation de l'azote.

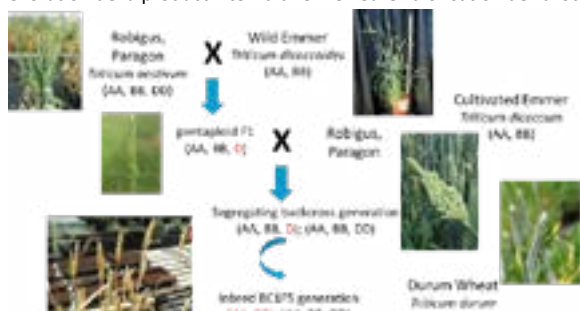


Figure 1 : Illustration d'un croisement entre blé tétraploïde et hexaploïde

## SÉLECTION DE LIGNÉES GPD+

Six lignées présentent un rendement en grains supérieur à 95% du parent récurrent (Robigus) et un GPD supérieur à 0.5.

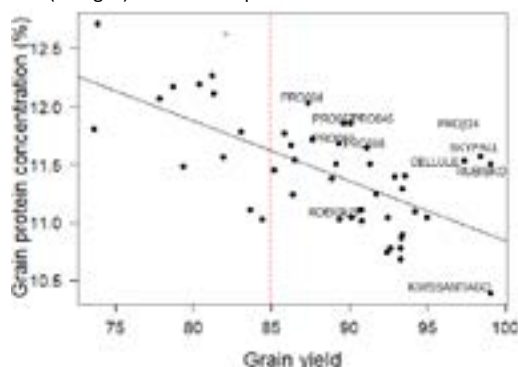


Figure 3 : Distribution des teneurs en protéines des lignées en fonction du rendement

## NOUVELLES SOURCES DE DIVERSITÉ POUR LA CRÉATION VARIÉTALE

Des lignées amélioratrices de la teneur en protéines sont disponibles à la sélection variétale grâce à la caractérisation approfondie d'une collection de blés synthétiques.

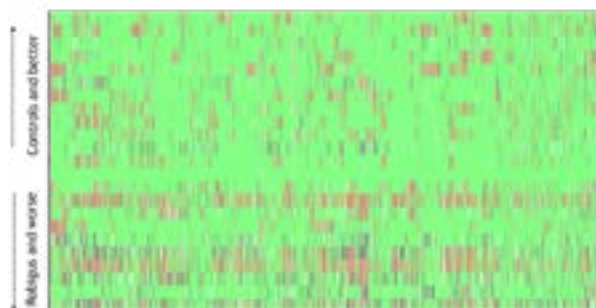


Figure 4 : Génotypes graphiques des lignées classées selon le GPD

## RÉSEAU D'ESSAIS MULTI-LOCAL

Une étape de pré-sélection a été réalisée au champ parmi 231 lignées à partir d'observations pour des caractères d'adaptabilité/tolérance maladies.



Un panel de 45 lignées a été évalué en réseau d'essai multi-local pour le rendement et la teneur en protéines.

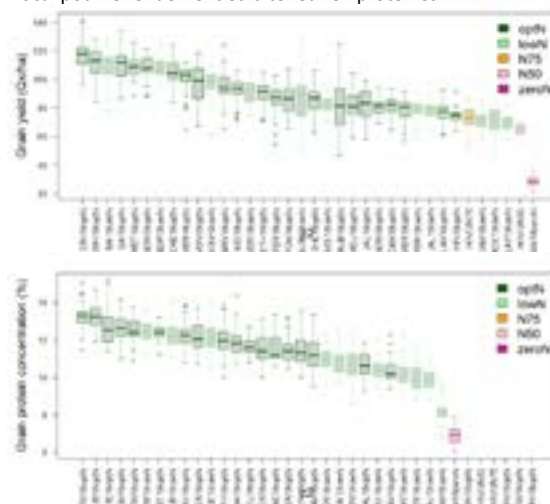


Figure 2 : Distribution des rendements et teneurs en protéines dans les différents essais du réseau PROSYN

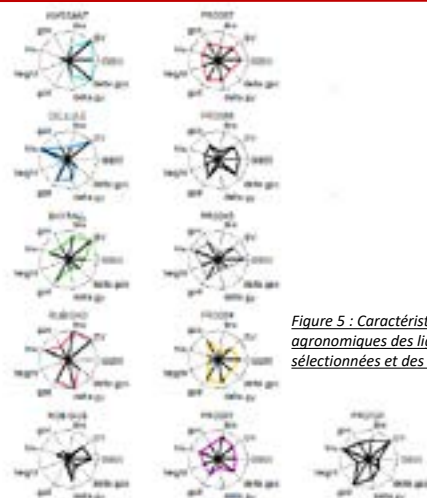


Figure 5 : Caractéristiques agronomiques des lignées sélectionnées et des lignées témoins



# RenKSeq : Développement d'un outil (RenKSeq) innovant de criblage de gènes à haut débit pour identifier rapidement de nouveaux gènes de résistance à la septoriose

Olivier Robert <sup>\*1</sup>, David Lopez <sup>2</sup>, Andrea Garavito <sup>2</sup>, Aurélie Evrard <sup>\*1</sup>, Ellen Goudemand-Dugue <sup>\*1</sup>, Lamia Aouini <sup>3</sup>, Els Verstappen <sup>3</sup>, Burkhard Steuernagel <sup>4</sup>, Delphine Hourcade Marcolla <sup>5</sup>, Brande Wulff <sup>4</sup>, Justin Faris <sup>6</sup>, Gert Kema <sup>3</sup>, Cyrille Sautenet <sup>2</sup>

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

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

3 - Wageningen University and Research (Wageningen Plant Research, Biointeractions and Plant Health), PO Box 16, 6700AA, Wageningen, The Netherlands

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

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

6 - United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service, Cereal Crops Research Unit, Edward T. Schafer Agricultural Research Center, Fargo, ND, 58102, USA

<sup>\*</sup>Coordinateur : Ellen Goudemand-Dugue, Ellen.GOUDEMAND-DUGUE@florimond-desprez.fr

## 1 Introduction

La septoriose est l'une des maladies les plus dommageables pour la culture du blé en France. Chaque année, les pertes estimées sont en moyenne entre 350 et 700 millions d'euros (Fones and Gurr, 2015). Cette maladie est causée par le champignon *Zymoseptoria tritici* dont l'une des principales caractéristiques est sa grande diversité génétique. Une étude récente suggère la présence de 50 millions d'haplotypes sur un hectare de champ de blé dans le Nord de la France lors de conditions épidémiques importantes (Siah *et al.*, 2018). Cette caractéristique est un frein majeur pour lutter efficacement et durablement contre cet agent pathogène car cela permet à *Z. tritici* de s'adapter rapidement aux stratégies de lutte déployées.

Le contrôle de cette maladie est principalement basé sur l'utilisation de fongicides et de variétés de blé résistantes à cet agent pathogène. De par la mise en place de directives Européennes et nationales, l'utilisation controversée des fongicides va être limitée dans les années à venir et l'utilisation de variétés résistantes va devenir un des piliers de plus en plus important de la lutte contre cette maladie. Or, l'arsenal génétique à disposition des sélectionneurs pour lutter contre cette maladie reste limité et encore mal connu. Il est ainsi nécessaire de fournir plus d'outils et de ressources à disposition de la sélection comme des marqueurs diagnostiques pour réussir avec succès cette transition.

Au cours de ces dernières années, les progrès en génomique ont révolutionné les approches pour identifier de nouveaux gènes de résistance. En 2016, l'équipe de Brande Wulff (John Innes Centre) a mis au point une stratégie d'identification de gènes de résistance à la rouille chez le blé (Steuernagel *et al.*, 2016). Cette méthodologie a permis d'identifier deux nouveaux gènes de résistance à la rouille noire, *Sr22* et *Sr45*, en dix-huit mois alors que plusieurs années étaient nécessaires auparavant. Cette stratégie repose sur le prérequis majeur que le gène de résistance à identifier appartient à la famille des NBS-LRR. Cette stratégie comporte plusieurs étapes : (i) identification d'une accession présentant une résistance majeure à la rouille, (ii) production d'une population de tilling à partir de cette accession résistante, (iii) phénotypage de cette population et identification de familles sensibles, (iv)

séquençage de l'ensemble des NBS-LRR par capture de séquences chez l'accession résistante et chez les familles sensibles, (v) identification des mutations au sein des gènes NBS-LRR pour l'ensemble des familles sensibles. Le gène NBS-LRR présentant une mutation chez l'ensemble des familles sensibles représente le gène de résistance conférant la résistance chez l'accession étudiée.

La capture de gènes est une technique qui permet de réduire la complexité des séquences à étudier. Elle est principalement utilisée dans l'étude des grands génomes comme celui du blé. Cette méthodologie utilisée depuis longtemps présente plusieurs variantes. Cependant, la stratégie générale repose sur le design de séquences nucléotidiques appâts d'une longueur de 60 à 120 bp complémentaires des séquences à étudier. Une fois synthétisés, ces appâts sont mis en solution avec le génome fragmenté d'intérêt. Les appâts hybridés avec les séquences complémentaires d'intérêt sont retirés de la solution, en général grâce à un système de billes magnétiques. Les séquences complémentaires sont ensuite éluées des appâts et séquencées à l'aide des dernières technologies de séquençage.

Dans le cas des résistances à la septoriose chez le blé, seulement 22 gènes majeurs de résistance et 89 méta-QTL ont été cartographiés génétiquement (Brown *et al.*, 2015), un nombre limité si on le compare aux gènes identifiés pour d'autres maladies fongiques du blé telles que les rouilles ou l'oïdium. La résistance conférée par les gènes majeurs de résistance à la septoriose répond au système gène-à-gène dans lequel un gène majeur de résistance va reconnaître un gène d'avirulence présent chez le champignon.

Il existe encore peu de connaissances sur la présence de ces gènes au sein des variétés françaises et très peu de marqueurs diagnostiques. Les gènes *Stb4*, *Stb9*, *Stb11*, *Stb18* ont été identifiés dans des variétés Françaises, ce qui suggère leur présence dans le germplasm français mais aucun marqueur n'est disponible pour un suivi fiable. Récemment, les gènes *Stb6* (Sautenet *et al.*, 2018) et *Stb16q* (Sautenet *et al.*, 2021) ont été clonés. Ils codent des récepteurs à activité kinase (RLK). L'identification de ces gènes a permis le développement de marqueurs diagnostiques qui permettent actuellement de suivre ces gènes dans les programmes de sélection. Cela a permis



de montrer que le gène *Stb6* est présent dans environ 45 % des variétés françaises inscrites au catalogue alors que *Stb16q* est présent dans une très petite proportion. Fort de ces découvertes récentes, le projet RenKSeq avait pour objectif de s'appuyer sur la stratégie MutRenSeq pour identifier de nouveaux gènes de résistance à la septoriose causée par *Zymoseptoria tritici* et *Parastagonospora nodorum* en ne se basant plus sur l'étude des gènes de type NBS LRR mais sur les gènes de type RLK pour fournir de nouvelles ressources à la sélection.

## 2 Matériel et méthode

### ► Analyse bioinformatique des séquences de blé

Deux approches complémentaires ont été utilisées pour identifier les gènes de type RLK dans les séquences de blé. Pour les génomes annotés comme Chinese spring, les profils hmm de kinase (Lehti-Shiu and Shiu, 2012) ont été utilisés pour rechercher les kinases dans les protéomes prédits. Pour tous les autres génomes, une identification de novo a été réalisée en deux étapes avec le logiciel exonerate. A partir des séquences de génome dont les éléments transposables ont été masqués par RepeatMasker et 94,000 séquences de RLK présentes dans la littérature, une première identification a été réalisée. Ensuite, les régions ne portant pas de RLK lors de cette première approche ont été analysées avec une approche en mode sensible. Pour les génomes annotés, une comparaison des deux approches (Hmmscan et exonerate) a été réalisée et les résultats ont été mergés. Le design des séquences appâts a été réalisé grâce à un logiciel développé par le JIC dans le cadre du clonage des gènes de résistance à la rouille.

### ► Production et phénotypage des populations de tilling

Chaque accession résistante étudiée a été multipliée pour disposer d'un stock de grains homogènes. Ces grains ont ensuite été traités avec différentes doses d'EMS pour identifier la dose entraînant environ 50 % de germination des grains. Plus de 1000 grains ont ensuite été traités avec cette dose. Chaque plante M<sub>1</sub> issue de ce traitement a été multipliée et les graines M<sub>2</sub> récoltées soit en batch pour chaque M1 soit épi par épi a constitué la population de tilling. Entre 8 et 12 plantes par famille M<sub>2</sub> ont ensuite été phénotypées avec différentes souches de *Z. tritici*. Ce phénotypage a été effectué au stade plantule

(soit au stade une feuille soit deux feuilles) pour les populations Pocho, PI41025 et Cadenza. Ces populations ont été inoculées par spray avec un inoculum à une concentration de 10<sup>6</sup> spores/ml. La population BG301 a été phénotypée par infiltration de la toxine SnTox2 pour identifier les plantes ne présentant pas de nécrose. La population M6 a été phénotypée au champ en utilisant un système de sprinkler pour maintenir une humidité importante tout au long de l'essai. Autour de 15 graines par famille M<sub>2</sub> ont été semées en ligne. Les plantes ont été inoculées au stade Z39 avec une solution de *Z. tritici* isolat T48 à 10<sup>6</sup> spores/ml. Le phénotypage de validation des familles M<sub>2</sub> identifiées comme sensibles a été réalisé avec une application de l'inoculum au pinceau.

### ► Production et analyse des données de capture de séquence

L'ADN de chaque plante M<sub>2</sub> ou M<sub>3</sub> sensible a été extrait à l'aide du kit Qiagen DNeasy Plant Mini Kit. Ces ADN ont ensuite été dosés au qubit et envoyés à la société ArborBiosciences pour capture. Les fragments capturés ont été séquencés soit en utilisant la technologie MySeq (2x300 bp) soit la technologie NovaSeq (2x150 bp) afin d'attendre une couverture moyenne de 20X. L'assemblage de novo des RLK a été réalisé en utilisant le logiciel Mazurka. Les données ont été analysées en utilisant le pipeline MutantHunter, développé par l'équipe Anglaise (Steuernagel *et al.*, 2016). Les contigs d'intérêt ont été annotés en utilisant le pipeline TriAnnot (Leroy *et al.*, 2012).

## 3 Résultats

### ► 1 - Développement d'un essai de capture des gènes de type RLK/RLP

Pour intégrer le plus grand nombre de gènes RLK dans l'essai de capture, un des prérequis essentiels au succès de l'approche MutRenSeq, l'ensemble des ressources génomiques à disposition chez le blé au moment de cette analyse a été pris en compte. Ainsi, 16 génomes de blé ont été utilisés. Cinq génomes de blé tendre (deux versions de Chinese spring, Cadenza, Claire, Paragon et Robigus), cinq génomes de blé tétraploïdes (Kronos, Svevo, Cappelli, Strongfield et Zavitan) et cinq génomes de blé diploïdes (*Triticum urartu*, *Triticum monococcum*, *Aegilops speltoides*, *Aegilops sharonensis* and *Aegilops tauschii*). L'analyse bioinformatique de ces génomes a permis d'identifier l'ensemble des RLK présents dans ces génomes (Table 1).

Assemblage	Taille de l'assemblage (pb)	Loci RLK (pb)	Nombre de loci RLK	Table 1 : Ressources génomiques utilisées pour l'identification des gènes de type RLK chez le blé.
Chinese Spring NVGSC	14 347 606 634	23 254 210	6 445	
Chinese Spring Earlham Intitule	13 467 630 192	23 714 007	4 862	
Zavitan	10 509 868 245	20 469 051	2 584	
Cadenza	13 399 781 746	22 244 268	5 362	
Claire	14 616 451 647	21 707 537	6 367	
Kronos	10 540 467 196	14 940 058	3 706	
Paragon	15 318 048 945	22 432 660	5 431	
Robigus	14 791 409 785	21 874 636	5 281	
Svevo	68 032 98 213	8 350 610	2 444	
TGAC WGS_durum_v1	33 864 81 85	458 483	426	
TGAC WGS_monococcum_v1	13 221 12 30	574 717	417	
TGAC WGS_speltoides_v1	19 078 78 214	552 288	426	
TGAC WGS_strongfield_v1	33 848 41 931	361 995	387	
TGAC_WGS_tauschii_v1	12 002 21 237	665 015	441	
TGAC WGS_urartu_v1	16 570 29 501	686 599	445	
TSL_WGS_sharonensis_v1	17 308 99 803	611 984	445	
Séquences issues de la bibliographie		2 286 202	831	
<b>Total</b>	<b>128 Gb</b>	<b>185 Mb</b>	<b>45 290</b>	

Le nombre de RLK identifié par génome varie significativement de 6445 au sein du génome de référence produit par le consortium de séquençage jusqu'à 387 chez le blé dur Strongfield. Le catalogue complet des cibles RLK identifiés chez le blé correspond à 185 Mo pour 45 290 séquences. Ce catalogue comporte un ensemble de gènes redondants identifiés de façon indépendante chez chacune des accessions. Cette redondance a été prise en compte lors du design des séquences appâts.

Cet ensemble de séquences a ensuite été utilisé pour le design des appâts, des séquences de 120 pb qui sont la base de l'essai de capture. Pour réaliser le design de l'essai ne pouvant dépasser 200 000 appâts, nous avons modifié plusieurs paramètres dont l'espacement entre les différents appâts sur la séquence des RLK mais également le pourcentage de similarité entre les séquences appâts. Un premier lot de 236 591 appâts, d'une longueur de 120 pb, a été conçu. Cette valeur a été obtenue en sélectionnant des appâts très spécifiques (90 % d'identité) tout en augmentant l'espace entre les appâts (35 pb). Après cette conception initiale des appâts, des tests *in silico* ont été réalisés pour prédire l'efficacité de capture.

La partie la plus difficile de ce processus consistait à capturer le plus grand nombre possible de cibles RLK tout en éliminant les régions répétées. Tandis que le premier était facilement obtenu via la recherche Blast de nos appâts contre le RLKome, la nature intrinsèquement répétée de certains candidats (par exemple, kinases riches en leucine répétées, domaines de facteur de croissance d'élongation trouvés dans les WAKs) rendait difficile la distinction entre répétitions biologiques utiles ou non. Nous avons donc identifié des régions annotées en tant que répétitions dans le génome de Chinese Spring qui appartenaient au moins partiellement aux RLK supposées. L'annotation manuelle des WAK réalisée par nos collègues Anglais de Rothamsted Research s'est avérée une ressource précieuse à cet égard (The International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) *et al.*, 2018). Nous avons ensuite utilisé la fréquence d'apparition des appâts parmi les régions d'intérêts extraites (c'est-à-dire les RLKomes) et leurs fréquences dans des assemblages non masqués. Cette méthode a permis d'éliminer quelques centaines d'appâts dont les fréquences étaient trop différentes entre les sources génomiques et les sources ciblées. Ce processus itératif a généré 206 000 appâts qui ont été soumis à la société Arbor Sciences pour la synthèse. Selon les contrôles qualité de cette société, 26 000 appâts présentaient une forte propension secondaire. Un travail de repositionnement/redesign de ces appâts a été réalisé et nous a permis de finaliser l'essai de capture comprenant 199 733 séquences appât.

## ► 2 - Création et phénotypage de populations de tilling à partir de variétés résistantes

Au total, cinq accessions ont été étudiées dans ce projet :

- L'accession d'origine sud-américaine Pocho qui présente un large spectre de résistance à *Zymoseptoria tritici*.
- L'accession de blé synthétique M6 qui porte le gène majeur *Stb8*.
- Une lignée recombinante BG301 provenant de l'accession BR34 et Grandin qui porte le gène de résistance à *Parastagonospora nodorum* *Snn2*.

- L'accession de blé dur (*Triticum dicoccum*) PI41025 portant un gène majeur de résistance à *Z. tritici* sur le chromosome 3A.
- L'accession Cadenza portant le gène de résistance *Stb6*.

**Pocho :** 911 familles M<sub>2</sub> indépendantes ont été produites et phénotypées avec l'isolat IPO9415 de *Z. tritici* avirulent sur cette accession. Au total, 47 familles ont présenté des symptômes et ont été sélectionnées pour validation par inoculation au pinceau. Les validations ont été effectuées sur environ 30 plantes par famille M<sub>2</sub>. Seul neuf familles mutantes indépendantes présentaient au moins une plante sensible (plus de 20 % des régions porteuses de pycnides, 50 % de nécroses). De manière inattendue, le phénotype n'a pas été hérité en tant que trait mendélien pour toutes les familles. Les plantes sensibles portant le plus probablement la mutation causale à l'état homozygote ont été cultivées pour la multiplication des graines. Cependant, ces dernières ont montré une condition physique réduite et une capacité limitée à produire des graines. Nous avons réussi à isoler les semences de la famille 349. Tous les descendants de M<sub>3</sub> étaient sensibles. Pour les autres familles, nous avons eu des difficultés à obtenir des semences M<sub>3</sub> de plantes sensibles et, pour certaines, des plantes sont même mortes après l'inoculation. Le génotypage à partir de la puce SNP 35K des mutants sensibles des 9 familles ne montrant pas de délétion de larges fragments de chromosome, une plante sensible par famille a été choisie pour la capture des RLK.

**BG301 :** Un total de 478 plants M<sub>1</sub> a été généré après traitement à l'EMS. Dix mutants M<sub>2</sub> indépendants, insensibles à SnTox2 ont été identifiés au cours de la première année. La deuxième année, les graines M<sub>3</sub> de ces plantes ont été récoltées et replantées. Les plantes M<sub>3</sub> ont été réévaluées avec des cultures contenant SnTox2 pour vérifier leurs insensibilités à SnTox2, et elles ont été génotypées avec des marqueurs moléculaires connus pour être liés au locus *Snn2* afin de déterminer si l'un des mutants présentait des délétions chromosomiques. L'analyse d'infiltration a indiqué que les dix plantes étaient insensibles à la culture contenant SnTox2, mais une analyse génotypique a indiqué que trois des dix hébergeaient d'importantes délétions chromosomiques et n'étaient donc pas utiles pour RenKSeq. L'ADN des sept plantes ne présentant pas de délétions a été extrait pour réaliser la capture des RLK.

**M6 :** Une population de tilling comprenant 513 plantes M<sub>2</sub> séparées en 1216 épis a été développée. Dans un premier temps, une partie de cette population a été phénotypée au stade plantule avec la souche T48 Malheureusement, l'accession résistante (M6) ainsi que la population était sensible.



Figure 1 : Phénotypage au stade adulte de la population de tilling M6.

Avant de reconduire un phénotypage de la population entière, nous avons phénotypé 50 génotypes de la population ITMI (haploïdes doublés entre la variété sensible Opata et M6) avec les isolats T48, IPO98032 et IPO98050 pour déterminer les bases génétiques de la résistance à la septoriose chez l'accension M6. Une analyse QTL a été effectuée en utilisant ces phénotypes et les données de génotypage disponibles dans la littérature. Pour la souche T48, nous avons observé quatre pics sur le 2B, 6B, 1D et 2D. Avec la souche IPO98032, 3 QTL sont observés dont un sur le 6B et 2 sur le 1D pour les nécroses, et un QTL majeur expliquant les picnides sur le 6B. Ces résultats sont assez bien corrélés avec Simon *et al.* où 3 QTL au stade plantule ont été identifiés sur les chromosomes 1D, 2D et 6B mais avec un faible score LOD. Néanmoins, il semble que le gène *Stb8* sur le chromosome 7B (la cible initiale pour M6) ne soit pas révélé au stade plantule. L'isolat utilisé pour cartographier le gène *Stb8* était T48 mais sur des plantes adultes. D'après ces données, *Stb8* ne semble s'exprimer ainsi qu'au stade adulte. Avec notre test de semis au stade plantule, nous cibons donc d'autres QTL que celui contenant *Stb8*. Un essai au stade adulte sur la population de mutant M6 en conditions semi contrôlées a été réalisé au printemps/été 2019 (Figure 1). Malheureusement, cette année de sécheresse a tout d'abord impacté la germination et le développement des mutants EMS de cette population. De plus, la sécheresse a limité la propagation de la septoriose et malgré une inoculation artificielle et un arrosage important, très peu de symptômes ont été observé sur les génotypes sensibles et aucun mutant qui avait atteint le stade adulte n'a montré de symptômes de septoriose.

PI41025.: Des graines pour 803 M<sub>2</sub> ont été produites. Ces mutants ont été phénotypés mais le phénotypage n'a pas révélé de différence entre le parent sensible (ben) et résistant (PI41025) à partir desquels une population bi-parentale avait été utilisée pour identifier le gène de résistance chez PI41025. De nombreux tests de conditions de culture, de feuille pour l'inoculation, de différents isolats et de méthodes d'inoculation ont été testés sur les graines des deux parents de cette population mais aucun n'a pu reproduire les résultats originaux. L'évaluation du stock original du génotype PI41025 a permis de reproduire le phénotypage de résistance mais pas les graines qui ont servi à faire la population mutante. Cette expérience a montré que le stock de grains utilisé pour réaliser la population n'était pas celui de l'accension PI41025.

Cadenza : Nous avons utilisé sept familles de mutants portant une mutation dans le gène *Stb6* et identifiés lors du clonage de ce gène pour réaliser la preuve de concept de cette stratégie pour cloner le gène *Stb6*.

Au final, 23 familles ont été identifiées comme sensibles à la septoriose à partir de trois populations de tilling (Pocho, BG301 et Cadenza).

### ► 3 - Capture des RLK chez les parents des populations de tilling et les familles identifiées comme sensibles

Une fois les mutants sensibles identifiés, la stratégie MutRenSeq nécessite de réaliser un assemblage *de novo* de l'ensemble des RLK présent chez l'accension résistante et ensuite d'utiliser cette séquence comme référence pour aligner les séquences obtenues à partir de chacun des mutants sensibles. L'identification des contigs de la référence qui contient le plus de mutations et notamment une mutation par famille sensible doit permettre d'identifier le gène de résistance.

Nous avons séquencé les RLK de quatre accessions utilisées dans le projet (Pocho, M6 ; BG301 et PI41025) ainsi que du génome de référence Chinese spring avec la technologie Illumina MiSeq qui génèrent des lectures plus longues pour permettre l'assemblage d'une meilleure séquence de référence des RLK. Cette expérimentation a généré ~10 Go de séquence pour chaque accession. Chacun des 5 génotypes représentait 2,3 à 4,3 millions de paires de lecture 2x300 pb (Table 2).

Pour notre étude, nous visons une profondeur de 20x. Pour Chinese Spring, les 3,5 millions de paires de lecture ont donné une profondeur médiane de 18x. Parmi ces séquences, 284 avaient une profondeur moyenne <2x et 1358 sont au-dessous de 10x. Les séquences en dessous de la profondeur médiane (17x) ont été communiquées à Arbor Science. L'analyse a révélé que les appâts correspondants étaient dominés par des appâts dont les scores de propension secondaire étaient extrêmement élevés. Arbor Science a synthétisé un lot de nouveaux appâts pour améliorer l'efficacité de la capture. Cette partie a permis de valider l'efficacité de la capture avec le cultivar Chinese Spring pour la plupart des RLK présentes dans son génome. De plus, en moyenne, 85 % des séquences des quatre autres génotypes ont été correctement cartographiées sur l'assemblage Chinese Spring montrant l'efficacité de l'enrichissement.

	Nombre de paires de lecture	% de lecture mappées sur la ref	Paires correctement mappées sur le RLKome	% lectures mappées sur le RLKome	Profondeur sur le RLKome (X)
Chinese spring	3 445 819	84,84 %	1 308 929	37,99	3 262
Pocho	3 436 686	79,20 %	1 290 079	37,54	3 063
PI41025	4 015 234	74,96 %	1 548 081	38,56	2 559
BG301	4 385 093	76,91 %	1 708 645	38,96	1 931
W7984	2 354 737	78,80 %	861 155	36,57	1 025
Total paires lecture	17 637 569		6 716 889		
<b>Total en bases</b>	<b>10 582 541 400</b>				

**Table 2 :** Lectures issues de Miseq à partir des cinq génotypes. Nombre brut de lectures 2X300 pb produites.

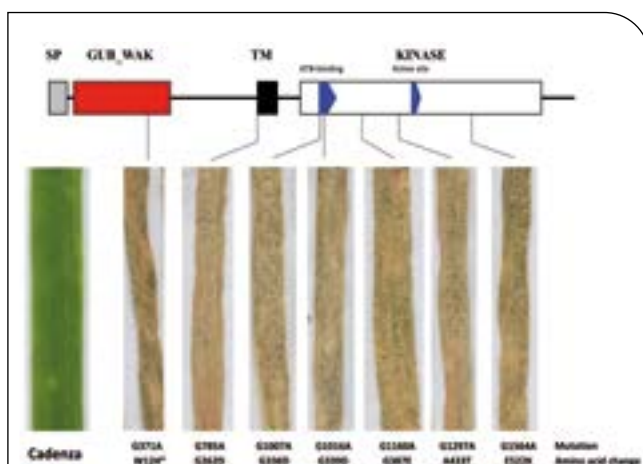


Pour disposer de la meilleure séquence de référence, différents assembleurs de novo ont été testés avec les séquences des cinq lignées. Les tests ont révélé que la longueur assemblée variait de 12 à 17 Mb (13 Mb ont été trouvés avec CLC). Cependant, Masurca était le meilleur assembleur en terme de métriques d'assemblage, avec une L50 inférieure et une N50 supérieure à toutes les autres et même surpassait CLC. De loin, Masurca a produit la plus petite quantité de contigs et, bien que les auteurs recommandent l'utilisation de bibliothèques brutes, nous avons constaté que le prétraitement avec Trimmomatic donnait des statistiques encore meilleures. Les assemblages de novo RLKome ont ensuite tous été réalisés avec Masurca et Trimmomatic (Table 3).

Assemblage	Taille	Nombre de contigs	L50	N50	Contigs avec une couverture d'appâts > 60%
Cinnose spring	25 Mb	12 907	2 616	3 148	7 858
Pocha	30 Mb	15 621	2 971	3 210	8 577
P141025	24 Mb	12 698	2 218	3 339	5 612
BG301	31 Mb	15 637	2 938	3 345	8 254
W7984	31 Mb	15 125	2 948	3 276	8 693

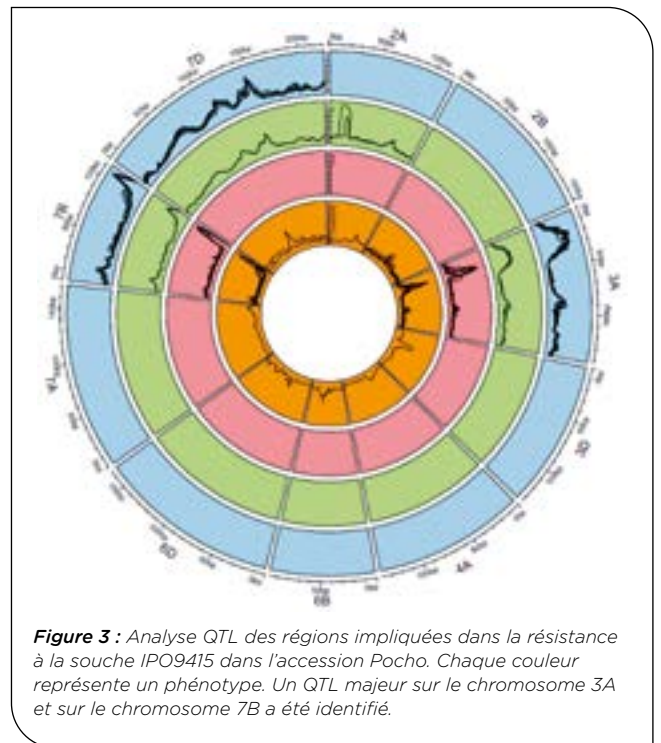
**Table 3 :** Assemblage de novo des RLK chez les parents des populations de tilling.

**Cadenza :** Pour valider cette stratégie de clonage de gènes de résistance à la septoriose, nous avons séquencé les RLK chez l'accèsion Cadenza (2x150 pb) et chez les sept familles identifiées comme sensibles à la souche avirulente *Stb6* IPO323 (Figure 2). L'analyse des séquences de Cadenza a permis l'assemblage de 85 171 contigs avec une N50 de 1,8 kb. La recherche de contigs présentant des mutations a révélé la présence d'un seul contig portant sept mutations provenant chacune d'une des sept familles de mutants sensibles. L'analyse de ce contig a montré qu'il portait le gène *Stb6*. Cette expérience a permis de valider cette stratégie pour le clonage des gènes de résistance à la septoriose.



**Figure 2 :** Caractéristiques des sept mutants sensibles à la souche IPO323, utilisés pour la capture des RLK. En haut est représenté les exons du gène *Stb6*. Le phénotype des feuilles infectées par la souche IPO323 à 21 dpi ainsi que la position des mutations sont représentées.

**Pocho :** Pour la population Pocho, aucun contig n'a été identifié comme présentant une mutation dans les neuf familles sensibles identifiées lors du phénotypage. L'analyse par MutantHunter a révélé la présence de 6 contigs comportant une mutation pour 6 des 9 familles et un contig portant 7 mutations. Un seul de ces contigs montre la présence d'un gène (par l'annotation TriAnnot) mais les mutations n'étaient pas présentes dans les exons de ce gène. Ainsi, cette analyse ne nous a pas permis d'identifier de gènes de résistance candidat. Pour tenter d'expliquer ces résultats et regarder si un des 7 contigs identifiés cartographie sur le gène ou les gènes de résistance présents chez l'accèsion Pocho, nous avons décidé de réaliser une analyse du déterminisme génétique de la résistance à la septoriose chez Pocho. Nous avons ainsi développé une population SSD de 78 individus issue du croisement entre Pocho et l'accèsion de blé sensible Obelisk. Une analyse QTL a ensuite été réalisée suite au phénotypage de la population par trois souches portant des virulences différentes et grâce au génotypage de la population avec la puce SNP 35K. L'analyse des données issues de la première souche montre la présence de cinq QTL (2A, 3A, 5B, 7B et 7D) de résistance chez l'accèsion Pocho (Figure 3). La présence de ces cinq QTL vis-à-vis des souches utilisées pour le phénotypage de la population de tilling Pocho explique vraisemblablement pourquoi nous n'avons pas pu identifier un gène candidat car l'effet de la mutation au niveau d'un de ces QTL aurait un faible impact sur le phénotype.



**Figure 3 :** Analyse QTL des régions impliquées dans la résistance à la souche IPO9415 dans l'accèsion Pocho. Chaque couleur représente un phénotype. Un QTL majeur sur le chromosome 3A et sur le chromosome 7B a été identifié.

**BG301 :** 27 contigs portant une mutation chez les 7 mutants analysés ont été trouvés. Chacun de ces contigs a été ancré sur la séquence de référence de CS mais aucun n'a été positionné sur le chromosome 2D où le gène *Snn2* est cartographié. L'annotation des gènes présents sur ces scaffolds a permis d'identifier 11 scaffolds portant un gène dont 6 étaient des kinases.

De nombreuses mutations étaient présentes sur ces scaffolds et au niveau de ces gènes. Nous avons donc appliqué une étape de filtration pour éliminer toutes les mutations non induites par l'EMS, option non incluse dans le pipeline MutantHunter. Suite à ce filtre, aucun des 27 scaffolds n'a été retenu par le pipeline MutantHunter, ce qui suggère que ces scaffolds étaient vraisemblablement des faux positifs. L'échec d'identification d'un gène peut être lié au fait que celui-ci soit mal assemblé ou assemblé en plusieurs contigs. Ainsi, nous avons analysé en particulier les 16 gènes présents dans l'intervalle de confiance (dont 11 kinases) défini pour le gène *Snn2* sur la séquence de référence internationale CS. Nous avons reconstruit ces gènes sur la séquence de référence du parent BG301 en utilisant ces données de capture pour vérifier que le gène n'était pas fragmenté dans la référence. Nous avons ensuite utilisé le pipeline MuntantHunter sur cette nouvelle séquence de référence mais les résultats ont été identiques. Nous avons également fait varier les paramètres d'analyse du pipeline MutantHunter ainsi que la référence du parent BG301 (assemblage Novaseq ou Miseq) mais aucun de ces changements n'a permis d'identifier un gène candidat.

#### ► 4 - Identification et clonage des gènes effecteurs chez *Z. tritici* qui interagissent avec les gènes cibles chez les blés (gènes *Stb*) et qui interagissent dans la spécificité blé tendre / blé dur afin d'améliorer le phénotypage et la sélection pour la résistance des blés

Le gène *AvrStb6* a été cloné récemment ce qui permet d'envisager la production de la protéine *Stb6*. Cette dernière pourrait être utilisée comme preuve de concept pour infiltrer et phénotyper le germplasm Français. Nous avons planifié la production de la protéine *AvrStb6* pour l'infiltration dans les tissus de blé afin de vérifier si une réaction se produisait. Les expériences préliminaires n'ont pas abouti et la production en système hétérologue semble compliquée dû à la présence de nombreuses cystéines dans cette protéine.

Le clonage de l'effecteur *AvrStb6* chez IPO323 a montré un nombre considérable de SNP par rapport à l'haplotype *AvrStb6* présent chez la souche virulente IPO95052. En combinant le séquençage du génome entier d'une collection mondiale de 136 isolats de *Z. tritici* et des essais de phénotypage sur des cvs. Volcani 447 (blé dur), Bulgarie, Taichung 29 et TE9III, nous avons observé une diversité génétique étendue avec une différenciation génétique modérée entre les groupes géographiques. Les isolats originaires du Moyen-Orient, centre d'origine du blé, présentaient une diversité génétique accrue par rapport aux populations d'autres zones géographiques. Nous avons montré de nombreuses variations du génome structurel à grande échelle et confirmons la présence de 13 chromosomes principaux hébergeant la plupart des gènes effecteurs identifiés et des chromosomes accessoires structurellement variables avec des taux plus élevés de SNP et de polymorphismes de présence / absence de gènes effecteurs. Le profilage de ces effecteurs a révélé un groupe de 183 effecteurs conservés et un groupe de 88 effecteurs présentant des polymorphismes de présence / absence significativement plus proches des

éléments transposables que des conservés. Lorsque nous avons phénotypé 118 isolats de *Z. tritici* sur les cultivars mentionnés, nous avons constaté que la majorité (87) infectent l'une ou l'autre des espèces de blé (tendre ou dur), tandis qu'une minorité (12 isolats) causait la maladie dans les deux cas. L'évaluation des différences génomiques entre les isolats de blé tendre et de blé dur a révélé quatre gènes effecteurs affectés par du polymorphisme SNP non synonymes dans des isolats de blé tendre. De futures analyses fonctionnelles sont nécessaires pour comprendre le rôle des candidats effecteurs identifiés sur les cultivars de blé tendre et de blé dur. Cette étude contribue à une meilleure compréhension de la spécificité de l'hôte dans les isolats mondiaux de *Z. tritici* et contribue ainsi à une gestion améliorée de la maladie de cet important agent pathogène des céréales.

## 4 Discussion

Ce projet a permis d'identifier le catalogue des RLK chez le blé, une famille de gènes importante qui intervient dans de nombreuses fonctions biologiques dont la résistance à la septoriose. Cette ressource va permettre une meilleure compréhension de leur diversité, leur localisation chromosomique et de leur fonction à plus long terme.

Nous avons rencontré plusieurs problèmes lors du développement et du phénotypage des populations de tilling. L'expression de certains gènes de résistance qui n'opère qu'à un stade précis du développement de la plante et des conditions climatiques défavorables pour le phénotypage des populations au stade adulte ont limité l'analyse de certaines populations.

Alors que cette stratégie s'est avérée fructueuse pour le clonage de *Stb6* (identification d'un seul contig portant le gène), nous n'avons pas pu identifier les gènes de résistance ciblés chez les accessions résistantes étudiées. Les raisons de cet échec peuvent être multiples et il est difficile de conclure. La première hypothèse est tout simplement que le gène de résistance n'est pas un RLK. Une autre hypothèse probable pour la population Pocho est la présence de plusieurs QTL de résistance. Les mutants sensibles ainsi identifiés peuvent porter des mutations dans un de ces différents QTL et il est impossible d'identifier une région ou un gène commun aux différents mutants. Une autre hypothèse est basée sur l'absence de capture du RLK candidat par notre essai mais cela serait surprenant car les appâts peuvent s'hybrider avec des séquences divergentes de 20 %. La dernière hypothèse est liée aux problèmes d'analyse rencontrés (assemblage et alignement) de ces données pour cette famille de gènes qui est l'une des plus complexe du génome de blé avec autour de 6000 à 7000 copies par génome. Ce qui représente environ deux fois plus de copies que la famille des NBS-LRR.

Les gènes de résistance présents dans les accessions de ce projet sont en cours de clonage en utilisant d'autres approches en parallèle. L'identification de ces gènes nous permettra d'identifier les étapes bloquantes de cette méthodologie afin de l'améliorer. L'identification très récente d'un premier gène candidat de résistance dans une de ces populations montre que ce gène a

été capturé pour moitié dans l'essai de capture. Seul la partie 5' du gène est présent dans les séquences et ainsi toutes les mutations présentes dans les différentes familles sensibles n'ont pas pu être retrouvées par notre approche. De plus, l'accession résistante porte un cluster de cinq gènes RLK alors qu'une seule copie est présente chez la référence Chinese spring. Ce cluster présente notamment une copie avec une similarité de 98 % avec notre gène candidat. Lors de l'alignement des séquences de mutants sur notre séquence de référence, ces deux copies avec 98 % de similarité s'alignent sur la référence ne permettant pas de détecter des mutations fixées chez les mutants sensibles. Ce cas de figure montre

la complexité d'analyse de cette famille multigénique. L'une des solutions serait de privilégier la capture et le séquençage de long fragments pour éviter l'alignement de copies multiples.

Ce projet a permis de mettre en avant les QTL de résistance présents dans l'accession Pocho qui pourront être introgressés dans le matériel français. De plus, les mutants sensibles identifiés dans ce projet sont une ressource importante pour l'identification des gènes de résistance. Finalement, cet essai en cours d'amélioration est également utilisé par d'autres collaborateurs pour l'identification de gènes de résistance à d'autres maladies du blé.

## Références bibliographiques

**Brown, J.K.M., Chartrain, L., Lasserre-Zuber, P., and Saintenac, C.** (2015). Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genet. Biol.* 79, 33–41.

**Fones, H., and Gurr, S.** (2015). The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genet. Biol.* 79, 3–7.

**Lehti-Shiu, M.D., and Shiu, S.-H.** (2012). Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367, 2619–2639.

**Leroy, P., Guilhot, N., Sakai, H., Bernard, A., Choulet, F., Theil, S., Reboux, S., Amano, N., Flutre, T., Pelegri, C., et al.** (2012). TriAnnot: A Versatile and High Performance Pipeline for the Automated Annotation of Plant Genomes. *Front. Plant Sci.* 3.

**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., et al.** (2018). Wheat receptor-kinase-like protein Stb6 controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Nat. Genet.* 50, 368–374.

**Saintenac, C., Cambon, F., Aouini, L., Verstappen, E., Ghaffary, S.M.T., Poucet, T., Marande, W., Berges, H., Xu, S., Jaouannet, M., et al.** (2021). A wheat cysteine-rich receptor-like kinase confers broad-spectrum resistance against *Septoria tritici* blotch. *Nat. Commun.* 12, 433.

**Siah, A., Bomble, M., Tisserant, B., Cadalen, T., Holvoet, M., Hilbert, J.-L., Halama, P., and Reignault, P.** (2018). Genetic Structure of *Zymoseptoria tritici* in Northern France at Region, Field, Plant, and Leaf Layer Scales. *Phytopathology*® 108, 1114–1123.

**Steuernagel, B., Periyannan, S.K., Hernández-Pinzón, I., Witek, K., Rouse, M.N., Yu, G., Hatta, A., Ayliffe, M., Bariana, H., Jones, J.D.G., et al.** (2016). Rapid cloning of disease-resistance genes in plants using mutagenesis and sequence capture. *Nat. Biotechnol.* 34, 652–655.

**The International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC), Appels, R., Eversole, K., Stein, N., Feuillet, C., Keller, B., Rogers, J., Pozniak, C.J., Choulet, F., Distelfeld, A., et al.** (2018). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science* 361, eaar7191.



## RenKSeq : Développement d'un outil innovant de criblage de gènes à haut débit pour identifier rapidement de nouveaux gènes de résistance à la septoriose

Olivier Robert <sup>\*1</sup>, David Lopez<sup>2</sup>, Andrea Garavito<sup>3</sup>, Aurélie Evrard<sup>\*1</sup>, Ellen Goudemand-Dugue<sup>\*1</sup>, Lamia Aouini<sup>3</sup>, Els Verstappen<sup>3</sup>, Burkhard Steuernagel<sup>4</sup>, Delphine Hourcade Marcolla<sup>5</sup>, Brande Wulff<sup>4</sup>, Justin Faris<sup>6</sup>, Gert Kema<sup>3</sup>, Cyrille Saintenac<sup>2</sup>

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

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

3 - Wageningen University and Research (Wageningen Plant Research, Biointeractions and Plant Health), PO Box 16, 6700AA, Wageningen, The Netherlands

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

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

6 - United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service, Cereal Crops Research Unit, Edward T. Schafer Agricultural Research Center, Fargo, ND, 58102, USA

\*Coordinateur : Ellen Goudemand-Dugue, [Ellen.GOUDEMAND-DUGUE@florimond-desprez.fr](mailto:Ellen.GOUDEMAND-DUGUE@florimond-desprez.fr)

**Résumé:** Le projet avait pour objectif de mettre au point une stratégie innovante pour accélérer le clonage de nouveaux gènes de résistance à la septoriose et fournir un ensemble de marqueurs diagnostiques associés à ces gènes. Cette stratégie basée sur l'approche MutRenSeq (Figure 1) développée pour le clonage de gènes de résistance à la rouille se focalisait sur les gènes de type récepteurs kinase ou RLK, une famille de gènes impliquée dans la résistance à la septoriose. Le projet a permis de développer un essai de capture des gènes de type RLK chez le blé afin de mieux comprendre leur diversité dans les variétés. Bien que la stratégie développée ait été validée pour le clonage du gène *Stb6*, celle-ci n'a pas permis le clonage de nouveaux gènes de résistance. Ce projet a cependant permis l'identification de mutants sensibles, une ressource indispensable pour l'identification de gènes de résistance et également l'identification de nouveaux QTL de résistance à la septoriose chez la variété résistante Pocho.

**Introduction:** La septoriose est l'une des maladies les plus dommageables pour la culture du blé en France. Chaque année, les pertes sont estimées entre 350 et 700 millions d'euros pour la France. Seulement 22 gènes majeurs de résistance et 89 méta-QTL ont été cartographiés génétiquement (Brown et al., 2015). Même si certains comme *Stb4*, *Stb9*, *Stb11*, *Stb18* ont été identifiés dans des variétés Françaises, il existe encore peu de connaissances sur la présence de ces gènes au sein des variétés françaises et très peu de marqueurs diagnostiques. L'identification des gènes *Stb6* et *Stb26* comme des RLK suggère que cette grande famille a un rôle prépondérant dans la résistance du blé vis-à-vis de la septoriose. L'analyse de cette grande famille pourrait permettre de mieux connaître leur diversité et également faciliter le clonage de nouveaux gènes de résistance et l'identification de marqueurs.

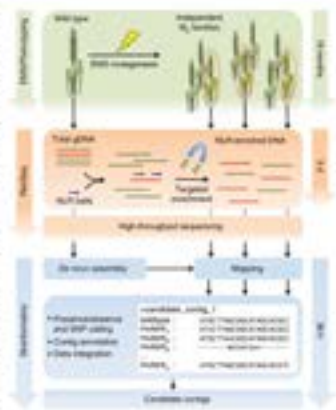


Figure 1: Stratégie MutRenSeq (Sneuermagel et al. 2016)

WP1 - Développement d'un outil de capture des gènes RLK

Afin d'être le plus exhaustif, 16 génomes de blé ont été utilisés pour rechercher les gènes de type RLK, soit en utilisant les RLK annotés par la communauté, soit en utilisant le pipeline présenté dans la figure 2. Cette analyse a permis l'identification d'un total de 45 290 RLK (Table 1) à partir desquels un design de 199 733 séquences appâts a été réalisé en collaboration avec la société Daicel Arbor.



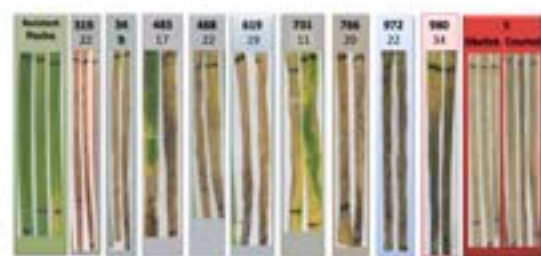
**Figure 2:** Pipeline bioinformatique utilisé pour l'identification des RLX chez le blé

Assembly	Assembly size (Kb)	90.0% (Kb)	95.0% (Kb)
Chinese Spring (Hap1)	14,292,598,628	12,333,213	8,995
Chinese Spring (Hap2)	12,657,032,182	12,714,907	4,982
Chinese Spring (Hap3)	10,838,988,849	20,488,091	1,584
Cadizone	11,598,791,749	12,344,398	1,087
Clara	9,849,051,647	21,757,937	3,920
Franklin	10,340,487,189	14,940,150	3,738
Manzanillo	10,310,088,340	22,432,685	5,401
Palique	14,761,420,681	21,874,438	3,281
Santa	8,952,288,215	8,788,912	3,349
TGAC_WGS_hap1_v1	1,084,017,395	462,435	426
TGAC_WGS_hap2_v1_v1	1,322,712,039	578,717	417
TGAC_WGS_hap3_v1	1,307,619,174	152,288	421
TGAC_WGS_hap4_v1	1,307,619,174	496,434	387
TGAC_WGS_hap5_v1	1,200,107,137	600,115	421
TGAC_WGS_hap6_v1	1,007,592,537	568,508	445
TGAC_WGS_hap7_v1	1,730,598,823	611,584	445
Biological replicates		2,286,322	351
<b>Total</b>	<b>129.5G</b>	<b>189.9G</b>	<b>49.28G</b>

Table 1: RLE identifié pour chacun des 16 génomes étudiés

WP2 – Développement et phénotypage de 5 populations de tilling réalisées à partir d'accèsions résistantes

- L'accession d'origine sud-américaine Pocho qui présente un large spectre de résistance à *Zymoseptoria tritici* (911 M<sub>2</sub>, 9 familles sensibles, Figure 3)
- L'accession de blé synthétique M6 qui porte le gène majeur *Stb8*. (513 M<sub>2</sub>, 0 sensible)
- Une lignée recombinante BG301 qui porte le gène de résistance à *Parastagonospora nodorum* *Snn2*. (478 M<sub>2</sub>, 7 familles sensibles)
- L'accession de blé dur (*Triticum dicoccum*) PI41025 portant un gène majeur de résistance à *Z. tritici* sur le chromosome 3A. (803 M<sub>2</sub>, 0 sensible)
- L'accession Cadenza portant le gène de résistance *Stb6*. (1200 M<sub>2</sub>, 7 familles sensibles)

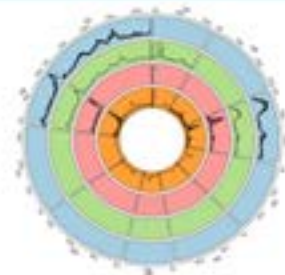


**Figure 3.** Phénotypes des 9 plantes  $M_1$  issues de la population de *dpi* après inoculation avec une souche avirulente.

WP3 – Identification des gènes de résistance présent dans les accessions d'intérêt

L'essai de capture des RLK (WP1) a été utilisé pour séquencer les RLK des 23 familles sensibles identifiées dans le WP2 ainsi que les parents de ces populations. L'ensemble des mutations présentes dans ces RLK a été identifié ainsi que les RLK portant une mutation dans plusieurs familles sensibles de la même population par le pipeline MutantHunter. Cette analyse a permis d'identifier un seul contig portant sept mutations, une par famille sensibles et issues de la population Cadenza. Ce contig porte le gène *Sbt6*, ce qui a permis de valider la stratégie de clonage. Cependant, aucun gène portant une mutation pour l'ensemble des familles sensibles pour les populations Pocho ou BG301 n'a été identifié. Certaines optimisations sont encore nécessaires pour lever les difficultés liées à l'étude d'une des plus grandes familles multigéniques du blé et pallier à ce manque d'efficacité.

En parallèle, une approche d'analyse QTL sur une population RIL issue de Pocho a permis d'identifier 5 QTL (2A, 3A, 5B, 7B et 7D) impliqués dans la résistance suite au phénotypage avec trois isolats de *Z. tritici* génétiquement différentes (Figure 4).



**Figure 4.** Représentation de deux QTL de résistance sur le chromosome 3A et 7B identifiés chez l'accèsion Pocho suite au phénotypage avec l'isolat IPO9415.

# PadiJNO : Identification de nouvelles résistances à la jaunisse nanisante et à son vecteur, *Rhopalosiphum padi*, chez le blé

Valérie LAURENT<sup>1\*</sup>, Inger Åhman<sup>3</sup>, Antje Habekuß<sup>2</sup>, Torsten Will<sup>2</sup>

1 - Florimond DESPREZ - BP41- 59242 Cappelle en pévèle

2 - Institute for Resistance Research and Stress Tolerance - Julius Kuehn Institute - Federal Research Centre for Cultivated Plants - Erwin-Baur-Straße 27- 06484 Quedlinburg- Allemagne

3 - Swedish University of Agricultural Sciences - Dept of Plant breeding - Box 101, SE 23053 ALNARP- Suède

\*Coordinateur : Valérie LAURENT, valerie.laurent@florimond-desprez.fr

## 1 Introduction

Le virus de la jaunisse nanisante de l'orge (Barley Yellow Dwarf Virus, BYDV) est la maladie virale des petites céréales la plus importante économiquement et la plus répandue dans le monde (D'Arcy, 1995). Transmise par les pucerons *Rhopalosiphum padi* à l'automne, la jaunisse nanisante peut provoquer des pertes de rendement conséquentes en blé d'hiver et ce problème s'étend vers le nord avec le changement climatique puisque la concentration de virus BYDV augmente dans le blé cultivé sous des niveaux élevés de CO<sub>2</sub> (Trebicki *et al.*, 2015).

La contribution du virus de la jaunisse nanisante aux pertes de rendement peut atteindre 30 q/ha dans le blé, le puceron *R. padi* pouvant causer des pertes de rendement allant jusqu'à 37 % par sa seule alimentation (Voss *et al.*, 1997) et combiné avec la transmission du virus les pertes peuvent atteindre 62 % (Riedell *et al.*, 2003).

En France, par le passé, 50 % des blés recevaient à l'automne un traitement insecticide (foliaire ou enrobage de semences) contre les pucerons vecteurs du BYDV. Mais le caractère sporadique des foyers de cette maladie en France ne justifie pas une utilisation systématique de ces traitements et les contraintes économiques et environnementales (décision européenne 91/414/CE) impliquent une utilisation optimisée des traitements phytosanitaires en agriculture. La recherche de sources de résistance à utiliser pour le développement de cultivars est donc une bonne alternative.

Quatre gènes de résistance au BYDV ont été identifiés. Seul *Bdv1* a été identifié dans le blé tendre Anza (Singh *et al.*, 1993), les 3 autres, *Bdv2*, *Bdv3* (Sharma *et al.*, 1997) et *Bdv4*, étant dérivés de *Thinopyrum intermedium*. Ces résistances interspécifiques ont été respectivement transférées dans la lignée de translocation TC14 (Wang and Zhang, 1996), la lignée de substitution P29 (Sharma *et al.*, 1997) et la lignée d'addition ditelosomique Zhong ZH (Barloy *et al.*, 2003). Ces gènes ont ensuite été transférés dans les variétés australiennes, McKellar et Glover, et chinoise, Lingkan 11, avec plus ou moins d'efficacité (Barloy *et al.*, 2003), ainsi que dans la variété européenne RGT Wolverine mais le fardeau génétique de *Th. intermedium* complique leur utilisation car il diminue le rendement. De plus, les infections de BYDV répétées semblent diminuer la tolérance de ces gènes (Chain *et al.*, 2006).

En blé de printemps, quatre QTL de tolérances au *R. padi* ont été mis en évidence sur la population de blé

synthétique SHW CWI76364 x Seri (Crespo-Herrera *et al.*, 2014a). Il y a aussi quelques tolérances à *R. padi* dans des lignées de blé portant des translocations de seigle (Crespo-Herrera *et al.*, 2013; 2014b), mais aucune variété résistante à *R. padi* n'est disponible sur le marché. Une des raisons principales de cette absence est que le phénotypage de la tolérance aux aphides est très chronophage. D'autre part, les *R. padi* ne causent pas de symptômes facilement sélectionnables comme ceux qui ont permis la sélection de résistance contre *Schizaphis graminum* et *Diuraphis noxia* (Quisenberry and Ni, 2007). Un test efficace, mais très chronophage, de la tolérance à *R. padi* est basé sur la mesure de la croissance nymphal sur une période de 4 jours (Mehrabi *et al.*, 2014). Cette méthode a été utilisée avec succès pour améliorer la résistance au champ de blés et d'orges (Crespo-Herrera *et al.*, 2014b).

La combinaison de résistance partielle au BYDV et de tolérance à *R. padi* pourrait être une solution pour diminuer l'impact de la jaunisse nanisante de l'orge afin de pouvoir faire face à la diminution des traitements insecticides néonicotinoides autorisés sur les céréales (règlement d'exécution n° 485/2013 et n° 2018/783 de la Commission de l'Union européenne).

Le but du projet était donc d'identifier des génotypes résistants au puceron *R. padi* et au virus BYDV dans un panel de ressources génétiques préalablement génotypés. Une étude d'association a été menée pour identifier des marqueurs de résistance. Un pyramidage des résistances au BYDV et à *R. padi* a ensuite été appliqué afin d'obtenir des ressources génétiques résistantes au virus et à son vecteur, utilisables en sélection.

## 2 Matériel et méthode

### ► Matériel

700 génotypes de blé hiver du panel de ressources génétiques ont été retenus à partir des ressources génétiques WP2-BWpanel (11 génotypes), WP2-CoreCollection (33 génotypes) et WP3 (638) du projet Investissement d'Avenir BREEDWHEAT de façon à pouvoir bénéficier du génotypage AXIOM avec la puce TaBW420K déjà réalisé pour ce dernier.

Dix-huit lignées supplémentaires, connues pour leur résistance à la jaunisse nanisante, et ne faisant pas partie de BREEDWHEAT, ont été génotypées avec la puce TaBW420K. Ces lignées contiennent pour la plupart la translocation chromosomique blé-seigle

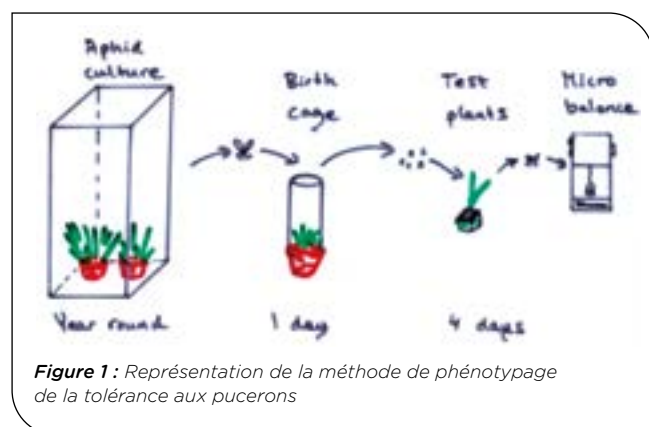


1B/IRS susceptible d'apporter la résistance à *R. padi*. L'accèsion porteuse du gène de résistance au BYDV, *Bdv2*, TC14-1-24-6, a également été ajoutée. Ce travail a été sous-traité à la plateforme de génotypage GENTYANE de l'INRAE à Clermont Ferrand.

## ► Méthodes

### Phénotypage de la résistance au puceron

La résistance aux pucerons a été évaluée par le SLU, en Suède (cf Fig.1). Chaque génotype est testé 4 fois en même temps que 2 témoins, un sensible, LinaR, et un tolérant, Hsp5. Les plantes sont semées en chambre de culture à  $22 \pm 2$  °C avec 80 % d'humidité et une photopériode de 16h de jours ; quand elles atteignent le stade 2-3 feuilles, 5 pucerons nouveaux nés sont transférés depuis la cage d'élevage et confinés à la base de la tige du génotype à évaluer.



Quatre jours après infestation, les pucerons survivants sont pesés avec une micro-balance.

Chaque semaine, une personne peut évaluer 22 génotypes différents. Les génotypes sont caractérisés par 2 notes correspondant aux pourcentage de poids de pucerons du génotype par rapport au poids de puceron des témoins. Un individu tolérant minimise ces 2 notes. Pour les croisements, les génotypes présentant un poids de pucerons moindre sont testés une 2<sup>ème</sup> fois.

### Phénotypage au champ de la jaunisse nanisante

A Cappelle en Pévèle, chez Florimond Desprez, le panel entier a été semé au champ à raison de 3 répétitions d'une ligne par génotype les années 2017 et 2018. Le semis a été réalisé précocement (mi-septembre) de façon à optimiser l'infection naturelle de ce champ par le puceron *R. padi*. A la reprise de la végétation au printemps, deux notations de la jaunisse ont été réalisées en avril et en mai selon une échelle de 1 (résistant) à 9 (mort). En année 2, un traitement fongicide a été appliqué après la 1<sup>ère</sup> notation pour éviter le développement de la septoriose qui débutait.

Au JKI, en Allemagne, le panel a été phénotypé en serre en année 1 par inoculation artificielle de 5 pucerons porteurs de BYDV-PAV avec le témoin sensible Hybnos. Les pucerons sont tués par application d'insecticides 7 jours plus tard.

En année 2, après le semis en serre, les plantules au stade 2-3 feuilles ont été inoculées artificiellement avec *Rhopalosiphum padi* à la mi-janvier puis vernalisées en chambre froide pendant 6 semaines. Début avril,

les plantes ont été repiquées en tunnel insect-proof avec une répétition de génotypes non infectés. Les symptômes ont été notés le 21 mai et le 3 juin.

### Dosage du virus BYDV

Les 2 années, en Allemagne, une mesure DAS-Elisa a été effectuée six semaines après inoculation pour évaluer le taux d'infection (IR) à partir de la mesure de l'extinction du virus (EX) BYDV à 405nm. Le taux d'infection est le pourcentage de plantes avec  $EX > 0.5$ .

### Croisements

Les individus les plus tolérants aux pucerons d'une part et au BYDV de l'autre, ont été croisés en serre avec les individus élites choisis par chacun des partenaires, Mutic pour la France, RGTRreform pour l'Allemagne et Ceylon pour la Suède. Les F1 obtenues ont ensuite été croisées avec les génotypes retenus pour leur résistance ou tolérance à l'autre membre du couple virus-vecteur. Une fois ce croisement 3 voies réalisé, une autofécondation supplémentaire a été réalisée de façon à fixer les résistances cumulées.

En années 3 et 4, les parents et leurs descendances ont été testés pour leur tolérance à *R. padi* au SLU et pour la résistance au virus par DAS-Elisa en inoculation artificielle en serre au JKI.

### Génétique d'association

Une étude de génétique d'association a été menée sur le phénotypage des 2 premières années avec les données de génotypage SNP de la puce TaBW420K. Les marqueurs avec une MAF (mineur allele frequency)  $< 5\%$  et avec plus de 5 % de données manquantes ont été éliminés, et seuls les marqueurs positionnés physiquement sur la séquence de référence IWGSC ont été conservés. Les individus avec plus de 5 % de données manquantes ont également été éliminés. L'analyse d'association a été réalisée avec le package R GAPIT (Liptka *et al.*, 2012) qui permet de travailler avec un très grand nombre de marqueurs et de réaliser une ACP, calculer une matrice de kinship et rechercher des associations. La GWAS a été réalisée en tenant compte de l'appareillement et de la structure. La correction de Bonferroni a été appliquée aux résultats pour limiter les faux positifs dus au très grand nombre de marqueurs ; le seuil de détection des associations a été fixé à une p-value  $< 10^{-7}$  et un FDR (False Discovery Rate)  $< 0.05$ . Des marqueurs KASP ont été développés pour les MTA identifiés.

### Génotypage

La présence des gènes *bdv1* et *bdv2* a été recherché au niveau du panel complet et des descendants des croisements à l'aide respectivement des marqueurs SSR swm10 (Bossolini *et al.* 2006) et SSR-Bdv3 (Kong *et al.*, 2009).

Une recherche de la translocation 1B:IRS a également été réalisée sur le panel avec le marqueur KASP wMAS000011 ([https://www.cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/CerealsDB/Excel/MAS\\_data\\_May\\_2013.xls](https://www.cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/CerealsDB/Excel/MAS_data_May_2013.xls)).

Les marqueurs KASP des MTA identifiés par la génétique d'association ainsi que les marqueurs des gènes *bdv1* et *bdv2* ont été utilisés pour sélectionner les descendants des croisements cumulant les différents MTA et/ou portant les gènes de résistances *bdv1* et *bdv2*.



### 3 Résultats

#### ► Phénotypage de la tolérance au puceron *R. padi*

Pour la majorité des génotypes du panel, les pucerons pèsent plus que ceux du témoin tolérant Hsp5, mais moins que sur le témoin sensible, LinaR (cf Fig. 2).

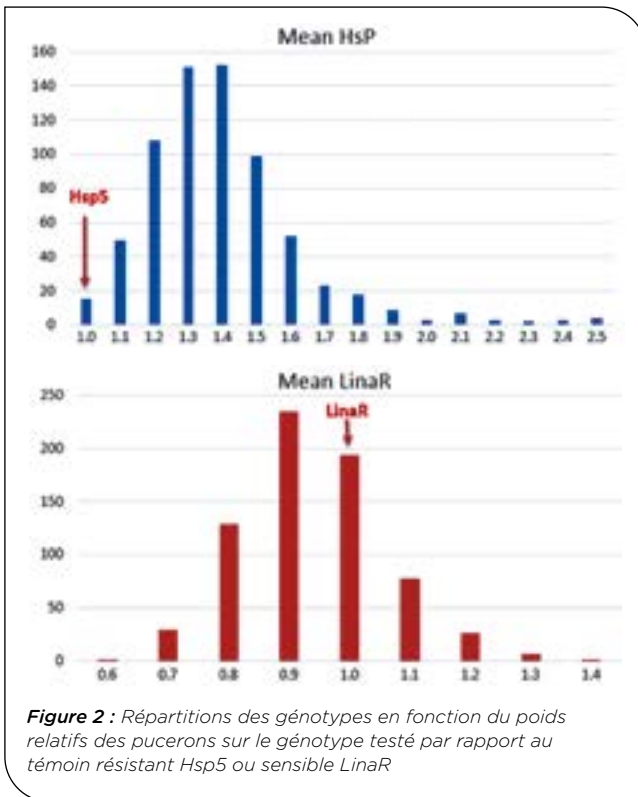


Figure 2 : Répartitions des génotypes en fonction du poids relatifs des pucerons sur le génotype testé par rapport au témoin résistant Hsp5 ou sensible LinaR

Six individus sont plus tolérants que le témoin résistant Hsp5, il s'agit de Domaca, Seu Seun1, Batkan Krasnaya, 8, Agror et Dotnuwska 458. Dix lignées minimisant les 2 notes ont été testées une 2<sup>ème</sup> fois afin de choisir les plus résistantes pour réaliser les croisements. Pour le choix final des individus à utiliser en croisements, la moyenne des notes de résistance à *R. padi* a été combinée avec celles de résistance à BYDV. Akmolinka, Agror, Djamin, Batkan Krasnaya et Domaca ont été retenus.

#### ► Phénotypage de la résistance au BYDV

##### Résistance au champ

Pour le blé, le caractère le plus marqué de la sensibilité au virus est un rougissement des feuilles (cf Fig. 3).



Figure 3 : Symptômes sur 3 génotypes sensibles. À droite, 2 génotypes ne présentant pas de rougissement.

Chez FD, la plupart des lignées du panel ont montré de la sensibilité les 2 années. Les notes variaient de 2 à 7 en année 1 et entre 1.3 et 8.7 en année 2 (cf fig. 4).

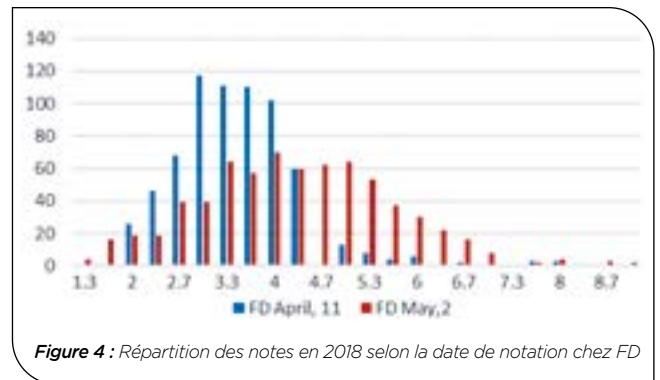


Figure 4 : Répartition des notes en 2018 selon la date de notation chez FD

Reflétant la difficulté d'assurer une infestation naturelle homogène au champ, les 2 années de phénotypage, les génotypes les plus résistants (notes 2 et moins) ne sont pas les mêmes, sauf pour TC14, porteur du gène de résistance au virus, *bdv2*. TC14, P29 (porteur de *bdv3*), Caldwell et Pesma étaient très résistants en année 1 et Tamex, TC14, Seo Yuc 1, Mandate, Edwin, Tystofte et Smaahvede étaient les plus résistants de l'année 2.

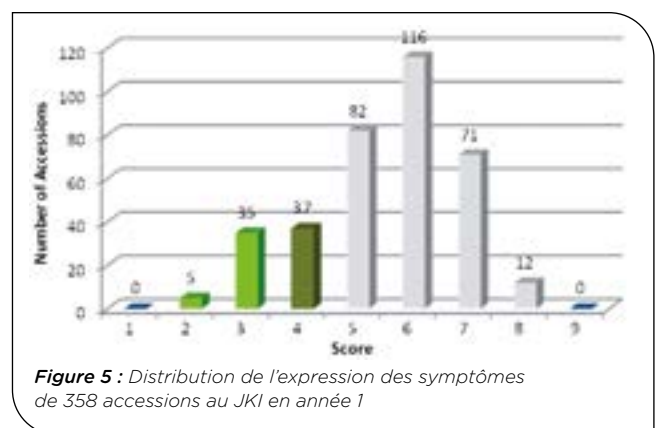


Figure 5 : Distribution de l'expression des symptômes de 358 accessions au JKI en année 1

De même, au JKI, en infection contrôlée, il n'y a pas de correspondance entre les meilleures notations des années 1 (cf Fig. 5) et 2 ; les 5 variétés les plus tolérantes en année 1 étaient Rouge d'Essex, Akasabi Shirazu, Ferrugineum 1239, Tau-Bugda et Diana alors qu'en année 2, la plupart des accessions présentaient des symptômes sévères (note > 5). Seulement 5 génotypes avaient des symptômes modérés (Tau-Bugda, Kalvi, Suben/Sultan, Olympia et le témoin Frontana, porteur du gène *bdv7*). Seul Tau-Bugda présente une bonne résistance les 2 années.

Il n'y a pas de correspondance entre le test au champ en infestation naturelle et le test en serre avec inoculation contrôlée. Au champ, en France, le taux d'infestation naturelle est très élevé mais il s'agit probablement d'une population hétérogène de pucerons, alors qu'en serre, que cela soit au JKI ou au SLU, les pucerons sont tous des *R. padi* - PAV.

##### Teneur en virus

En année 1, le taux d'extinction du virus variait de 0.6 à 1.5, avec le témoin sensible Hybnos à 0.7 ; ce qui donne un taux d'infection entre 90 et 100 %. Les génotypes avec un EX inférieur à celui du témoin résistant étaient

Akasabi Shirazu, Novaro, Ritak, Soissons, Flèche d'or, Bruneta, Cappelle Desprez, Redwin et Lira. En année 2, l'extinction virale de l'Elisa est encore plus élevée (0.8 à 1.8), reflétant l'élévation des notes de résistance et seuls 2 individus, Kharkovskaya-96 et Tsyganka présentent une extinction inférieure à 1.

La notation globale de maladie n'identifie pas les mêmes individus que la mesure de la teneur en virus.

► **Corrélation des mesures**

Le tableau 1 met en évidence une faible corrélation globale des différentes notes entre elles aussi bien entre années, qu'entre lieux ou qu'entre caractères. Les meilleures corrélations sont obtenues entre l'évaluation de la résistance aux pucerons par rapport au témoin sensible LinaR et cette même évaluation rapportée au témoin résistant Hsp5 ( $r=0.635$ ), les deux mesures d'Elisa ( $r=0.945$ ) de 2018 et les deux notes de 2018 au JKI ( $r=0.594$ ).

Les faibles corrélations entre notes entre différents lieux sont confirmées par le fait que les meilleurs individus identifiés aux champs en infestation naturelle chez FD ne correspondent pas aux meilleurs individus identifiés en infection artificielle au JKI. L'absence de corrélation entre 2 notes obtenues le même lieu, la même année au site FD ( $r=0.242$ ) mais par deux notateurs différents reflète soit une évolution significative de la maladie entre les 2 notations, soit à quel point l'évaluation de cette maladie est subjective et délicate au champ.

Ces faibles corrélations de notes de résistance à la jaunisse pointent la difficulté à définir un système de notation stable pour la résistance à la jaunisse.

► **Génétique d'association**

L'étude de génétique d'association a été menée avec les résultats de phénotypage des 2 premières années avec 162723 SNP de la puce AXIOM420K pour 689 individus.

L'ACP a révélé une structure du panel qui montre une différenciation des génotypes asiatiques (en jaune sur la figure 6) par rapport au reste du panel.

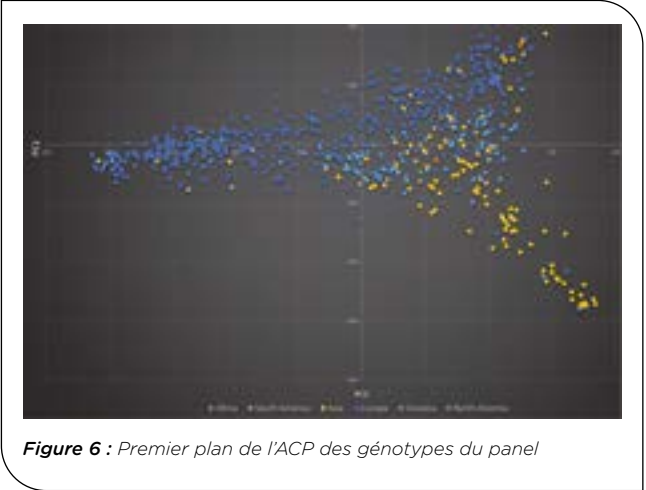


Figure 6 : Premier plan de l'ACP des génotypes du panel

A partir des données de phénotypage de 2017 et 2018, 10 Marker Trait Association (MTA) ont été mis en évidence pour 3 notes globales de la résistance (cf Tab. 2). Quatre marqueurs du chromosome 7DS se sont révélés associés à la résistance à la jaunisse au champ en 2017 chez FD, ils sont situés au niveau du gène de résistance *bdv1*. Deux marqueurs sur les chromosomes 5B et 5D sont associés à la note d'Avril 2018 de résistance au champ chez FD et 4 marqueurs des chromosomes 1AL, 3B, 4B et 2A sont associés à la résistance à la jaunisse en serre du JKI en 2017. Aucun marqueur n'est associé à la résistance aux pucerons.

Des marqueurs KASP de ces SNP associés ont été définis.

	FD17	JK17	FD18 April	FD18 May	JKI18 May	KI18 June	Virus17	Virus18 30'	Poids <i>padi</i> / LinaR
JKI17	0.020								
Virus17		0.167							
FD18 April	-0.070	<b>0.300</b>							
FD18 May	<b>0.327</b>	-0.045	<b>0.242</b>						
JKI18 May	0.023	0.025	-0.122	0.053					
JKI18 June	-0.115	0.052	-0.087	-0.050	<b>0.594</b>				
Virus18 30'					-0.032	-0.154	0.086		
Virus18 60'					-0.051	-0.154	0.039	<b>0.945</b>	
Poids <i>padi</i> / hsp5									<b>0.636</b>

Tableau 1 : Corrélation des différentes mesures entre elles.

Traits	SNP	Chrom	Position	FDR adjusted Pvalue	Effet	Allèles favorable
FD17	cfn3605518	7DS	47379368	0.009423	-0.33	T
	cfn0942021	7DS	47418481	0.031404	-0.30	G
	cfn3616466	7DS	49634722	0.016204	-0.32	A
	cfn0942454	7DS	49873100	0.018507	-0.31	A
FD18 Avril	cfn0824089	5D	466230373	0.010911	-0.40	A
	cfn0432307	5B	573808466	0.030975	-0.31	T
JKI17	cfn0691526	3B	289595455	0.000282	-0.62	G
	cfn0217220	2AL	424505257	0.000825	-0.61	G
	cfn2416298	4BL	642947963	0.000825	-0.61	A
	cfn0179114	1AL	406602404	0.000866	-0.6	C

Tableau 2 : MTA et leur effet identifiés dans le panel.

## ► Génotypage du panel

Parmi le panel, le marqueur de *bdv2/bdv3* n'a amplifié que sur les individus TC14 et P29 alors que celui de *bdv1* a amplifié 178 génotypes.

	SWM10 : <i>bdv1</i> Allèle	Autre allèle
MTA 7DS	119	3
Autre allèle	59	519

Sur les 700 individus génotypés, 638 présentent une présence ou absence conjointe du MTA 7DS et de *bdv1*. Dû à l'écart d'environ 10kb existant entre le marqueur swm10 et le MTA 7DS, 62 génotypes avec *bdv1* ou le MTA7DS ont l'autre allèle.

Le marqueur KASP wMAS000011 de la translocation 1B:1RS a mis en évidence la présence de la translocation sur 95 individus mais aucune correspondance n'a

pu être mise en évidence entre la présence de la translocation et un moindre poids de pucerons. Il n'y a pas de corrélation ( $r = -0.067$  pour %Hsp5 (témoin résistant) et  $r = 0.06$  pour %LinaR (témoin sensible)) entre le poids moyen des génotypes possédant la translocation 1B:1RS et des génotypes sans.

## ► Croisements

Les individus les plus tolérants au BYDV, TC14, P29, Caldwell, Pesma SWM89Y165H, Giza-139/Gabo-1360-323, Akasabi Shiraz et Lunshja ainsi que les génotypes tolérants à *R. padi*, Akmolinka, Agror, Djamin, Batkan Krasnaya et Domaca ont été croisés avec les individus élites Mutic, RGTRreform et Ceylon et cumulés entre eux pour ceux qui avaient été choisis en année 1. Quinze croisements ont été réalisés avec la variété Ceylon, 22 avec la variété RGTRreform et 32 avec la variété Mutic (cf Tab. 3). Puis les descendances ont été autofécondées.

Croisements réalisés sur la 1 <sup>ère</sup> sélection de génotype : nombre d'individus sélectionnés	RTG Reform	Ceylon	Mutic	
S1 [(TC14 x P29) x Akmolinka]				1
S1 [Agror x (TC14 x Pesma)]				3
S1 [Agror x (TC14 x P29)]				4
S1 [(TC14 x P29) x Djamin]				3
S1 [(TC14 x Pesma) x Djamin]				3
S1 [(TC14 x Pesma) x Akmolinka]				5
S1 [(TC14 x élite) x Akmolinka]	2	3	5	
S1 [(TC14 x élite) x Agror]	5	2	3	
S1 [(TC14 x élite) x Djamin]	3	2	2	
S1 [Agror x (élite x Pesma)]	2		5	
S1 [(élite x P29) x Djamin]	1		5	
S1 [(élite x Caldwell) x Akmolinka]	6		4	
S1 [(élite x P29) x Akmolinka]	10		8	
S1 [(élite x Caldwell) x Agror]	4		5	
S1 [(élite x P29) x Agror]	3		7	
S1 [(élite x Caldwell) x Djamin]	7		5	
S1 [(élite x Pesma) x Akmolinka]	12		9	
S1 [(élite x Pesma) x Djamin]	2		9	

Croisements réalisés sur la 2 <sup>ème</sup> sélection de génotype	RTG Reform	Ceylon	Mutic	
(TC14 x Caldwell) x élite	X	X	X	
(élite x Pesma) x Giza- 139/Gabo- 1360-323	X			
(élite x Pesma) x Lunshja	X			
(Akmolinka x élite) x Akasabi Shirazu	X	X	X	
(élite x Akmolinka) x SWM89Y165H		X	X	
(élite x Akmolinka) x Giza- 139/Gabo- 1360-323	X	X	X	
(élite x Akmolinka) x Lunshja	X	X	X	
(Agror x élite) x Akasabi Shirazu	X	X	X	
(Agror x élite) x Lunshja	X	X	X	
(Agror x élite) x Giza- 139/Gabo- 1360-323	X	X	X	
(Agror x élite) x SWM89Y165H	X	X	X	
(élite x Djamin) x Akasabi Shirazu	X	X	X	
(élite x Djamin) x Lunshja	X	X	X	
(élite x Djamin) x Giza- 139/Gabo- 1360-323		X	X	
(élite x Djamin) x SWM89Y165H			X	

Tableau 3 : Croisement réalisés.

## ► Caractérisation des parents et des croisements

	2017		2018					
	fd17	JKI17	FD April	FD May	JKI May	JKI June	% padiS	% padiR
Agror	6	-	3.7	4.7	6	5	68	98
Akmolinka	7	-	4.3	5.3	6.5	6	64	90
Djamin	66	-	4.3	4.3	5	5.5	62	109
Domaca	7	-	2.7	6.7	-	-	77	90
Batkan K	5	-	2.7	4.3	-	-	76	89
TC14.1.24.6	2	-	2	1.7	6	6	75	155
Caldwell	2	4.7	3	2	5	5.5	100	143
P29	2	5.5	3.3	2	6	6	120	217
Pesma	2	4.8	3.3	3	4.5	5	99	179
SWM89Y165H	3	4.2	3.7	3.3	5	6	102	147
Giza-Gabo	3	-	4.7	3.3	5	5	90	125
Lunshja	3	-	4	2.3	6	6	105	123
Akasabi S	5	2.0	4	4	6	6	88	139

Tableau 4 : Notations des symptômes dus au virus et du poids des pucerons.

Notations : 1 plante saine, 9 plante morte ; % padi: pourcentage relatif du poids des pucerons sur les témoins Résistant, Hsp, et Sensible, Lina. Les notes en rouge sont celles ayant présidés au choix des individus.



Le génotypage de ces individus avec les marqueurs KASPar a mis en évidence la présence des MTA suivants (cf. Tab 5).

		Génotype	MTA présents	Effet cumulé putatif des MTA (hors gènes)*	pas de génotypage pour RTGReform ; * effet moyen de -0.32 pour le 7DS
R padi résistants	2017	Agror	5B, 5D, 3B (het), 1A	-1.62	
		Akmolinka	5B, 3B (het), 4B, 1A	-1.22	
		Djain	5B (het), 5D, 3B (het), 1A	-1.465	
	2018	Domaca	5B, 5D, 1A	-1.31	
		Batkan Krasnaya	5B, 5D, 1A	-1.31	
BYDV résistants	2017	TC14	7DS, 5D, 5B, 3B (het), 1A	-1.93	
		Caldwell	5B, 5D, 5B, 3B (het), 2A, 1A	-2.23	
		P29	5B, 5D	-0.71	
		Pesma	5B, 5D, 1A	-1.31	
	2018	SWM89Y165H	7DS, 5D, 5B, 3B (het), 2A (het), 4B (het), 1A	-2.54	
		Giza- 139/Gabo- 1360-323	7DS, 5D, 5B, 3B (het), 1A	-1.93	
		Lushnja	7DS, 5D, 5B, 3B (het), 1A	-1.93	
		Akasabi Shirazu	7DS, 5D, 5B, 3B (het), 1A	-1.93	
Variétés élités receveuses	Mutic	5B, 5D, 3B (het), 2A (het), 4B (het), 1A	-2.23		
	Ceylon	5B, 5D, 3B (het) et 1A	-1.62		

**Tableau 5 :** MTA présents chez les parents et effet putatif de leur cumul sur la note de résistance.

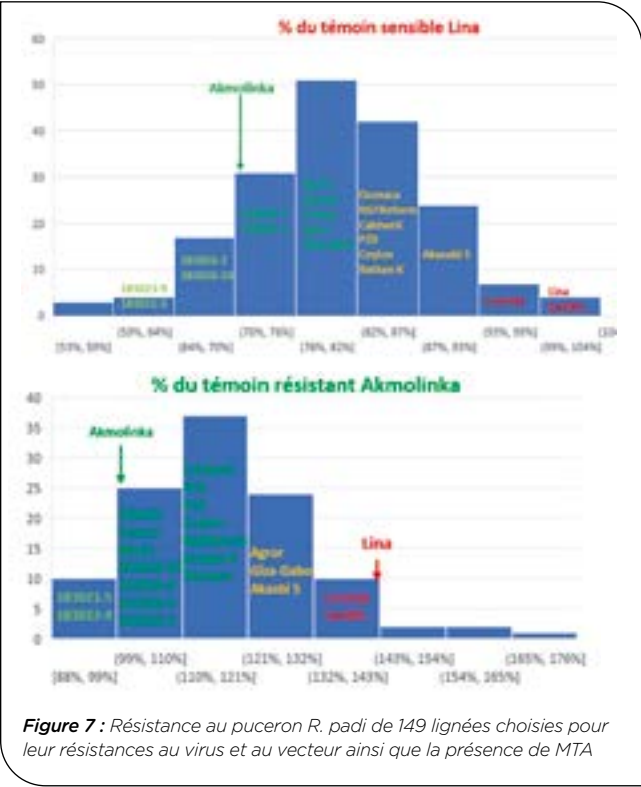
Les lignées receveuses présentent une partie des allèles favorables aux MTA de résistance identifiés. L'ensemble des descendances produites ainsi que les lignées receveuses cumulent le MTA3B à l'état hétérozygote et les MTA 5B et 1A fixés. Le MTA5B est toujours présent soit fixé soit à l'état hétérozygote alors que le MTA 7DS n'est présent qu'à l'état hétérozygote dans les croisements impliquant TC14. Les MTA 2A et 4B ne sont pas toujours présents et pas toujours fixés.

Quatre plantes de chacune des 149 lignées sélectionnées pour leur MTA et cumulant résistances au virus et au puceron ont été testées pour leur résistance aux pucerons. Les lignées élités receveuses et les génotypes résistants au virus utilisés en croisement ont également été évalués. Les plantes les plus résistantes lors de cette première notation ont été testées une 2<sup>ème</sup> fois (cf Fig. 7).

Sur les 66 lignées descendantes d'AkmoLinka, les lignées 183023-9 et 183026-10 sont les plus prometteuses pour la tolérance au puceron (poids de pucerons moindre). Parmi les 43 lignées descendantes d'Agror, 3, 183021-5, 183024-9 et 183030-4, présentent le plus faible poids de pucerons. Sur les 40 lignées descendantes de Djain, la lignée 183016-2 a le poids de pucerons le plus faible. La tolérance aux pucerons des parents AkmoLinka et Djain est confirmée mais pas celle d'Agror (2 tests de 4 plantes). Parmi les autres parents des croisements, le génotype résistant au virus, Pesma, présente une bonne tolérance au puceron ainsi que la variété receveuse Mutic à un niveau similaire à celui de l'individu résistant Djain.

Les lignées présentant une bonne tolérance au puceron possèdent également des MTA de résistance au virus (cf Tab. 6).

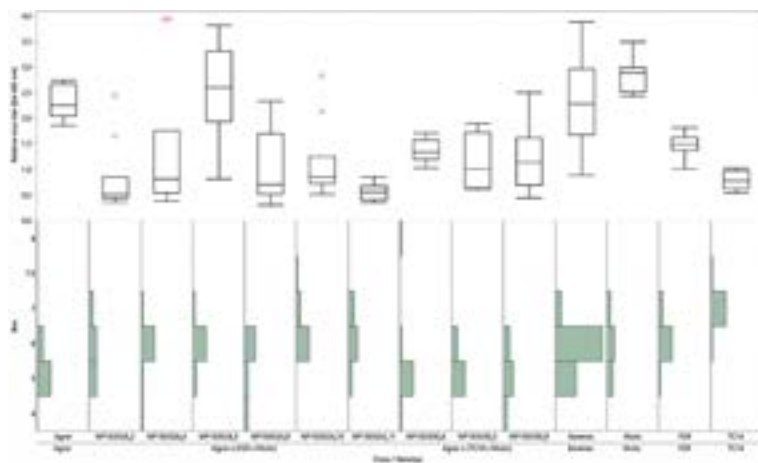
La résistance au virus des génotypes retenus et de leurs descendances a été testée en inoculation artificielle en serre au JKI et leur concentration en virus a été mesurée (cf Fig. 8). Tous les individus testés ont été infectés avec succès. On observe une large gamme de teneur en virus. TC14 et la plupart de ses descendants sont les individus avec la plus faible teneur en virus. Les lignées 183011, issues du croisement WF173006 x AkmoLinka, présentent la teneur en virus la plus élevée.



**Figure 7 :** Résistance au puceron *R. padi* de 149 lignées choisies pour leur résistances au virus et au vecteur ainsi que la présence de MTA

Descendance	Croisement	MTA présents	
		homozygotes	hétérozygotes
183023-9	AkmoLinka x (P29 x Mutic)	5B, 5D, 2A, 1A	4B, 3B
183026-10	AkmoLinka x (Mutic x Pesma)	5B, 5D, 1A	4B, 3B
183021-5	Agror x (Mutic x Caldwell)	5B, 5D, 2A, 1A	3B
183024-9	Agror x (P29 x Mutic)	7D, 5B, 5D, 2A, 1A	3B
183030-4	Agror x (TC14 x Mutic)	5B, 5D, 2A, 1A	3B
183016-2	(RTGReform x Pesma) x Djain	5D, 1A	5B, 3B

**Tableau 6 :** MTA de résistance au bydv des lignées avec une bonne tolérance au *R. padi*.



**Figure 8 :** Distribution des notes (Bon.) et des teneurs en virus [Ex] des descendance présentant une bonne résistance au puceron et une faible teneur en virus et de leur parents. Borenos, témoin sensible

On peut remarquer que la descendance du croisement Agror x (P29xMutic) présente une forte variation de la teneur en virus à l'inverse de ce que l'on observe pour les descendants du croisement Agror x (TC14xMutic). Nous pouvons supposer que cet effet est dû à la combinaison des gènes *bdv2* et *bdv1* (MTA 7DS) de TC14.

Reflétant la difficulté qu'il y a à évaluer phénotypiquement la résistance à la jaunisse nanisante de l'orge sur plante entière de blé même en conditions contrôlées, la distribution des notes met en avant des mauvaises notations pour les génotypes résistants TC14 et P29 (WF183024\_2) alors même que leur teneur en virus est faible et que leurs descendants ont des teneurs en virus faibles.

## 4 Discussion

Il est très surprenant de ne retrouver aucune association au niveau du gène *bdv2* pourtant présent dans le panel dans le génotype TC14, génotype caractérisé par la meilleure résistance en 2017 et 2018 chez FD. Une projection des marqueurs SNP de la puce TaBW420K non filtrée sur le génome de référence IWGSC\_RefSeqv1 a mis en évidence la présence d'un trou de 0.74Mb dans la répartition des marqueurs SNP au niveau de ce gène, ce qui pourrait expliquer cette absence.

Il est surprenant de ne pas voir identifié de MTA de tolérance aux pucerons alors que la translocation 1BL/1RS a amené de la résistance à *R. padi* dans PavonF76 (Crespo-Herrera *et al.*, 2013) et que la translocation 1B/1RS étaient présentes dans 95 génotypes du panel.

La présence importante du gène *bdv1* (ou MTA7DS) dans le panel est probablement due à l'effet pléiotropique de ce gène *Lr34/Yr18/Sr57/Pm38/Bdv1*. La part de résistance apportée par ce gène à la note FD2017 est minime (- 0.33) suggérant un impact faible de ce gène sur la résistance en France.

Reflétant les faibles corrélations des notes de résistance à la jaunisse entre lieux, les MTA identifiés sont spécifiques des lieux de notations. Malgré des seuils élevés de significativité, l'ensemble des MTA mis en évidence présente des effets faibles sur la note globale (variant de -0.3 à -0.62). Les MTA 5B, 5D et 3B sont d'ailleurs présents aussi chez les lignées élites receveuses confirmant leur effet faible sur la résistance globale. Des

MTA (Choudhury *et al.*, 2019) et des QTL (Ayala *et al.*, 2002) de résistance au BYDV ont déjà été décrits dans la littérature sur les chromosomes 2A et 3B mais ils ne semblent pas correspondre à ceux que nous avons identifiés. En effet, sur le 2A, le MTA de notre étude et celui de Choudhury *et al.* (2019) sont situés à 2 extrémités du chromosome (respectivement 424.5 Mb et 48.87Mb). De même, le MTA du chromosome 3B (28.95Mb) et le QTL de Ayala *et al.* (2002) situé à 631Mb ne se situent pas sur les mêmes bras chromosomiques. Aucun des QTL du projet padiJNO ne montre de correspondance avec une autre étude.

Les faibles corrélations entre les notes de résistance à la jaunisse pointent la difficulté à définir un système de notation stable pour la résistance à la jaunisse. Cette difficulté de notations aux champs reste le frein majeur à une sélection efficace de la résistance puisque même une infection contrôlée en serre insect-proof est difficile à noter et que seule la mesure Elisa de la teneur en virus semble pertinente.

Le pyramidage de résistance à un virus et à son vecteur a prouvé son efficacité contre la dissémination du begomovirus de la tomate en laboratoire (Boissot *et al.*, 2008) mais aussi en champs pour le CABYV virus du melon (Boissot *et al.*, 2015). Dans ce projet, nous avons produit des descendance combinant résistance à la jaunisse nanisante de l'orge et tolérance à son vecteur le puceron *R. padi*. Ces descendance ont été construites dans 3 receveurs différents adaptés aux conditions de culture des partenaires. Les MTA identifiés sont spécifiques des environnements et ont des effets faibles. Il serait nécessaire de les valider par une recherche de QTL sur une des descendance développées afin d'évaluer leur impact réel sur les descendance obtenues.

## 5 Conclusion

Dans ce projet, nous avons produit des descendance combinant résistance à la jaunisse nanisante de l'orge et tolérance à son vecteur le puceron *R. padi*. Ces descendance ont été construites dans 3 receveurs élites différents adaptés aux conditions de culture des partenaires. La combinaison d'une meilleure tolérance aux pucerons et des gènes de résistances à la jaunisse nanisante de l'orge, *bdv2/bdv3*, a permis d'améliorer la

résistance des descendances. En effet, des descendants de croisement combinant la meilleure tolérance aux pucerons d'Agror, Akmolinka ou Djamin et la résistance à la jaunisse apportée par le gène *bdv2/bdv3* de TC14 ou P29 ont permis d'obtenir des teneurs en virus moindre que dans les individus résistants TC14 et P29.

Les résultats de génétique d'association mériteraient d'être validés par une étude de QTL sur une des descendances produites. Des marqueurs KASP correspondant ont été développés pour permettre leur suivi durant des travaux ultérieurs.

## Références bibliographiques

- Ayala I, Henry M, van Ginkel M, Singh R, Keller, B, Khairallah M** (2002) Identification of QTLs for BYDV tolerance in bread wheat. *Euphytica* 128:249-259
- d'Arcy CJ** (1995) Symptomatology and host range of barley yellow dwarf. In: d'ArcyCJ, BurnettPA, eds. *Barley Yellow Dwarf, 40 Years of Progress*. St Paul, MN, USA: APS Press, 9-28.
- Barloy D, Etienne C, Lemoine J, Saint Ouen Y, Jahier J, Banks PM, Trottet M** (2003) Comparison of TAF46 and Zhong 5 resistances to barley yellow dwarf virus from *Thinopyrum intermedium* in wheat. *Euphytica* 129 :361-369
- Boissot N, Urbino C, Dintinger J, Pavis C** (2008). Vector and graft inoculations of Potato yellow mosaic virus reveal recessive resistance in *Solanum pimpinellifolium*. *Ann Appl Biol*. 152 :263-269.
- Boissot N, Schoeny A, Millot P, Wipf-Scheibel C, Nozeran K, Lecoq H, Fabre F** (2015) Gérer les épidémies virales en combinant résistances aux virus et résistances aux pucerons : quel intérêt ? *Innovations Agronomiques* 46 117-125.
- Bossolini E, Krattinger SG, Keller B** (2006) Development of SSR markers specific for the Lr34 resistance region of wheat using sequence information from rice and *Aegilops tauschii*. *Theor Appl Genet* 113:1049-1062
- Chain F, Riault, G, Jacquot E, Trottet M** (2006) Field trial of serially passaged isolates of BYDV-PAV overcoming resistance derived from *Thinopyrum intermedium* in wheat. *Plant Breeding* 125:212-216.
- Choudhury S, Larkin P, Xu R, Hayden M, Forrest K, Meinke H, Hu H, Zhou M, Fanet Y** (2019) Genome wide association study reveals novel QTL for barley yellow dwarf virus resistance in wheat *BMC Genomics* 20:891
- Crespo-Herrera LA, Smith CM, Singh R, Åhman I** (2013). Resistance to multiple cereal aphids in wheat-alien substitution and translocation lines. *Arthropod-Plant Interactions*, 7: 535-545
- Crespo-Herrera LA, Akhunov E, Garkava-Gustavsson L, Jordan KW, Smith CM, Singh RP, Åhman I** (2014a) Mapping resistance to the bird cherry-oat aphid and the greenbug in wheat using sequence-based genotyping. *Theor Appl Genet* 127:1963-197
- Crespo-Herrera LA, Singh R, Åhman I** (2014b) Field population development of bird cherry-oat aphid and greenbug (Hemiptera: Aphididae) on wheat-alien substitution and translocation lines. *Euphytica* 203: 249-260.
- Kong L, Anderson J, Ohm H** (2009) Segregation distortion in common wheat of a segment of *Thinopyrum intermedium* chromosome 7E carrying *Bdv3* and development of a *Bdv3* marker. *Plant Breeding* 128:591-597
- Lipka AE, Tian F, Wang Q, Peiffer J, Li M, Bradbury PJ, Gore MA, Buckler ES, Zhang Z** (2012) GAPIT: genome association and prediction integrated tool. *Bioinformatics* 28: 2397-2399.
- Mehrabi S, Åhman I, Jonsson I** (2014) Transcript abundance of resistance- and susceptibility-related genes in a barley breeding pedigree with partial resistance to the bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi* L.). *Euphytica* 198: 211-222.
- Quisenberry SS and Ni X** (2007) "Feeding Injury." In *Aphids as Crop Pests*, edited by H. van Emden and R. Harrington, 331-352. Willingford, UK: CAB International.
- Riedell WE, Kieckhefer RW, Langham MAC, Hesler LS** (2003) Root and shoot responses to bird cherry-oat aphids and barley yellow dwarf virus in spring wheat. *Crop Sci* 43:1380-1386
- Sharma HC, Ohm HW, Perry KL** (1997) Registration of barley yellow dwarf virus resistant wheat germplasm line P29. *Crop Science* 37: 1032-1033
- Singh RP, Burnett PA, Albarrán M, Rajaram S** (1993) *Bdv1*: A gene for tolerance to barley yellow dwarf virus in bread wheats. *Crop Science* 33; 231-234
- Trębicki P, Nancarrow N, Cole E, Bosque-Pérez NA, Constable FE, Freeman AJ, Rodoni B, Yen AL, Luck JE, Fitzgerald GJ** (2015), Virus disease in wheat predicted to increase with a changing climate. *Global Change Biology*, 21: 3511-3519.
- Voss TS, Kieckhefer RW, Fuller BW, Mcleod MJ, Beck DA** (1997) Yield losses in maturing spring wheat caused by cereal APHIDS (Homoptera: Aphididae) under laboratory conditions. *J Econ Entomol* 90:1346-1350
- Wang RRC and Zhang XY** (1996) Characterization of the translocated chromosome using fluorescence in situ hybridization and random amplified polymorphic DNA on two *Triticum aestivum*-*Thinopyrum intermedium* translocation lines resistant to wheat streak mosaic or barley yellow dwarf virus. *Chromosome Research* 4:583-587.



57

# TakeNOTail : Caractérisation de la résistance variétale des céréales à paille au Piétin-Échaudage et prédiction du risque

Romain VALADE<sup>1\*</sup>, Cloé ADAM<sup>1</sup>, Oriane BAUDOUIN<sup>1</sup>, Philippe DU CHEYRON<sup>1</sup>, Eric MASSON<sup>1</sup>, Agnès TREGUIER<sup>1</sup>, Quentin CROULLEBOIS<sup>2</sup>, Laure DUCHALAIS<sup>3</sup>, Benoît FOUCAULT<sup>4</sup>, Cindy VITRY<sup>1</sup>

1 - ARVALIS- Institut du Végétal, 3 rue Joseph et Marie Hackin, 75016 PARIS

2 - SECOBRA Recherches, Centre de Bois-Henry, 78580 Maule

3 - RAGT 2N, Route Epincy, 28150 Louville-la-Chenard

4 - KWS MOMONT, 1 rue Maurice Violette, 28150 Allonnes

\*Coordinateur : Romain VALADE, r.valade@arvalis.fr

## 1 Introduction

Le piétin-échaudage (Take-all), causé par le champignon tellurique *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt), est la maladie racinaire du blé causant les plus importantes pertes économiques en France et dans le monde entier (Freeman *et al.*, 2004). Le champignon est également capable d'infecter le triticale, l'orge, le seigle et d'autres graminées (Cook, 2003). Signalé pour la première fois en 1852 dans le sud de l'Australie, le nom « take-all » est utilisé dès 1870 suite à la découverte de champs de blé entièrement ravagés par une sévère brûlure de semis (seedling blight). En 1890, Prilleux et Delacroix identifient le champignon comme étant *Ophiobolus graminis*. Au fil des avancées scientifiques et des observations, le genre *Gaeumannomyces* a été établi et le champignon renommé *Gaeumannomyces graminis*. Ensuite, en comparant des souches provoquant des symptômes sur différentes espèces de graminées, Walker conclut, en 1972, qu'elles appartiennent à des pathovars différents. Le champignon responsable du piétin-échaudage du blé est alors décrit comme le pathovar *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt). Dans l'espèce *Gaeumannomyces graminis*, quatre sous-espèces ont été décrites. Les différences se basent notamment sur l'hôte, la pathogénicité ou encore la taille des ascospores :

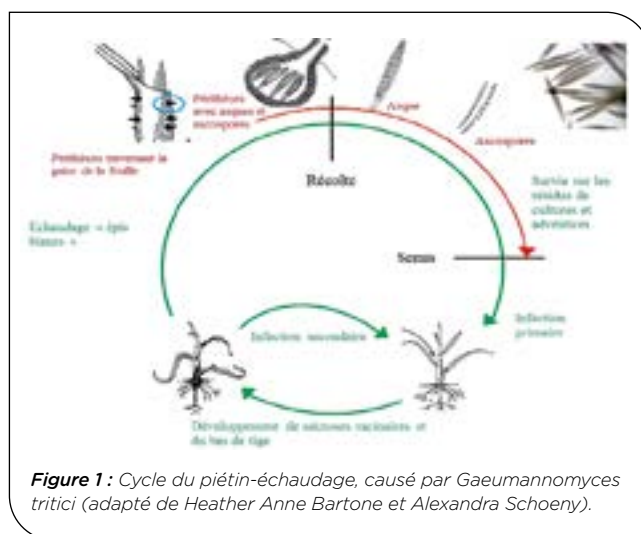
- *G. graminis* var. *tritici* (Ggt) : Espèce la plus agressive et attaque les céréales à paille et un grand nombre de graminées adventices. Il ne peut pas infecter l'avoine. En effet, l'avoine synthétise quatre phytoanticipines avénacines A-1, A-2, B-1 et B-2 présentant des propriétés antifongiques, au niveau racinaire.
- *G. graminis* var. *avenae* (Gga) : Il attaque principalement l'avoine. Gga est le seul à posséder une enzyme, l'avenacinase, qui va hydrolyser les molécules d'avénacines et ainsi lui permettre d'attaquer l'avoine. Il infecte également les céréales à paille (blé et orge) mais est beaucoup moins agressif.
- *G. graminis* var. *graminis* (Ggg) : Gazon, riz, chiendent et autres adventices.
- *G. graminis* var. *maydis* (Ggm) : Maïs et peut infecter le sorgho et d'autres céréales à la marge.

En 2016, Hernández-Restrepo *et al.*, suite à une étude taxonomique, concluent qu'il ne s'agit pas de trois

pathovars différents mais de trois espèces différentes. Le nouveau nom proposé est donc *Gaeumannomyces tritici* pour le piétin-échaudage du blé.

Au sein de Ggt, deux groupes génétiques existent : G1 et G2. Ils peuvent être présents en même temps dans le sol. Cependant, le génotype G1 est plus fréquemment rencontré en première année de culture alors qu'un pic du génotype G2 peut être observé en 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> année de culture. Le génotype G2 a pour particularité d'être plus agressif. Ces deux groupes sont différenciés par des outils moléculaires (INRA, Lebreton *et al.* 2004, 2007).

Le développement du piétin-échaudage comporte une phase de reproduction asexuée et une phase de reproduction sexuée (Figure 1). La majeure partie du cycle est effectuée dans le sol, à une profondeur de 5-10 cm. *G. tritici* est capable de survivre sous forme mycélienne sur les résidus de culture jusqu'à deux ans sans hôte intermédiaire, selon les conditions pédoclimatiques ; en sol chaud et humide (30°C et -0,3 MPa), en revanche, il est éliminé en moins de trois mois. Ce n'est pas un champignon compétitif et sa croissance à travers le sol est très limitée, ce qui explique que la maladie est souvent en foyer et liée à une rotation culturale riche en céréales à paille.



La contamination a lieu lorsque des racines saines entrent en contact avec le mycélium présent dans le sol, qui constitue alors l'inoculum primaire. Pour les blés d'hiver, l'infection primaire débute en automne

et des nécroses peuvent apparaître peu de temps après la levée. Le froid de la période hivernale stoppe le développement du champignon qui reprend au printemps, avec le réchauffement du sol et la reprise de la végétation. La propagation de la maladie est assurée par l'infection secondaire : le champignon se développe par contamination des racines saines avec des racines infectées de la même plante (auto-infection) ou d'une plante voisine (allo-infection). En été, le champignon reprend un mode de vie saprophytique sur les racines nécrosées et les tissus desséchés, formant un manchon noir à la base des tiges. La reproduction sexuée a très probablement un rôle assez mineur dans l'épidémiologie de la maladie. En effet, les ascospores (organes de dissémination du champignon en phase sexuée) ne se forment à la base des tiges que quelques semaines avant la moisson. En revanche, ils participent certainement à la contamination des repousses de céréales ou des adventices qui risquent à leur tour de contaminer la culture de blé suivante.

L'inoculum primaire du champignon dépend de l'historique cultural et joue un rôle majeur dans le développement de la maladie. Dans la rotation culturale peuvent se succéder des plantes hôtes, non hôtes et amplificatrices. Les plantes hôtes (céréales à paille) favorisent le développement de la maladie, contrairement aux plantes non hôtes (pois, betterave, luzerne) qui tendent à le diminuer. Les plantes amplificatrices telles que le maïs augmentent le risque en modifiant la composition du microbiote (ensemble des micro-organismes) du sol dans un sens favorable à la maladie. Ainsi, la maladie sera plus fréquente et intense dans des rotations très courtes en céréales à paille, notamment pour la seconde paille car la quantité d'inoculum primaire sera déjà très élevée au moment du semis de la seconde paille. Au contraire, diminuer la fréquence de retour des plantes hôtes permet de réduire la sévérité et l'incidence de la maladie.

Cependant, il a été montré que, dans le cas d'une monoculture de blé, au bout de la quatrième année (ou un peu plus tard, suivant le site) une diminution des symptômes de la maladie est constatée. Ce phénomène, dit « déclin du piétin-échaudage » (ou *TAD pour take-all decline*), s'explique par des modifications du microbiote du sol qui favorisent notamment des bactéries antagonistes de *G. tritici* telles que *Pseudomonas* spp., et aussi par des modifications de la composition des populations de *G. tritici*.

Le champignon pénètre à l'intérieur des racines et altère les vaisseaux du xylème : la plante ne peut donc plus puiser correctement dans le sol l'eau et les nutriments nécessaires à sa croissance et à son développement. Lors d'attaque précoce en reprise de végétation, les plantes sont chétives, moins développées et jaunissantes ; une réduction du tallage peut également être observée. Une forte attaque peut conduire à la perte précoce des plantes, sinon à l'arrêt plus ou moins total du remplissage des grains ou de leur maturation, et peut s'accompagner d'un blanchiment des épis - un symptôme caractéristique apparaissant surtout en cas de stress hydrique prononcé ; cependant, ce symptôme n'est pas systématique, même en cas de forte infestation des racines. Au niveau de la parcelle, la maladie entraîne l'apparition de foyers faisant moins

d'un mètre ou formant de grandes zones irrégulières se rejoignant. Ces zones sont généralement trouvées au niveau des andains de paille du précédent ou de l'antépécédent.

L'observation minutieuse du système racinaire permet de déceler précocement la maladie. En effet, le champignon provoque des nécroses prenant l'aspect de manchons noirs sur les racines. Au niveau des jeunes racines, les nécroses se caractérisent par une coloration intense de la stèle mais pas du cortex, ce qui permet de différencier les symptômes causés par *G. tritici* des symptômes causés par d'autres agents pathogènes comme *Helminthosporium sativum* ou *Fusarium* spp. Une nécrose allant de 1 à 3 cm peut également apparaître en bas de tige, signe de la progression du champignon.

Le blé et l'orge sont les espèces les plus sensibles (Cook, 1994) alors que la sensibilité est très variable pour le triticale (Wallwork, 1989) et faible pour le seigle (Scott, 1981). Au sein de ces espèces, peu de différences variétales ont été observées dans les études menées dans les années 1990 (Cook *et al.*, 1995 ; Hornby *et al.*, 1998 ; Weller *et al.*, 2002). Néanmoins, des données obtenues dans le réseau d'Arvalis et des études récentes suggèrent une possible différence variétale dans la résistance au piétin-échaudage. Or, il est très difficile d'évaluer les variétés pour cette caractéristique. En effet, le piétin-échaudage est une maladie qui se disperse peu (Willoquet *et al.*, 2008) ce qui entraîne des pressions peu homogènes dans les essais au champ. De plus, le phénomène de Take-All Decline (TAD) décrit par Slope et Cox (1964) empêche également d'avoir une pression stable entre les années même dans des essais en monoculture de blé.

Prédire le risque qu'une maladie va atteindre le seuil économique critique est un enjeu important dans sa gestion. Il est communément admis que le taux initial d'inoculum de Ggt est important dans le développement de la maladie et que ce taux est déterminé par l'historique cultural, la sévérité de la maladie sur le précédent et le taux de décomposition de l'inoculum (Hornby, 1998). La sévérité de la maladie est souvent faible en première céréale mais peut être très forte en deuxième céréale. Néanmoins, de forts effets saisonniers agissent sur la sévérité de la maladie même en seconde céréale (Werker *et al.*, 1990). En effet, des interactions complexes entre les facteurs climatiques agissent sur les épidémies de piétin échaudage même si l'humidité du sol semble plus importante que la température (Roget *et al.*, 1991 ; Smiley, 2009). Néanmoins, des études récentes basées sur la quantification moléculaire du champignon dans les sols et des tests biologiques sols ont montré que ces méthodes sont potentiellement efficaces pour prédire le risque piétin-échaudage d'une parcelle (Herdina et Roget, 2000 ; Bithell *et al.*, 2012).

Prédire le risque nécessite également de pouvoir préconiser les espèces et variétés les plus optimum pour diminuer la sévérité de la maladie. Connaître la résistance des variétés est donc importante mais un autre critère est potentiellement aussi important pour le piétin-échaudage : le « Take-All inoculum Build-up », abrégé TAB (McMillan *et al.*, 2011). Ce trait décrit la capacité d'une variété ou d'une espèce à accumuler



de l'inoculum dans le sol au cours de sa culture. En Angleterre, McMillan *et al.* (2011) ont montré des différences dans la capacité des variétés élites anglaises de blé à constituer de l'inoculum pour la culture suivante. Ainsi, connaître les variétés et les espèces les moins accumulatrices en inoculum permettraient de les préconiser en première céréale afin de réduire le risque pour la céréale suivante (McMillan *et al.*, 2011).

Dans ce projet, axé principalement sur de la méthodologie pour travailler la problématique du piétin-échaudage en sélection, nous avons testé différentes méthodes permettant de caractériser les variétés de céréales à paille vis-à-vis du Ggt et de mieux anticiper le risque piétin échaudage en seconde céréale. Ainsi, cette étude s'articule autour de deux axes de recherche. Le premier vise à mettre au point des méthodes permettant de caractériser le potentiel en inoculum d'une parcelle et d'évaluer la variabilité intra-spécifique et inter-spécifique dans la constitution de l'inoculum (« TAB trait »). Le second objectif consiste à mettre au point une méthode efficace pour évaluer les variétés et ainsi potentiellement caractériser la tolérance variétale de différentes variétés de blé tendre, orge et triticale.

## 2 Matériel et méthode

Dans ce projet, nous avons testé deux outils : (i) un test moléculaire par PCR quantitative (Ophel-Keller *et al.*, 2008 ; Bithell *et al.*, 2012) et (ii) un test biologique sol (décrit pour la première fois par Hornby *et al.*, 1981) potentiellement utiles pour caractériser l'inoculum du sol, la maladie et les essais.

### ► 1. Mise au point d'une méthode qPCR

Les souches de *G. graminis* var. *tritici* utilisées proviennent de la mycothèque du laboratoire de phytopathologie d'Arvalis-Institut du végétal. Les souches de *G. graminis* var. *avenae* et *G. graminis* var. *graminis* proviennent du Westerdijk Fungal Bio Diversity Institute (anciennement CBS). Les souches sont mises en collection sous forme de plug de mycélium dans des tubes contenant du glycérol à 20 % et de l'huile minérale et conservées respectivement à -20°C et 4°C. La culture des champignons se fait sur un milieu Potato Dextrose Agar (PDA) à 20°C, avec 70 % d'hygrométrie et à l'obscurité.

#### 2.1.1 - Extraction de l'ADN de *G. graminis* var. *tritici*, *G. graminis* var. *avenae*, *G. graminis* var. *graminis*

Une fois que le mycélium a recouvert la totalité du milieu de culture, celui-ci est gratté à l'aide d'une spatule stérile, mis dans un tube eppendorf de 2 mL et placé à -80°C au minimum une nuit. Le mycélium est ensuite lyophilisé grâce au Lyovac GT 2-E de STERIS pendant une durée minimum de 24h. L'échantillon est broyé à l'aide du broyeur MM400 de Retsch® (fréquence 30s<sup>-1</sup>, durée 40 sec) puis 40 à 50 mg de poudre sont pesés et utilisés pour réaliser l'extraction. L'extraction est réalisée suivant le protocole du DNeasy Plant Mini Kit de QIAGEN optimisé par Arvalis-Institut du végétal. Le dosage de l'ADN ainsi extrait est réalisé par spectrophotométrie grâce au Nanodrop®. La qualité de l'extraction est appréciée grâce à la qualité protéique et nucléique données respectivement par les rapports 260/280 et 260/230.

#### 2.1.2 - Séquençage des souches

Dans le cadre de ce projet trois gènes : internal transcribed spacer (ITS), RNA polymerase II (RPB2) et elongation factor 1-alpha (EF1-α) ont été séquencés. Pour l'amplification des gènes ITS (ITS-1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') et ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')), et RPB2 (RPB2-newF et RPB2-newR, en cours de publication), le programme d'amplification est identique avec une hybridation à 60°C pendant 1 min30 et une élongation à 72°C pendant 1min avec 35 cycles. Le gène EF1-α est amplifié grâce aux amorces GGT-EF1-1567R (5'- ACHGT RCCRATACCACC SATCTT-3') et GGT-EF1-983F (5'- GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT-3') (Rehner *et al.*, 2005). La seule différence par rapport au programme précédent se situe dans la température d'hybridation (53°C). La PCR est réalisée dans un volume réactionnel de 40 µL. La quantité d'ADN ajoutée est de 60 ng, le mix est composé de 4 µL de Q solution, 20 µL de la solution contenant l'enzyme et de 1 µL de chaque amorce à une concentration de 10 µM. Le volume d'eau ultra pure est ajusté à 40 µL en fonction du volume d'ADN ajouté. Les souches sont séquencées par la société Eurofins Genomics à partir des produits PCR non purifiés (15 µL). Les séquences ont ensuite été analysées et alignées à l'aide du logiciel Bioedit sequence alignment editor. Le logiciel Phylogeny (<http://www.phylogeny.fr/>) a permis de réaliser les arbres phylogénétiques selon la méthode du Neighbor-Joining. Les arbres phylogénétiques incluent comme outgroup *Magnaporthe grisea*, champignon phytopathogène de la famille des *Magnaporthaceae* responsable de la pyriculariose chez le riz (N° accession GenBank RPB2 : XM\_003710773 ; EF1-α : XM\_003716200 et ITS : KM484882.1, KM484880.1).

#### 2.1.3 - Détection et quantification du champignon *G. graminis* var. *tritici* par PCR en temps réel

L'internalisation de la qPCR spécifique à Ggt est basée sur les travaux de Keenan *et al.* (2015). Le gène cible est le gène EF1-α. La taille de l'amplicon, obtenu grâce aux amorces GgtEFF1 (5'-CCCTGCAAGCTCTTCTCTTAG-3') et GgtEFR1 (5'-GCATGCGAGGTCCCCAAA-3') est de 106 paires de bases (pb). Le système est complété par une sonde Taqman\_MGB (5'-[FAM] ACTGCACAGACCATC[MGBEQ]-3').

La souche D12020 a été choisie pour la mise au point de la méthode moléculaire. Une gamme de 4 points (5 ng, 0,5 ng, 0,05 ng et 0,005 ng), obtenue par des dilutions en cascade est réalisée.

Tous les tests réalisés ont été basés sur les recommandations de la norme Afnor NF V03-110 (procédure de validation intra-laboratoire d'une méthode alternative à partir d'une méthode de référence), du guide COFRAC (Détection des ADN issus d'OGM végétaux) et du The MIQE Guideline (Bustin *et al.*, 2009). Ainsi, différentes expérimentations ont été réalisées pour optimiser la concentration des amorces et sondes, vérifier la spécificité du système, valider la droite de calibration (linéarité, normalité, reproductibilité et répétabilité) et déterminer les limites de détection et quantification. L'ensemble de ces étapes a été publié (Adam *et al.*, 2018, rapport de stage) et n'est pas détaillé dans ce matériel et méthode.

#### 4 - Mise au point de la méthode à partir d'un échantillon de sol

Un des objectifs de la méthode qPCR est de pouvoir l'utiliser sur du sol. Ainsi, dans le cadre de ce projet, nous avons essayé de développer un protocole robuste permettant de quantifier le champignon dans le sol.

Un sol a été prélevé sur l'arboretum du site de l'AgroParisTech de Thiverval-Grignon, zone n'ayant jamais servi à la culture des céréales à pailles et ayant un risque nul en Ggt. Il a été autoclavé, mis à l'étuve à 50°C pendant deux jours, tamisé puis stocké dans un sachet plastique à température ambiante.

La souche de Ggt utilisée pour inoculer la terre est la D112020. Une gamme de six points a été réalisée : 20 -10 - 5 - 2 - 1 - 0,2 mg de mycélium/g de sol. La masse de mycélium a été directement ajoutée dans le tube contenant 5g ou 500mg de sol suivant le kit testé.

Trois kits d'extraction d'ADN à partir d'un échantillon de sol ont été testés : DNeasy PowerMax Soil Kit de Qiagen, FastDNA™ 50 mL Spin Kit for Soil de MP Biomedicals et NucleoSpin® Soil Kit de Macherey-Nagel. Les quantités de sols nécessaires varient d'un kit à l'autre, il faut 5g de sol sec pour les kits Qiagen et MP Biomedicals et 500 mg pour le kit Macherey-Nagel. Les principales différences entre les kits sont la technique de lyse cellulaire mécanique, les tampons utilisés et les colonnes. Le broyage pour le kit Qiagen a été réalisé en vortexant dix minutes à vitesse maximale. Les échantillons pour les kits Macherey-Nagel et MP Biomedicals ont été broyés à l'aide du FastPrep-24 Instrument (MP Biomedicals) avec respectivement des billes en céramique deux fois 40 secondes à 6 m/s et des pierres de grenat une fois 40 secondes à 4 m/s.

Pour essayer d'éliminer la présence d'inhibiteurs dans la solution d'ADN extrait, une filtration sur colonne de PVPP (Poly(VinylPolyPyrrolidone), Fluka Analytical) à 10 % a également été réalisée (protocole Arvalis).

#### ► 2. Mise au point du test biologique

Décrite pour la première fois par Horby *et al.*, 1981, la méthode consiste à semer une variété sensible de blé dans des échantillons de sols suspects en conditions contrôlées et à noter le pourcentage de racines et de plantes présentant des symptômes après 5 semaines de cultures (Slope *et al.*, 1979 ; Gutteridge *et al.* ; 2008 ; McMillan *et al.*, 2011). Afin de valider les conditions du test qui permettent d'observer des symptômes de piétin-échaudage sur une variété rapportrice, différents tests ont été réalisés.

Ils ont consisté à utiliser différentes méthodes d'inoculation et à identifier une variété sensible à partir d'un sol autoclavé :

- Grains d'orge contaminés à différentes concentrations équivalent à 1.5 gramme/m<sup>2</sup>, 3 g/m<sup>2</sup> et 6 g/m<sup>2</sup> répartis sur une couche ou homogène dans le pot
- Plugs de mycélium

Les variétés testées ont été Hereward et Boregar en semant graines par pot en trois répétitions

Après le semis, les pots ont été placés dans une serre avec des conditions de 15°C jour et 10°C nuit pendant 5 semaines. Ensuite, les racines ont été soigneusement lavées et notées selon une échelle de 1 à 4 (figure 2).

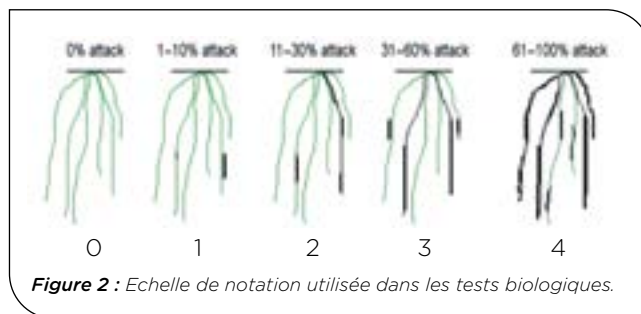


Figure 2 : Echelle de notation utilisée dans les tests biologiques.

#### ► 3. Mise au point d'une méthode de contamination artificielle au champ

Le LPV maîtrisant déjà la production d'inoculum (Lucas *et al.* 1989), ce dernier a produit des inocula avec la souche D113012, Ggt issu de de la mycothèque d'Arvalis. La souche sélectionnée était un isolat du groupe génétique G2 (caractérisée moléculairement (Daval *et al.*, 2010)), groupe génétique qui contient les isolats les plus agressifs en conditions naturelles (Lebreton *et al.*, 2004, 2007 ; Willocket *et al.*, 2008). En année 1 et 2, 4 essais ont été réalisés chez les différents partenaires (Maule (78), Ecardenville-la-Campagne (27), Louville-la-Chenarde (28) et Allonnes (28)). Dans chacun des essais, 5 variétés de blé tendre ont été choisies (Boregar, Barok, Nemo, Oregrain et Rubisko) grâce aux données préliminaires obtenues dans le réseau Arvalis en extrémissant au maximum les potentielles différences variétales. Sur le site Arvalis d'Ecardenville-la-Campagne, en plus des 5 variétés de blé tendre, 2 variétés d'orge (Etincel et KWS Cassia) et 2 variétés de triticales (RGT Eleac et Kereon) ont également été testées. Toutes ces variétés ont été semées en 6 lignes et 3 répétitions. 3 modalités d'inoculation ont été testées (Tableau 1).

Lieux	Année 1	Année 2
Louville la Chenard (28)	Témoin non-inoculé 1,5 g/m <sup>2</sup> 3 g/m <sup>2</sup>	Témoin non-inoculé 3 g/m <sup>2</sup> 6 g/m <sup>2</sup>
Allonnes (28)		
Maule (78)		
Ecardenville la Campagne (27)		

Tableau 1 : Sites des essais inoculés et modalités testées.

L'inoculation a été réalisée en épandant des grains d'orge inoculés par la souche de Ggt. Des notations des racines ont été réalisées à 3 dates pour 25 plantes par microparcelle (stade tallage, elongation et floraison) et ont permis de calculer le TAI (Take-all index) selon la méthode décrite par Schoeny et Lucas (1999). Cet indice est calculé à partir des notes de la façon suivante :

- 0 : aucune racine atteinte
- 1 : jusqu'à 10 % des racines atteintes
- 2 : 10-30 % de racines atteintes
- 3 : 31-60 % de racines atteintes
- 4 : 61-100 % de racines atteintes

TAI = [(0\*N de 0 plantes) + (10\*N 1 plantes) + (30\*N 2 plantes) + (60\*N 3 plantes) + (100\*N 4 plantes)] / Nombre total de plantes avec N le nombre de plantes pour chaque indice.

#### ► 4. Mise au point d'une méthode d'évaluation de la sensibilité variétale sans inoculation

En parallèle de la mise au point d'essais inoculés et afin d'augmenter les chances de mettre au point une méthode efficace pour caractériser les variétés, les mêmes variétés de blé tendre ont été semées en 3 répétitions les deux premières années du projet dans quatre parcelles connues pour être à risque. Afin de maximiser les chances d'infection par le Ggt, les semis ont été très précoces et ont eu lieu dans des parcelles ayant reçues un ou plusieurs blés (maximum 3 pour éviter le TAD). De plus, l'inoculum initial (avant semis) et final (après récolte) de chaque parcelle a également été déterminé par un test biologique sol afin de caractériser les sols pour leur potentiel infectieux.

Les notations réalisées sont les mêmes que dans le 2.3 (essais inoculés) et une analyse de rendement a été faite dans les quatre sites.

#### ► 5. Caractérisation des espèces et des variétés pour leur capacité au TAB

McMillan *et al.* (2011) ont montré des différences entre les variétés de blé dans leur capacité à entretenir l'inoculum de piétin-échaudage pour la culture suivante.

Ce trait a été évalué pour les cinq variétés de blé tendre semées dans les essais en conditions favorables en 2018 et 2019 (cf. 2.4). Il a également été évalué pour 10 autres génotypes semés dans trois essais variétés d'ARVALIS (Ouzouer le Marché (41), La Jaillière (44) et le Magneraud (17)). En complément, en 2018-2019, un essai avec la variété Boregar a été réalisé en ayant en précédent les différents génotypes testés en 2017/2018 afin de regarder, in situ, l'effet de ces génotypes comme précédent.

Pour caractériser ce trait, des prélèvements de sols ont été réalisés au semis et à la récolte dans l'ensemble des essais en adaptant le protocole de McMillan *et al.* (2011). A l'aide d'une tarière, il a été prélevé du sol sur 10 à 15 cm de profondeur. Ce sol a ensuite été mis dans un gobelet en carton. Le prélèvement a été effectué 6 fois par parcelle élémentaire afin de prendre en compte l'hétérogénéité de l'inoculum dans le sol. Les pots ont ensuite été envoyés au LPV et conservés à 4°C en attendant d'être analysés. L'analyse a consisté à semer 5 graines de la variété Boregar, placer les pots 5 semaines dans la serre puis noter le pourcentage de racines nécrosées (cf. 2.2).

## 3 Résultats

### ► 1. Mise au point de la méthode qPCR

#### 3.1.1 - Validation des amorces de Keenan *et al.* (2015)

Le gène EF1- $\alpha$  est le gène cible théorique de la qPCR publiée par Keenan *et al.* 2015. Cependant, les analyses bio-informatiques ont révélé qu'il n'y avait aucune correspondance entre les amorces amplifiant le gène EF1- $\alpha$  de la qPCR publié par Keenan *et al.* (2015) et le génome de référence de Ggt R3-111a-1 (Okagaki *et al.*, 2015). Le BLAST des amorces fait ressortir une multitude d'organismes (*Triticum aestivum*, *Pongo pygmaeus*, *Ovis canadensis canadensis*, *Cyphellophora europaea*, *Bos mutus*, etc.). Un séquençage a été réalisé dans l'optique

de répondre aux interrogations qui résultent de cette découverte et de potentiellement pouvoir dessiner un couple d'amorces spécifique de Ggt. Les différentes souches de Ggt, Gga et Ggg de la collection d'Arvalis ont alors été séquencées pour trois gènes EF1- $\alpha$ , RPB2 et ITS. Le gène ITS est un gène multicopies et le gène RPB2 est un gène monocopie constitutif. Ce sont tous les deux des gènes universels chez les eucaryotes.

Le BLAST de toutes les séquences du gène EF1- $\alpha$  des souches de Ggt de la collection d'Arvalis contre la séquence du gène EF1- $\alpha$  du génome de référence Ggt R3-111a-1 (N° accession GenBank : XM\_009226093.1) a mis en évidence 100 % d'identité entre les séquences. Les amorces de Keenan *et al.* ne blastent pas avec nos séquences confirmant les analyses bioinformatiques et suggérant donc une erreur dans la publication. Ce résultat a été confirmé par la suite dans une autre publication (Duran *et al.*, 2018). Aucun polymorphisme intraspécifique n'est observable dans les séquences de Ggt mais le polymorphisme interspécifique (entre les différentes espèces) n'a pas permis de dessiner de nouvelles amorces dans ce gène.

Pour le gène RPB2, l'analyse des séquences des souches de Ggt de la collection d'Arvalis avec le génome de référence Ggt R3-111a-1 a mis en évidence 96 % d'identité entre les séquences et permis de confirmer le statut taxonomique des souches de la collection. Néanmoins, les analyses n'ont pas mis en évidence la possibilité de dessiner des amorces spécifiques de Ggt dans ce gène.

L'analyse de toutes les séquences des souches de Ggt de la collection d'Arvalis contre la séquence du gène ITS du génome de référence Ggt R3-111a-1 a mis en évidence 100 % d'identité entre les séquences et sont donc bien identifiées comme étant du Ggt. Comme pour les autres gènes, le polymorphisme interspécifique n'a pas permis de dessiner d'autres amorces.

#### 3.1.2 - Qualité et fiabilité de la méthode

Malgré les interrogations liées aux amorces de la publication de Keenan *et al.* (2015), nous avons effectué les différents tests pour valider la qPCR dans l'optique de pouvoir l'utiliser avec des échantillons de sols et de racines.

Afin de déterminer la concentration en amorces optimale pour la réaction qPCR, différentes concentrations ont été testées en combinaison (150, 300 et 600 nM) en SYBR green pour la détection des amplicons. Tous les résultats obtenus présentent une efficacité supérieure à 90 % et un coefficient de corrélation supérieur à 0,99 sauf pour la combinaison 600nM d'amorces forward et 150nM d'amorces reverse qui a un  $r^2$  de 0,98. Les pentes sont comprises entre -3,34 et -3,5. Les conditions avec les meilleurs critères sont une concentration de 300 nM pour les deux amorces. Une courbe de fusion a été établie. Un seul pic est visible à une température de 79°C. Les amorces ne se replient donc pas sur elles-mêmes pour former des dimères d'amorces et l'ADN quantifié est pur. La gamme dosée avec différentes concentrations en sonde (50, 100, 150, 200 et 250 nM) a permis de valider les paramètres optimaux pour les concentrations 100nM et 150nM avec respectivement 93,2 % et 90 % pour l'efficacité, 0,998 et 0,997 pour le  $r^2$  et -3,497 et -3,593 pour la pente. La concentration 100nM est choisie pour une raison de réduction des coûts.



La spécificité du système sonde/amorces a été vérifiée par la quantification de 7 souches de Ggt et de 10 souches d'autres espèces fongiques, présentes au niveau des racines et/ou bas de tige des céréales. Malgré le fait que le gène cible n'est pas connu, la qPCR est bien spécifique à Ggt. Les souches de Ggt sortent à des Ct allant de 23,07 à 26,08 pour le deuxième point de gamme (0,5 ng d'ADN). Les efficacités sont supérieures à 90 % et les  $r^2$  à 0,99.

Tous les critères nécessaires à la validation de la méthode sur champignon pur ont été validés (Adam *et al.*, 2018 ; Valade *et al.*, 2019).

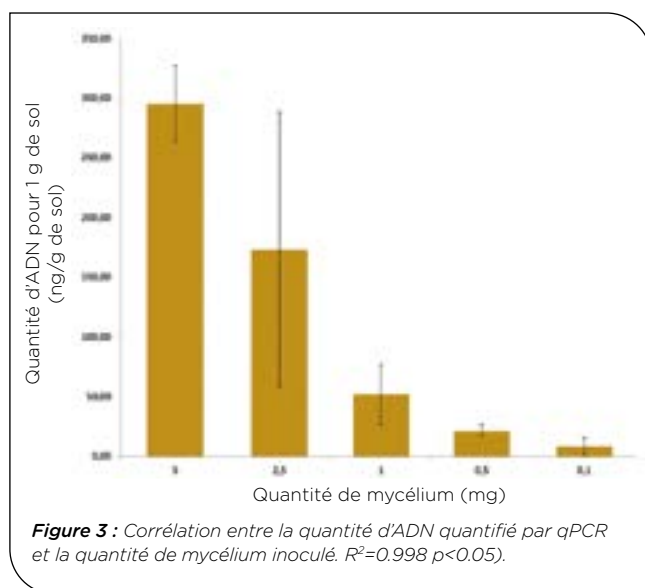
### 3.1.3 - Mise au point du protocole d'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon de sol

Trois kits d'extraction d'ADN à partir de sol ont été testés afin de déterminer lequel fournit les meilleurs résultats en termes de quantité, qualité (faible présence d'inhibiteurs) et de reproductibilité de l'ADN extrait pour les analyses moléculaires.

Pour cela une gamme étalon a été évaluée (10 - 5 - 2 - 1 - 0,2 mg de mycélium/g de sol) et différentes optimisations ont été effectuées (non détaillé dans cet article).

Pour le kit Qiagen et MP Biomedicals, aucun point de la gamme n'a été détecté ou des problèmes de reproductibilité et sensibilité ont été observés.

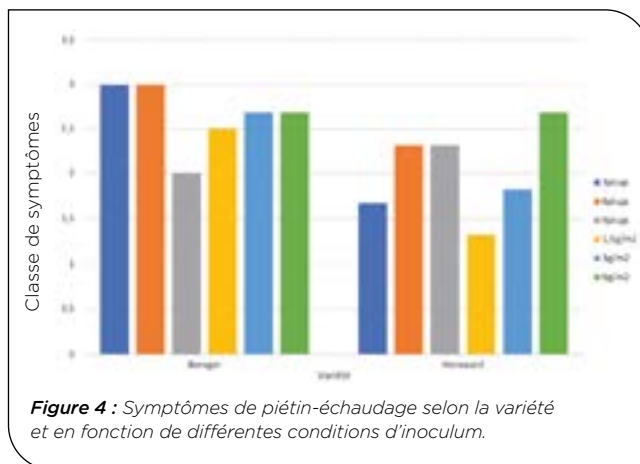
Le kit NucleoSpin® Soil Kit de Macherey-Nagel est le kit d'extraction d'ADN de sol qui a fourni les meilleurs résultats. Avec l'optimisation du protocole, la quantité d'ADN extrait par gramme de sol a été déterminée (figure 3). Les résultats présentent une bonne corrélation ( $r^2 = 0,988$ ), la quantité d'ADN détectée dans le sol diminue de façon logique avec la quantité de mycélium inoculée. Ces résultats montrent qu'il est potentiellement possible de quantifier efficacement le champignon dans le sol avec la méthode mise au point.



La méthode a ensuite été testée sur des racines symptomatiques et différents sols prélevés au cours du projet. Les résultats n'ont pas été concluants et ne sont pas présentés dans cet article.

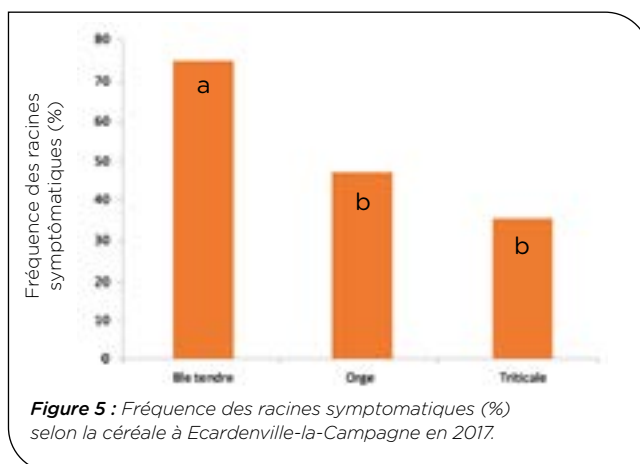
## ► 2. Mise au point d'un test biologique sol

Toutes les conditions testées (plugs, grains contaminés broyés à des concentrations différentes) ont permis d'observer des symptômes sur les racines (figure 4) à des niveaux significatifs. Ce résultat a permis de valider le test biologique dans nos conditions contrôlées. Les résultats ont également mis en évidence une sensibilité plus forte de la variété Boregar par rapport à la variété Hereward que nous avons donc choisi comme variété témoin pour les tests biologiques réalisés dans le projet.



## ► 3. Mise au point d'une méthode de contamination artificielle au champ

Lors de la première année, des symptômes ont pu être observés dans 3 sites sur les 4 inoculés. Seul le site d'Allonnes (28) n'a pas pu être exploité car peu de symptômes ont été observés probablement à cause des conditions pédo-climatiques peu favorables à la maladie. Dans les 3 sites présentant des symptômes de piétin-échaudage, des différences significatives ont été observées entre le témoin non inoculé et les modalités inoculées. La pression a été la plus forte dans le site d'Ecardenville. Il est intéressant de noter que ce site était en précédent orge à la différence des deux autres sites dont le précédent n'était pas une céréale. D'ailleurs, c'est le seul site où des symptômes significatifs ont été observés dans les modalités non inoculées. Dans ce site, les analyses ont permis de mettre en évidence un effet significatif de l'espèce hôte avec le blé tendre plus sensible que l'orge et le triticale sur les notations racinaires à floraison (figure 5 ;  $p<0.05$ ).



Dans cet essai, au sein des quatre géotypes de blé tendre, des différences significatives ont été observées pour la fréquence de la maladie sur les racines à floraison (Tableau 2).

Variété	Moyenne ajustée	Groupe Homogène (5%)
BOREGAR	83.33	a.
NEMO	80.56	a.
BAROK	75.56	ab
RUBSKO	73.89	ab
OREGRAIN	58.72	.b

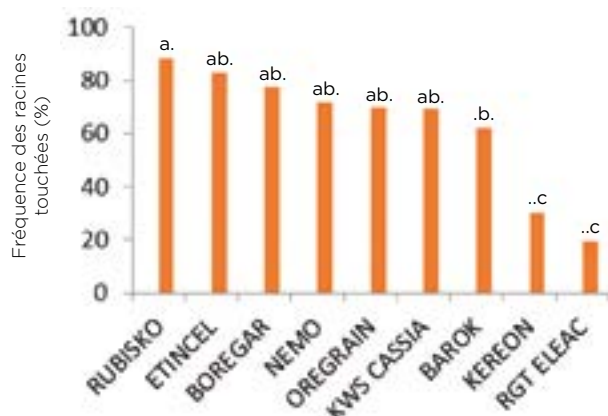
**Tableau 2 :** Classement variétal selon la fréquence de la maladie sur racines (à floraison) à Ecardenville (27) en 2017.

Dans le site de Louville-la-Chenard (28), il n'a pas été observé de différences significatives entre la modalité inoculée à 1.5 g/m<sup>2</sup> et la modalité inoculée à 3 g/m<sup>2</sup> pour les différentes notations (fréquence, intensité et TAI). De même, aucune différence significative n'a été observée entre les 4 géotypes de blé testés. Dans le site de Maule (78) où la pression a été un peu plus faible, les résultats sont identiques.

Cette première année d'essais a permis de montrer qu'il était possible d'inoculer des essais avec du piétin-échaudage afin d'étudier la sensibilité de l'hôte vis-à-vis de cette maladie.

Lors de la seconde année (2017-2018), les essais ont été reconduits dans les mêmes sites en modifiant la modalité 1.5 g/m<sup>2</sup> en 6 g/m<sup>2</sup> afin de définir le taux d'inoculum le plus pertinent pour différencier la sensibilité variétale et minimiser les interactions GxE. L'essai réalisé à Maule (78) a été peu informatif à cause d'une pression trop faible dans l'essai ne permettant pas de différencier les modalités et les géotypes.

Dans les trois autres essais, la pression maladie a été significative avec des résultats semblables à ceux obtenus l'année précédente. En effet, l'analyse statistique de l'essai d'Ecardenville (27) conduit en précédent blé n'a pas montré de différences significatives entre les modalités inoculées mais a permis de confirmer des différences de sensibilité des espèces de céréales et des différences entre géotypes (figure 6).



**Figure 6 :** Fréquence des racines symptomatiques (%) selon les variétés de blé, orge et triticale à Ecardenville-la-Campagne en 2018.

Le triticale est l'espèce la moins sensible comme en 2017 alors que l'orge est dans le même groupe de significativité que le blé en 2018. Le classement des variétés de blé tendre est différent de l'année précédente. Ce résultat confirme la difficulté d'avoir des résultats consistants entre les sites et les années pour le critère de sensibilité au piétin-échaudage même si des tendances semblent se détacher comme une plus forte sensibilité de Boregar à l'inverse d'Oregrain. Cette difficulté à différencier les variétés est probablement liée à des interactions GxE fortes, à la difficulté des notations et à l'absence de résistance directe dans le matériel.

Dans les deux autres essais (Allonnes et Louville-la-Chenard), l'inoculation a permis d'avoir une pression significativement différente entre les modalités inoculées et non inoculées. La pression a été plus forte avec la modalité 6 g/m<sup>2</sup> dans l'essai d'Allonnes alors qu'il n'y a pas de différence dans l'essai de Louville-la-Chenard. Pour ces deux essais, malgré des tendances proches de celles de l'essai précédent, il n'y a pas de différence significative entre les variétés sur la fréquence ou le TAI à floraison.

Pour conclure, lors des deux années, nous avons pu mettre en évidence l'intérêt d'apporter de l'inoculum de Ggt au semis afin d'observer la maladie à des pressions significatives sur différents géotypes. Un inoculum de 3 g/m<sup>2</sup> est suffisant pour obtenir une bonne pression maladie dans la majorité des cas. Avec cette méthodologie, nous avons pu confirmer la différence de sensibilité au piétin-échaudage entre les espèces de céréales avec le blé ≥ orge ≥ triticale. Par contre, malgré des différences observées entre géotypes de blé et certaines tendances, les analyses statistiques ne mettent pas en évidence de fortes différences qui sont probablement liées à des effets environnements forts. Ces essais ont également permis de rappeler qu'il est important de noter les racines et non seulement les épis blancs pour qualifier la pression piétin-échaudage d'un essai.

#### ► 4. Mise au point d'une méthode d'évaluation de la sensibilité variétale en conditions favorables au développement de la maladie

Lors des deux premières années du projet, sept essais sur les huit prévus ont été réalisés selon le protocole prévu. En année 1, comme pour les essais inoculés, très peu de symptômes ont été observés sur le site d'Allonnes (28) rendant l'essai inexploitable probablement à cause des conditions climatiques de l'année. Dans l'essai de Maule (78), avec une pression moyenne, aucune différence significative n'a été observée entre les géotypes même si, en tendance, les résultats obtenus pour la fréquence, l'intensité et l'indice TAI classent Boregar et Nemo comme des variétés plus sensibles qu'Oregrain. De plus, l'écart de rendement entre les parcelles traitées au Latitudo (traitement de semences fongicide pour lutter contre le piétin-échaudage) et non traitées n'est pas significatif suggérant que la pression n'a pas été assez forte.

L'essai réalisé « en conditions favorables » en Bretagne a permis d'obtenir une forte pression de la maladie dans l'ensemble du dispositif. Une forte corrélation significative a été observée entre la perte de rendements et les notations racinaires (figure 7). Dans ce dispositif, les variétés Boregar et Nemo ressortent comme les plus sensibles comme dans les essais inoculés. De plus, 2 variétés de triticale semées dans le dispositif

ont permis de confirmer la moindre sensibilité de cette céréale observée dans les essais contaminés.

En 2017/2018, les quatre essais ont permis d'observer des symptômes avec des niveaux de pression très variables entre les essais. Les résultats sont sensiblement identiques aux résultats précédents avec des différences entre génotypes qui ne sont pas significatives dans tous les essais rendant difficile l'exploitation des données.

Pour conclure, en réalisant des essais en conditions favorables au piétin-échaudage c'est-à-dire en semant précocement avec un précédent blé, la maladie peut s'exprimer. Par contre, la pression est très variable selon les conditions pédoclimatiques ce qui rend difficile la caractérisation des variétés.

## ► 5. Caractérisation de la sensibilité variétale

Afin d'essayer de caractériser un plus grand nombre de variétés, nous avons mis en place des essais avec les deux protocoles développés précédemment (inoculation à 3 g/m<sup>2</sup> et conditions favorables).

Sur les 3 essais inoculés, l'essai de Louville-la-Chenard a permis d'avoir une pression suffisante pour noter les variétés pour leur sensibilité au piétin-échaudage. Malgré des différences observables entre les variétés, les analyses statistiques n'ont pas permis de mettre en évidence des différences de sensibilité variétale à cause notamment d'un effet bloc significatif et donc d'une hétérogénéité importante dans l'essai (figure 8).

Dans les deux essais réalisés en conditions favorables au développement du piétin-échaudage, une pression significative a été observée.

Pour les différentes notations réalisées, il n'y a pas de différence significative entre les variétés de blé testées dans l'essai réalisé à Maule (figure 9).

Dans ce même essai, 10 variétés d'orge ont été caractérisées pour un résultat similaire c'est-à-dire une absence d'effet génotype. Par contre, l'effet hôte est significatif avec une faible sensibilité de l'orge vis-à-vis de cette maladie.

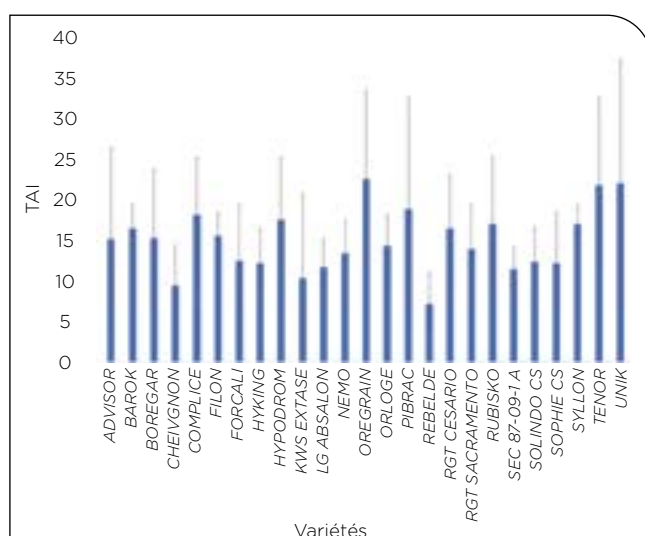
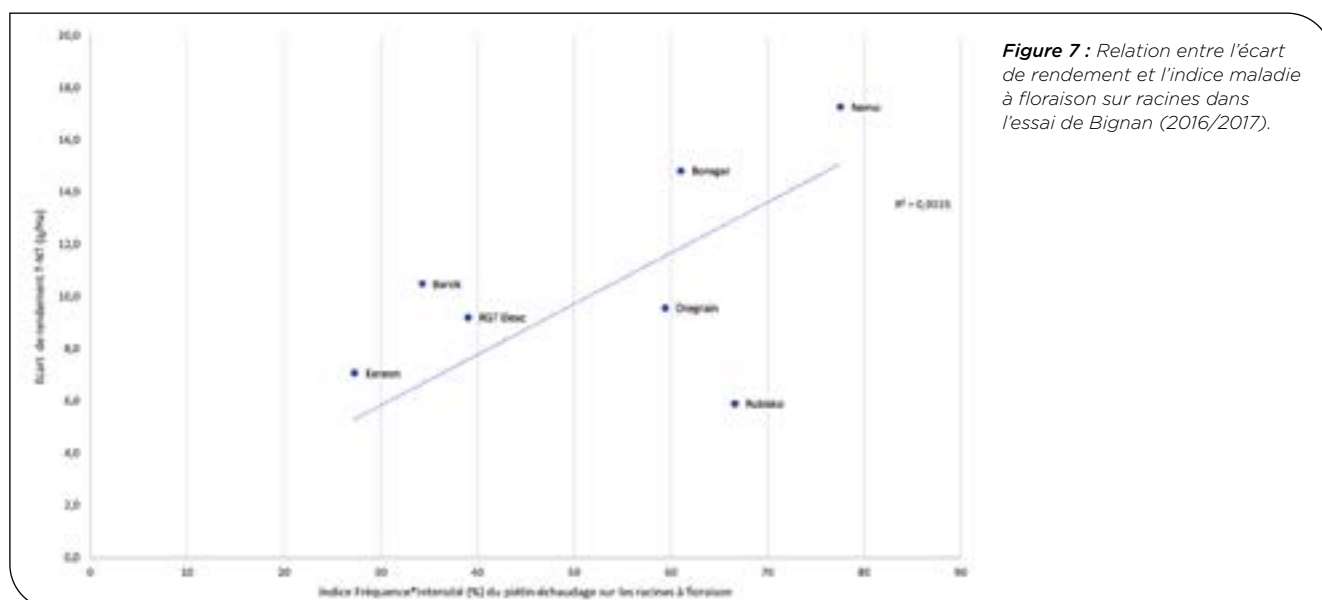


Figure 8 : Take all Index (TAI) à floraison pour les 25 variétés semées à Louville-la-Chenard en 2018/2019.

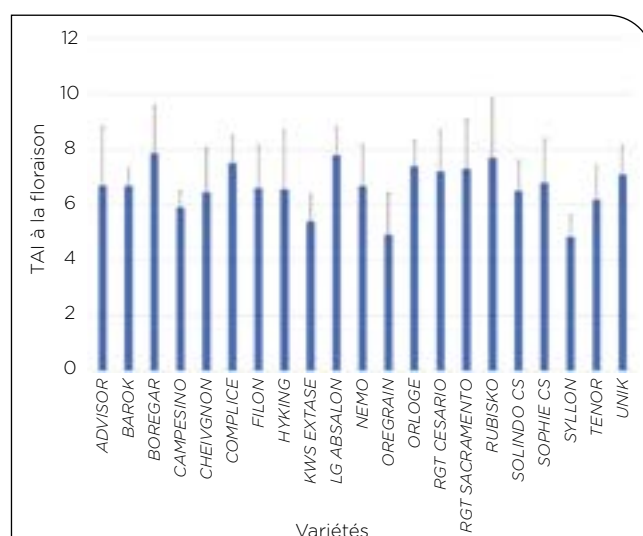
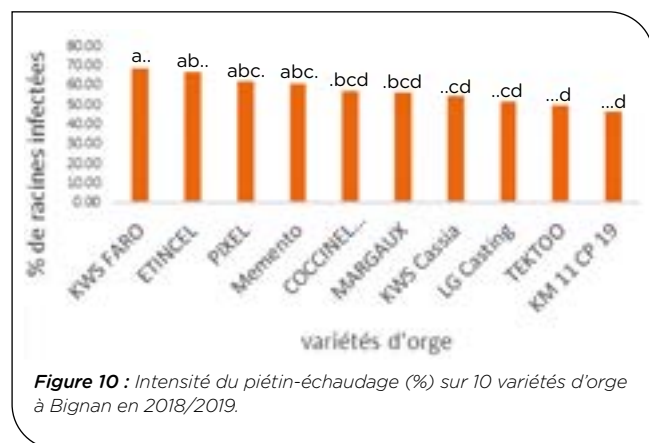


Figure 9 : Take all Index (TAI) à floraison pour les 21 variétés de blé semées à Maule en 2018/2019.



Les mêmes résultats ont été obtenus dans l'essai réalisé à Bignan en Bretagne avec une pression très forte de la maladie (plus de 80 % en intensité sur les racines à floraison). Cette très/trop forte pression a minimisé les possibles différences variétales et confirme l'absence de résistance même partielle vis-à-vis du piétin-échaudage.

Par contre, des différences significatives ont été observées pour les variétés d'orge testées (figure 10).



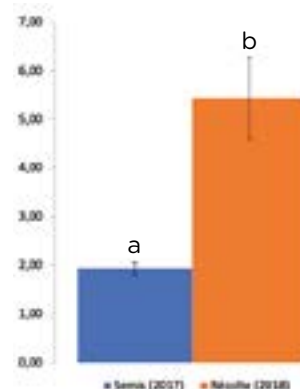
Néanmoins, avec un seul essai et une seule année, il est difficile d'affirmer avec certitude que ces différences sont le reflet de la sensibilité variétale de l'orge au piétin-échaudage.

## ► 6. Caractérisation des espèces et des variétés pour leur capacité au TAB

Dans le cadre de ce projet, nous avons étudié la capacité des variétés à modifier l'inoculum présent dans le sol.

Au total, 4132 prélèvements de sols ont été analysés avec le test biologique en conditions contrôlées. Dans l'ensemble des analyses, nous avons pu observer une augmentation significative de l'inoculum de piétin-échaudage entre le semis et la récolte traduit par un pourcentage de racines nécrosées plus important sur la variété Boregar avec les sols prélevés au moment de la récolte (figure 11).

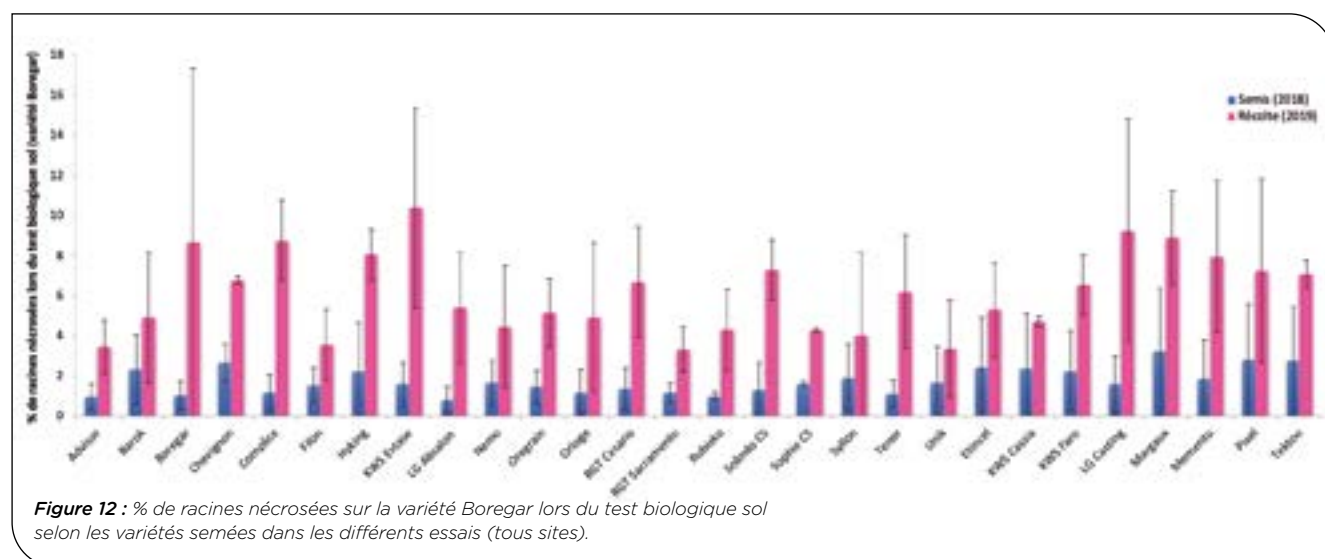
**Figure 11 :** Pourcentage de nécroses racinaires observées sur la variété témoin Boregar selon la date de prélèvements du sol (tous sites et variétés confondus) avec significativité ( $p < 0.05$ ).



Ce résultat est cohérent avec la biologie de la maladie avec le champignon qui s'accumule dans les racines puis dans le sol avec la dégradation des racines. Ce résultat observé, dans chaque essai pris individuellement, permet aussi de valider, avec un grand nombre de données, l'intérêt du test biologique sol pour potentiellement caractériser l'inoculum du sol.

Par contre, ce test n'a pas permis d'identifier une relation significative très forte entre l'inoculum primaire au semis et les notations racinaires effectuées à floraison dans les différents essais. Ce résultat s'explique par le fait que le développement de la maladie et son incidence sur le rendement, va dépendre des autres composantes abiotiques (pH, composition physicochimique, humidité) et biotiques (microbiote ou ensemble des microorganismes) du sol. Comme pour toute maladie, le climat et les pratiques culturales modifient cet environnement et interfèrent sur la dynamique épidémique. La capacité d'un sol infesté à engendrer de la maladie ou potentiel infectieux du sol dépend donc à la fois de la quantité d'inoculum et des autres paramètres du sol. Dans notre cas, il semblerait que les autres facteurs ont un impact plus fort que seule la présence de l'inoculum primaire.

Dans l'ensemble des analyses réalisées, nous n'avons pas réussi à identifier un effet significatif de la variété pour l'accumulation de l'inoculum à la récolte dans l'analyse globale avec le test biologique même si des différences entre variétés sont observées (figure 12).

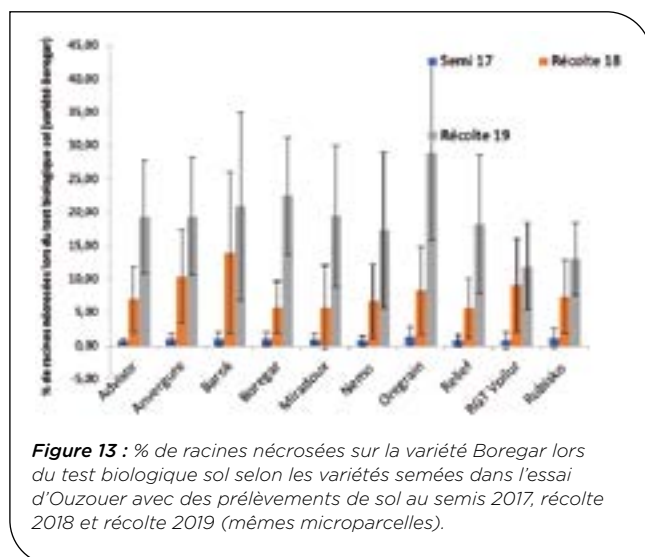


En effet, l'effet site, qui est significatif dans nos conditions, influence fortement ce trait, ce qui a été confirmé dans une étude récente (Mc Millan *et al.*, 2018).

Il est intéressant de noter que nous n'avons pas observé non plus de différences entre l'orge et le blé pour ce trait. Ainsi, à la différence de la sensibilité d'hôte qui est plus faible pour l'orge, cette espèce contribuerait autant que le blé à entretenir l'inoculum du sol. En termes de lutte prophylactique, ce résultat confirme que des rotations chargées en céréales à paille et pas seulement en blé sont des facteurs de risque important dans la présence de la maladie et permet de comprendre aussi la fréquence importante du piétin-échaudage observée dans des régions avec des rotations du type Maïs/blé/orge ou colza/blé/orge.

Pour finir, ce trait a également été étudié, in situ, à Ouzouer le Marché avec des variétés de blé dur et de blé tendre. Ainsi, différentes variétés ont été semées en 2017 et récoltées en 2018. Ensuite, la variété Boregar a été implantée sur l'ensemble du dispositif en repérant par RTK les variétés précédentes.

Tout d'abord, le test biologique réalisé pour ce seul site montre une augmentation significative de l'inoculum du sol au cours des deux campagnes entre le semis 2017 et la récolte 2019 (figure 13). Ainsi, on constate que le pourcentage des racines infectées (sur la variété rapportrice) au semis 2017 est très faible avec un taux de 1.01 %. A la récolte 2018, on obtient une moyenne de 8.04 % de racines contaminées, ce qui indique que la charge en inoculum a augmenté au cours de la saison culturale. Ce résultat est en concordance avec tous les autres résultats obtenus. Enfin, le pourcentage moyen des racines infectées à la récolte 2019 est significativement supérieur avec une moyenne de 19.13 % ce qui confirme l'accumulation de l'inoculum dans le sol avec la charge en céréales. Comme pour l'orge, le blé dur ne semble pas différent du blé tendre pour le caractère TAB.

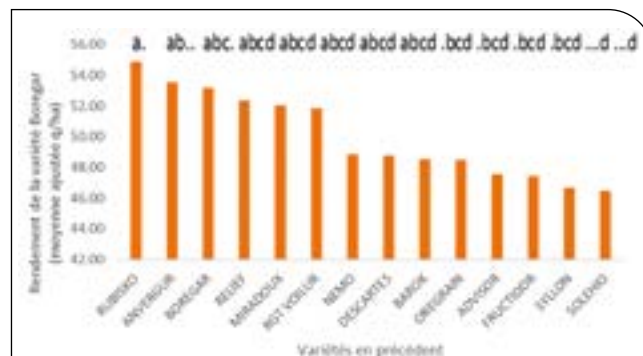


**Figure 13 :** % de racines nécrosées sur la variété Boregar lors du test biologique sol selon les variétés semées dans l'essai d'Ouzouer avec des prélèvements de sol au semis 2017, récolte 2018 et récolte 2019 (mêmes microparcelles).

Un effet rendement de la variété Boregar (récolte 2019) est observé selon la variété cultivée en précédent (récolte 2018) (figure 14). Cet effet n'est pas observé en prenant en compte individuellement les notations racinaires ou le pourcentage d'épis blancs même si le rendement est corrélé avec ce pourcentage ( $R^2=0.8145$ ,  $p<0.05$ ).

Par contre, le classement variétal lié au rendement est expliqué à plus de 80 % par le pourcentage d'épis blancs et 40 % pour le pourcentage de racines nécrosées.

L'ensemble de ces données confirment que certaines variétés sont préférables en 1<sup>ère</sup> paille car elles minimisent la perte de rendements de la culture suivante. Cependant, nous n'avons pas réussi à relier directement cet effet au TAB avec le test biologique. Même si ce trait doit probablement jouer un rôle, d'autres mécanismes en jeu restent à identifier comme la modification du microbiome du sol et de la rhizosphère.



**Figure 14 :** Rendement de la variété Boregar en 2019 selon la variété cultivée en précédent (2018) dans le site Arvalis d'Ouzouer.

## 4 Discussion et conclusions

Le projet FSOV TakeNotAll avait pour ambition de développer des méthodes utiles à la sélection pour travailler une maladie racinaire importante des céréales, le piétin-échaudage.

Nous avons pu tester deux méthodes publiées dans la littérature (i) une méthode moléculaire et (ii) un test biologique potentiellement utile pour caractériser l'inoculum du sol ou la pression maladie. Nos résultats ont montré que la méthode qPCR développée par Keenan *et al.* (2015) était difficilement utilisable. En effet, même si elle répond techniquement à notre cahier des charges pour valider une qPCR, le gène cible n'est pas celui indiqué dans la publication. Ce résultat a également été observé par une autre étude réalisée par une autre équipe de recherche (Duran *et al.*, 2018). Le séquençage de plusieurs gènes de différentes espèces de *Gaeumannomyces graminis* n'a pas permis de développer une nouvelle méthode dans le cadre de ce projet. Néanmoins, de nouvelles méthodes qPCR ont été publiées depuis la fin du projet ainsi que de nouvelles séquences. Ainsi, ARVALIS va travailler à évaluer ces méthodes ou en développer une nouvelle pour réussir à quantifier le champignon dans le sol ou les racines notamment pour aider aux notations qui sont compliquées et lourdes. Le test biologique du sol selon la méthode développée par Horby (1981) a été internalisé avec succès. Il a permis de caractériser un très grand nombre de sol dans le cadre de ce projet. Ce test a montré son efficacité pour mettre en évidence l'inoculum présent dans le sol ainsi que son accumulation au cours du temps en utilisant une variété rapportrice comme Boregar. Néanmoins, l'utilisation de ce test reste très fastidieuse et assez peu corrélée à

la pression maladie observée. Ce résultat s'explique par le fait que le développement de la maladie et son incidence sur le rendement, va dépendre des autres composantes abiotiques et biotiques comme le microbiote du sol. Comme pour toute maladie, le climat et les pratiques culturales modifient cet environnement et interfèrent sur la dynamique épidémique. La capacité d'un sol infesté à engendrer de la maladie ou potentiel infectieux du sol dépend donc à la fois de la quantité d'inoculum et des autres paramètres du sol. Dans notre cas, il semblerait que les autres facteurs ont un impact plus fort que seule la présence de l'inoculum primaire. Dans cette optique, des sols ont été conservés afin de pouvoir caractériser notamment le microbiote et potentiellement comprendre pourquoi certains sols semblent plus suppressifs que d'autres.

Ensuite, le projet a permis de mettre au point une méthode d'inoculation du sol afin de pouvoir faire des essais de type pépinières. Grâce à cette méthode, nous pouvons potentiellement étudier la sensibilité variétale de différentes espèces de céréales, de populations recombinantes qui pourraient posséder des gènes de résistance ou étudier d'autres aspects comme l'efficacité des produits de biocontrôle. De même, un protocole a été établi pour réaliser ce type d'essais en conditions favorables qui permet d'avoir une pression maladie sans inoculation même si elle n'est pas maîtrisée. Ce type de protocole est utile pour étudier différents traits comme des solutions de biocontrôle ou l'impact de la fertilisation sur la maladie (Valade *et al.*, 2019). Le projet a également permis de valider les méthodes de notations les plus pertinentes et démontré qu'il est important de noter les racines et pas seulement le pourcentage d'épis blancs.

Concernant la sensibilité variétale, nous n'avons pas mis en évidence de différences significatives entre les variétés testées. Il semblerait, en tendance, que certaines variétés réagissent différemment à la maladie mais cet effet n'est pas robuste entre les années et les sites. Ce résultat est cohérent avec des études précédentes qui n'ont jamais réussi à démontrer une résistance même

partielle dans le blé tendre. Ainsi, il est possible que des mécanismes encore inconnus, très liés aux conditions pédo-climatiques, permettent à des variétés de plus ou moins bien résister à la maladie. Cette hypothèse expliquerait la forte interaction GxE qui semble exister pour l'interaction entre le piétin-échaudage et le blé.

Enfin, une originalité du projet a été d'essayer de caractériser, pour la première fois en France, le « Take-All inoculum Build-up », TAB, de variétés françaises. En effet, entre l'étude de McMillan *et al.* (2011) et des observations réalisées dans le réseau blé sur blé d'Arvalis, ce trait semblait intéressant à étudier pour gérer le risque piétin-échaudage. Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence une forte variabilité entre les variétés des différentes céréales. Comme pour la sensibilité variétale, plusieurs facteurs semblent interagir avec l'accumulation de l'inoculum dans le sol et pas seulement l'effet génotype ce qui entraîne de fortes interactions GxE qui rendent difficile la caractérisation de ce trait. Néanmoins, l'essai réalisé à Ouzouer en 2018/2019 a permis de confirmer des observations réalisées dans le réseau blé sur blé c'est-à-dire que certaines variétés s'en sortent mieux que d'autres après un précédent blé. Le dispositif original d'Ouzouer avec l'utilisation d'une seule variété a permis de montrer qu'il y a un effet significatif du génotype en 1<sup>er</sup> blé sur la céréale suivante. Le déterminisme de cette observation n'est pas encore connu (TAB, modification microbiome sol, structure du sol, architecture racinaires, ...) mais des études seraient utiles pour comprendre le mécanisme et ainsi pouvoir l'utiliser dans la lutte contre le piétin-échaudage.

## Remerciements

Nous remercions l'ensemble des collaborateurs qui ont participé à ce projet. Nous remercions sincèrement Alain SARNIGUET (DR INRAE IRHS) pour sa participation aux différents comités de pilotage et son expertise précieuse tout au long du projet. Enfin, nous remercions vivement le FSOV et son comité d'engagement pour le financement du projet TAKENOTALL.

## Références bibliographiques

**Bithell SI, Butler Rc, Harrow S, McKay A, Cromey Mg**, 2011. Susceptibility to take-all of cereal and grass species, and their effects on pathogen inoculum. *Annals of Applied Biology* 159, 252-66.

**Bithell SI, McKay A, Butler Rc**, 2012. Predicting Take-All Severity in Second-Year Wheat Using Soil DNA Concentrations of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* Determined with qPCR. *Plant Disease* 96, 443-51.

**Cook Rj**, 1994. Problems and Progress in the Biological-Control of Wheat Take-All. *Plant Pathology* 43, 429-37.

**Cook Rj**, 2003. Take-all of wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62, 73-86.

**Cook Rj, Thomashow Ls, Weller Dm, et al.**, 1995. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 4197-201.

**Daval S, Lebreton L, Gazengel K, Guillerm-Erckelboudt Ay, Sarnigué A**, 2010. Genetic evidence for differentiation of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* into two major groups. *Plant Pathology* 59, 165-78.

**Duran p, Tortella G, Viscardi S, Barra PJ, Carrion VJ, de la Luz Mora M, Pozo MJ**, 2018. Microbial community composition in take-all suppressive soils. *Frontiers in Microbiology*, 9:2198.

**Freeman J, Ward E**, 2004. *Gaeumannomyces graminis*, the take-all fungus and its relatives. *Molecular Plant Pathology* 5, 235-52.

**Gutteridge Rj, Treskic S, Hammond-Kosack Ke**, 2008. Assessing take-all risk in second wheats using the Predicta B test. *HGCA Project Report*, 24 pp.

**Herdina, Roget Dk**, 2000. Prediction of take-all disease risk in field soils using a rapid and quantitative DNA soil assay. *Plant and Soil* 227, 87-98.



- Hernandez-Restrepo M, Groenewald JZ, Elliott ML, Canning G, McMillan VE, Crous PW**, 2016. Take-all or nothing. *Studies in Mycology* 83, 19-48.
- Hornby D**, 1983. Suppressive soils. *Annual Review of Phytopathology* 21, 65-85.
- Hornby D, 1998, Bateman GL, Gutteridge RJ et al.**, 1998. Take-all Disease of cereals: a regional perspective. Wallingford, UK: CAB international.
- Lebreton L, Gosme M, Lucas P, Guillerme-Erckelboudt a-Y, Sarniguet A**, 2007. Linear relationship between *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt) genotypic frequencies and disease severity on wheat roots in the field. *Environmental Microbiology* 9, 492-9.
- McMillan Ve, Hammond-Kosack Ke, Gutteridge Rj**, 2011. Evidence that wheat cultivars differ in their ability to build up inoculum of the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, under a first wheat crop. *Plant Pathology* 60, 200-6.
- Ophel-Keller K, McKay A, Hartley D, Herdina, Curran J**, 2008. Development of a routine DNA-based testing service for soilborne diseases in Australia. *Australasian Plant Pathology* 37, 243-53.
- Roget Dk, Rovira Ad**, 1991. The relationship between incidence of infection by the take-all fungus (*Gaeumannomyces-graminis* var. *tritici*) rainfall and yield of wheat in south-Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 31, 509-13.
- Roget Dk**, 2001. Prediction modelling of soilborne plant diseases. *Australasian Plant Pathology* 30, 85-9.
- Scott PR**, 1981. Variation in host susceptibility. In: Asher MJC, Shipton PJ, eds. *Biology and control of take-all*. London, UK: Academic press, 219-36.
- Slope DB, Cox J**, 1964. Continuous wheat growing and the decline of take-all. In: Rothamstead experimental station report for 1963. Bungay, UK: Richard Clay and Co., Ltd, 108.
- Slope Db, Prew Rd, Gutteridge Rj, Etheridge J**, 1979. Take-All, *Gaeumannomyces-graminis* var. *tritici*, and yield of wheat grown after ley and arable rotations in relation to the occurrence of *Phialophora-radicicola* var. *graminicola*. *Journal of Agricultural Science* 93, 377-89.
- Smiley Rw**, 2009. Water and Temperature Parameters Associated with Winter Wheat Diseases Caused by Soilborne Pathogens. *Plant Disease* 93, 73-80.
- Valade R, Masson E, Sarniguet A**, 2019. Dossier piétin-échaudage. *Perspectives agricoles*, N°463.
- Wallwork H**, 1989. Screening for resistance to take-all in wheat, triticale and wheat-triticale hybrid lines. *Euphytica* 40, 103-9.
- Weller Dm, Raaijmakers Jm, Gardener Bbm, Thomashow Ls**, 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 40, 309.
- Werker Ar, Gilligan Ca**, 1990. Analysis of the effects of selected agronomic factors on the dynamics of the take-all disease of wheat in fields plots. *Plant Pathology* 39, 161-77.
- Wilocquet L, Lebreton L, Sarniguet A, Lucas P**, 2008. Quantification of within-season focal spread of wheat take-all in relation to pathogen genotype and host spatial distribution. *Plant Pathology* 57, 906-15.

**TakeNOTAIL : Caractérisation de la résistance variétale  
des céréales à paille au Piétin-Échaudage et prédiction du risque**

\*Coordinateur : Romain VALADE, [r.valade@arvalis.fr](mailto:r.valade@arvalis.fr)

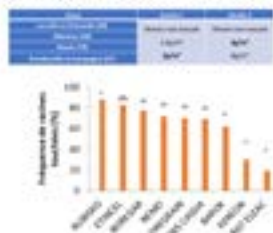
- Mise au point d'un test biologique et caractérisation de l'inoculum du sol



- ✓ Validation d'un test biologique pour caractériser l'inoculum du sol avec utilisation de la variété Bongar comme variété rapportrice
- ✓ Accumulation de l'inoculum au cours du cycle de la culture
- ✓ Pas de relation directe entre l'inoculum du sol au semis et la pression maladie à *Bananae* → Le développement de la maladie et son incidence sur le rendement, va dépendre aussi d'autres composantes abiotiques et biotiques du sol

• **Take-All inoculum build-up** → Ce trait décrit la capacité d'une variété ou d'une espèce à accumuler de l'inoculum dans le sol au cours de sa culture. Ainsi, connaître les variétés et les espèces les moins accumulatrices en inoculum permettrait de les préconiser en première céréale afin de réduire le risque pour la céréale suivante.

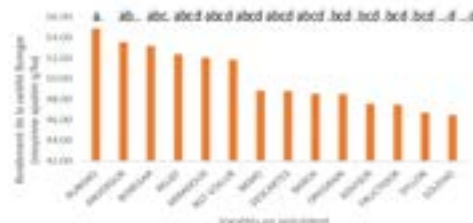
► Mise au point d'une méthode d'insulation aux champs



- **Inoculation possible avec  $10^3$  spores** (grains d'orge inoculés) pour obtenir une pression homogène de la maladie → Peut permettre de faire des essais type « péginère »
- **Protocole valide** pour des essais en conditions favorables au piétié-échaudage: semis précoces avec précédent blé. Par contre, la pression est très variable selon les conditions pédo-climatiques ce qui rend difficile la caractérisation des variétés.
- **Confirmation de la différence de sensibilité au piétié-échaudage** entre les espèces de céréales avec le **bio 2** oupe 2 triticales avec les deux types d'essais.

- Des différences observées entre génotypes de blé avec des tendances entre essais mais les analyses statistiques ne mettent pas en évidence de différences significatives → fortes interactions GxS
- Des différences significatives observées entre génotypes d'orge mais dans 2 sites et 1 une année

- 10 variétés semées en 2017/2018 dans un site (Ouzouer le Marché (28))
- Semis de la variété Boregar en 2018/2019 sur les mêmes micro-parcelles référencées avec la variété précédente
- Notations de la maladie et mesures du rendement de Boregar



- ✓ Un affier rendement de la variété Boregar (nicoté 2019) est observé selon la variété cultivée en précédent (nicoté 2019).
- ✓ Le classement variétale lié au rendement est expliqué à plus de 80% par le pourcentage d'épis blancs et 40% pour le pourcentage de racines nécrosées.
- ✓ Certaines variétés sont préférables en 3<sup>ème</sup> année car elles minimisent la perte de rendements de la culture suivante → Pas relié au TAIR! Même si ce trait doit probablement jouer un rôle, d'autres mécanismes en jeu restent à identifier comme la modification du microbiome du sol et de la rhizosphère.

exister pour l'interaction entre le point-déchauffage et le tôle.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

\*Coordinateur : Ellen GOUEMAND-DUGUE, ellen.gouemand@florimond-desprez.fr

## 1 Introduction

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

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

## ► Phénotypage et quantification du virus

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

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

## ► Déterminisme génétique de la résistance

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

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



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

Le locus *Sbm2* a été identifié par Bayles *et al.* (2007) comme l'un des deux QTL majeurs de résistance à SBCMV dans la population de cartographie Avalon/Cadenza (avec *Sbm1*). *Qsbm.ubo-2BS* détecté dans le cultivar Meridiano de blé dur, identique à *Sbm2*, est situé à proximité du marqueur DArT wPt-2106 (Maccaferri *et al.* 2011). En se basant sur une analyse combinée de 2 populations, Meridiano x Claudio et Simeto x Levante, *Sbm2* a été plus finement localisé dans un intervalle de 2.6 cM défini par les marqueurs SSR (wmc661-gwm210-barb35, côté distal) et wPt-2106 (côté proximal). L'intérêt de ces marqueurs a été confirmé dans une étude réalisée sur une collection de blé dur élite (Maccaferri *et al.* 2012).

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

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

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

## 2 WP1 - Développement d'un outil phénotypique en conditions contrôlées

### ► Matériel utilisé (sol, plantes)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### ► Expérimentations initiales (2017)

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

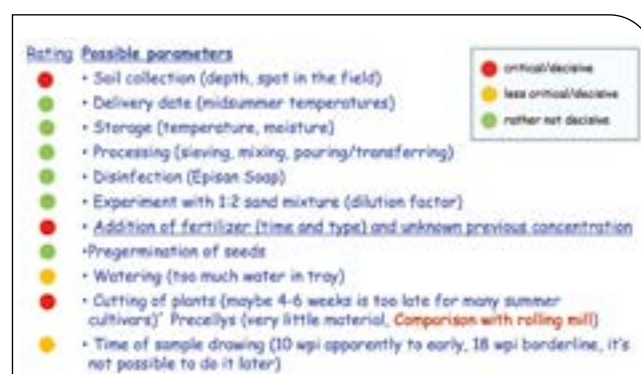
La première expérimentation en chambre de culture (18°C le jour / 16°C la nuit) n'a permis que peu d'infection avec SBCMV/SBWMV et aucune infection avec WSSMV. Parmi les géotypes infectés, certains sont des cultivars connus comme résistants. Dans les conditions initiales mises en place en 2017, l'infection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

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

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

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

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



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

## ► Suite des expérimentations (2018)

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

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

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

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

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

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

## ► Evaluation des ressources génétiques

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

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

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

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

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

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

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

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

## ► Conclusions

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

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

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

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

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

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

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

#### a) Matériel et Méthodes

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



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

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

b) Résultats

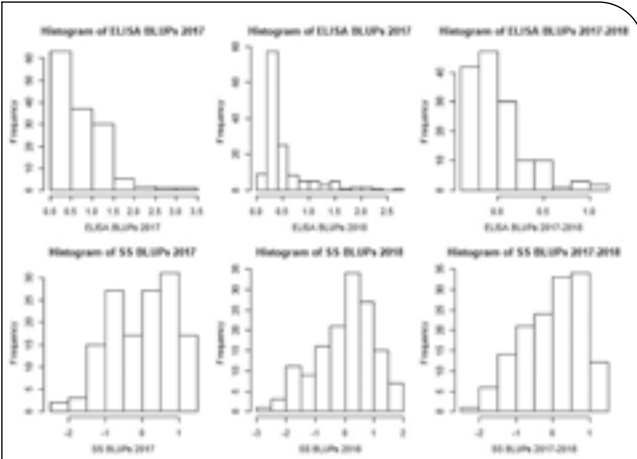


Figure 2 : Histogrammes des BLUPs pour la résistance à WSSMV à Pray.

D’une part, la distribution des BLUPs des ELISA (Figure 2) montre qu’il y a une grande majorité des génotypes avec de faibles valeurs et peu avec de fortes valeurs. D’autre part, les BLUPs de la sévérité des symptômes sont plus proches d’une distribution normale, avec une majorité des génotypes avec des symptômes moyens. Les corrélations de Spearman entre ELISA et SS en 2017 et 2018 sont respectivement de 0.62 et 0.34. La corrélation entre ELISA des 2 années est de 0.36 et la corrélation entre SS des 2 années est de 0.60. Les héritabilités calculées avec SPATS pour SS 2017 et SS 2018 sont respectivement de 0.84 et 0.92. En 2017 et 2018, l’analyse QTL a mis en évidence une région localisée sur la portion distale du long bras du chromosome 7A (Figures 3 et 4), impliquée dans la résistance.

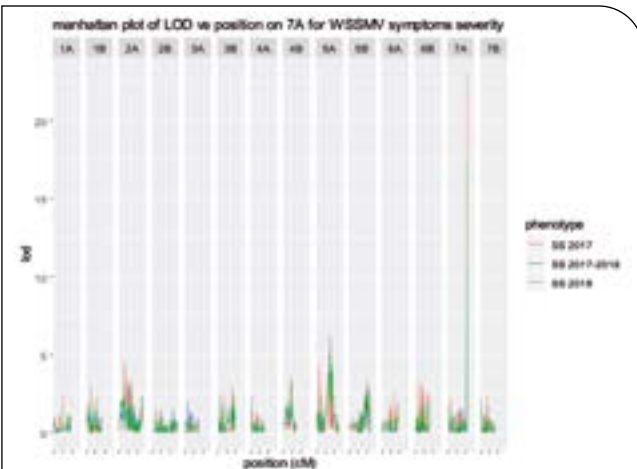


Figure 3 : Manhattan plot de la mesure de la résistance à WSSMV par la sévérité des symptômes dans la population KS contenant 142 RILs.

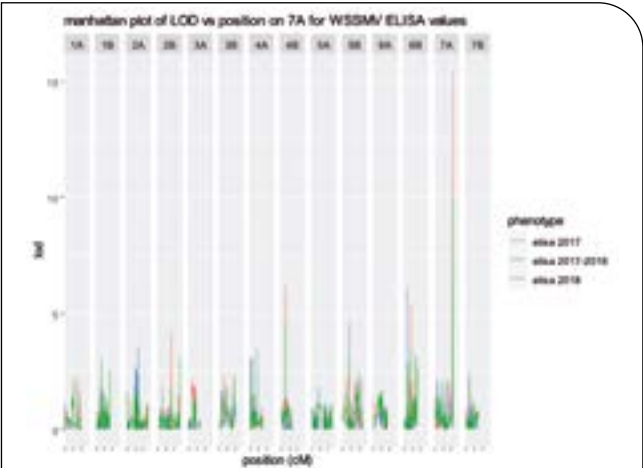


Figure 4 : Manhattan plot de la mesure de la résistance à WSSMV par ELISA dans la population KS.

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

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

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

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

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

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

► Résistance à SBCMV en France chez Dic2 et Soldur  
a) Matériel et Méthodes

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

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

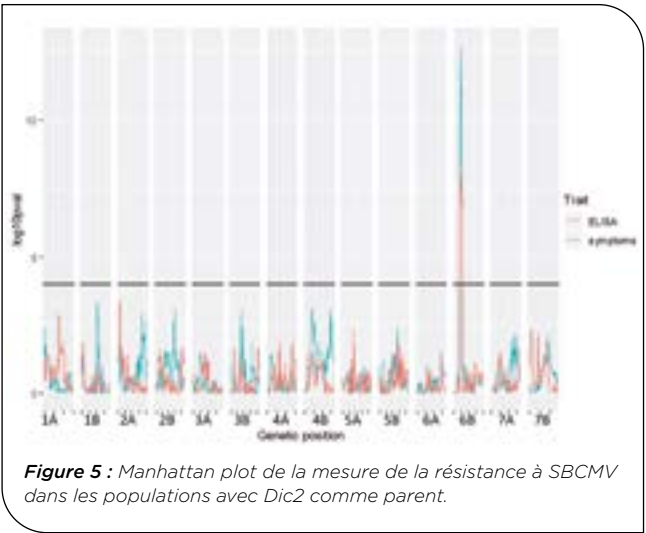
b) Résultats

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

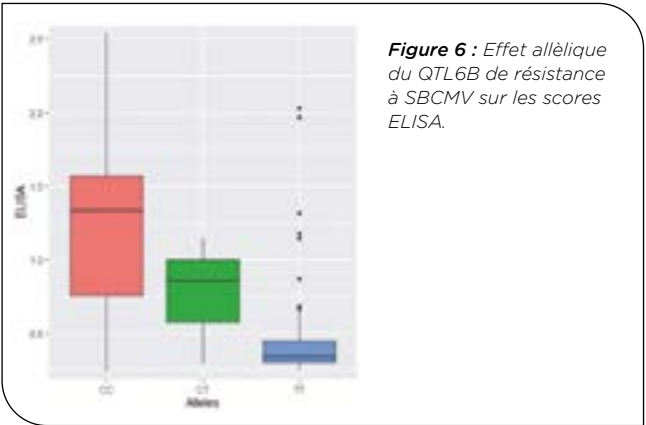
	KS		PS		D2S		D2L	
	SS	ELISA	SS	ELISA	SS	ELISA	SS	ELISA
mean	2.94	0.80	3	0.89	2.64	0.92	1.98	0.84
min	0	0.17	0	0.18	0	0.2	0	0.21
max	5	1.43	5	1.69	5	2.45	5	2.74
CV(%)	25	42	34	35	-	-	-	-
H²(%)	36	80	80	68	-	-	-	-

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

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



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



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

► Résistance à SBCMV en Italie chez Dic2

a) Matériel et Méthodes

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

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

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

b) Résultats

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

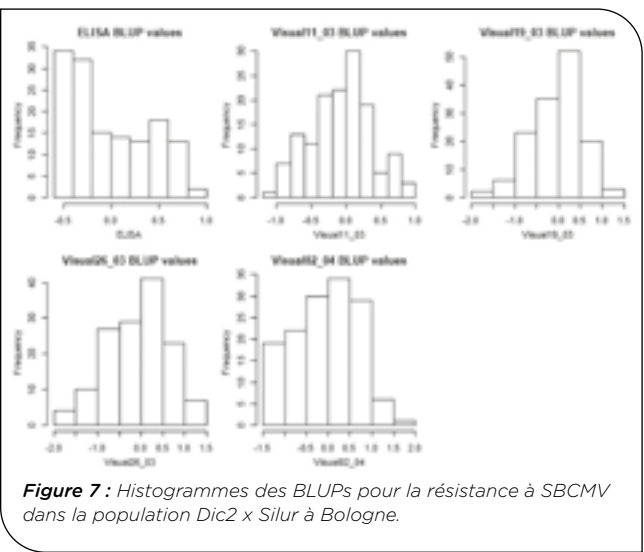


Figure 7 : Histogrammes des BLUPs pour la résistance à SBCMV dans la population Dic2 x Silur à Bologne.

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

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

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

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

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

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

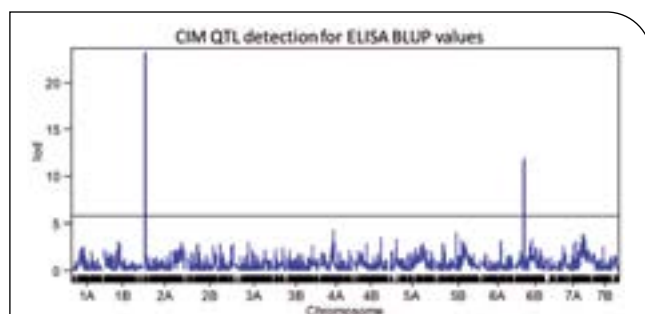


Figure 8 : Manhattan plot de la mesure de la résistance à SBCMV par mesure ELISA dans la population DS en Italie.

### ► Conclusions et perspectives

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

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

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

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

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

Qsbm.ubo-2BS=Sbm2 a été caractérisé dans 2 populations RIL, Meridiano (R) x Claudio (S) et Simeto (S) x Levante (R). L'utilisation de la puce Illumina 90K SNPs a permis l'identification de 8 SNP, convertis en KASP dans l'intervalle de confiance du QTL : KUBO13 (0 cM), KUBO27, KUBO29, KUBO3, KUBO1, KUBO40, KUNO41 et KUBO9 (11.4 cM).

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

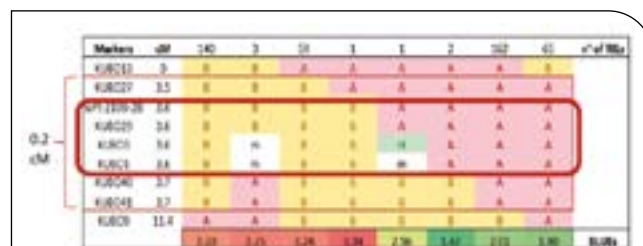


Figure 9 : Intervalle génétique dans la population Svevo x Ciccio. Le nombre de RILs résume le nombre d'individus avec un haplotype donné (A : allèle du parent résistant). Les valeurs BLUPs sont calculées en prenant la moyenne de l'ensemble des individus présentant l'haplotype donné.

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

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

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

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

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

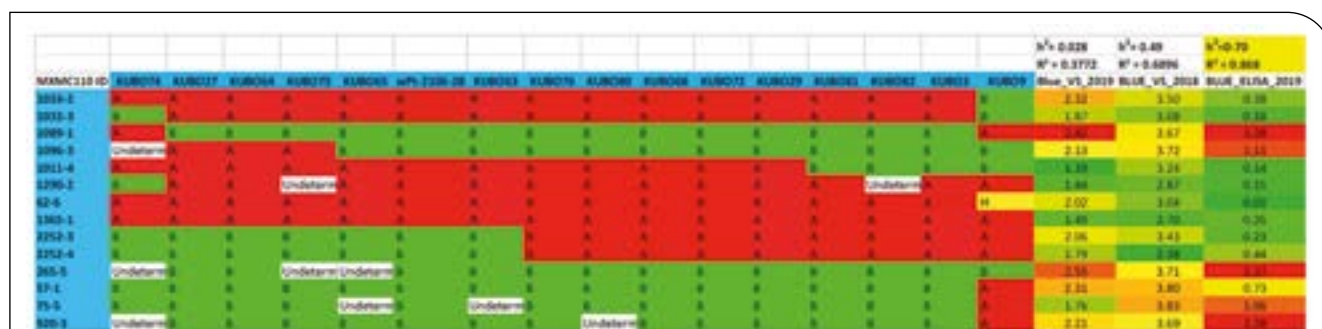


Figure 10 : Intervalle de confiance dans la population Meridiano x Meridiano/Claudio.



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

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

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

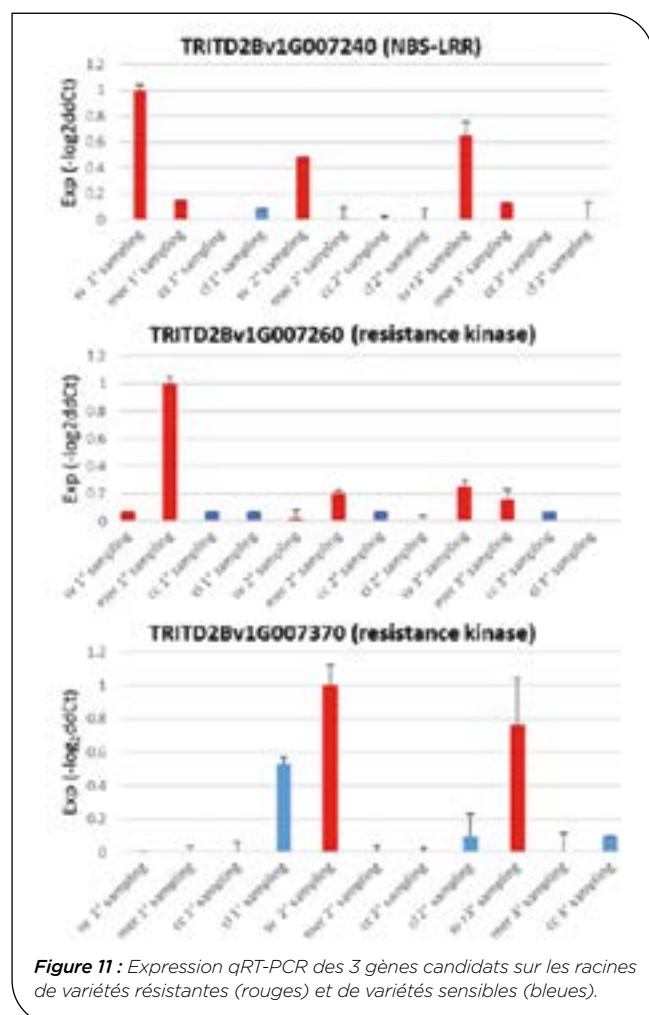


Figure 11 : Expression qRT-PCR des 3 gènes candidats sur les racines de variétés résistantes (rouges) et de variétés sensibles (bleues).

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

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

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

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

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

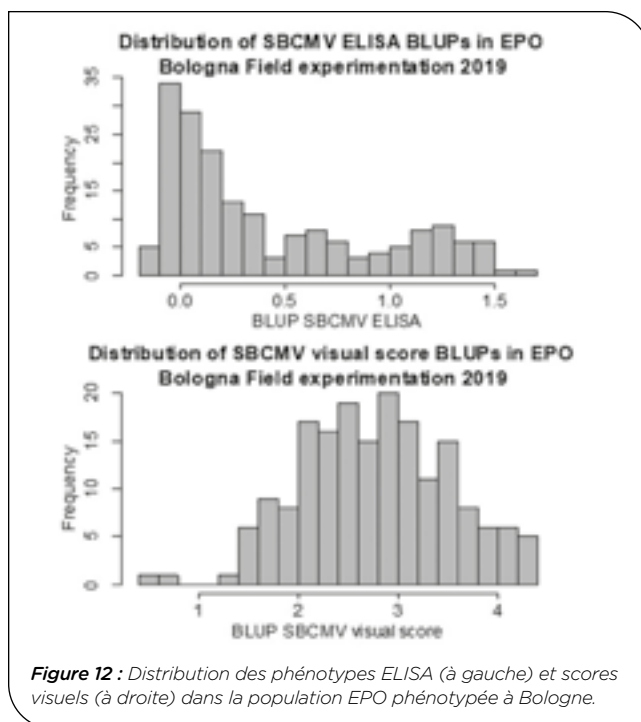


Figure 12 : Distribution des phénotypes ELISA (à gauche) et scores visuels (à droite) dans la population EPO phénotypée à Bologne.

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

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

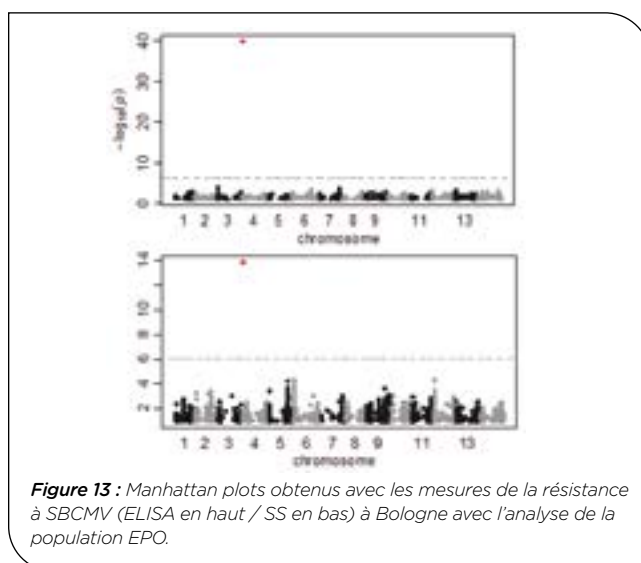


Figure 13 : Manhattan plots obtenus avec les mesures de la résistance à SBCMV (ELISA en haut / SS en bas) à Bologne avec l'analyse de la population EPO.

## Références bibliographiques

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

\*Coordinateur : Ellen GOUEMAND-DUGUE, ellen.gouemand@florimond-desprez.fr

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

**Introduction:** Le Virus de la Mosaïque des céréales (SBCMV) et le Virus de la Mosaïque des stries en fuseaux du blé (WSSMV) peuvent causer des pertes de rendement pouvant atteindre 50 à 70% chez les variétés les plus sensibles de blés dur et tendre en France et en Italie. Du fait de la nature persistante de ces virus dans le sol, le seul moyen pratique et économique de contrôler l'infection est l'utilisation de variétés résistantes.

L'évaluation du matériel au champ est particulièrement difficile puisque les infections ne sont pas toujours homogènes et que les symptômes provoqués par SBCMV et WSSMV au champ ne sont pas distinguables facilement. Kanyuka et al. (2004) ont démontré que les génotypes de blé peuvent être testés efficacement pour leur résistance à SBCMV en conditions contrôlées en utilisant du sol naturellement contaminé par *Polymyxa graminis*. Cette technique pourrait permettre d'améliorer la rapidité et l'efficacité de sélection de variétés de blé résistantes à SBCMV et WSSMV.

Chez le blé dur, un gène majeur de résistance à SBCMV a été localisé sur le chromosome 2B. *Qsbm.ubo-2BS* détecté dans le cultivar Meridiano de blé dur, serait identique à *Sbm2* détecté chez le blé tendre. Il est situé à proximité du marqueur DArT wPt-2106 (Maccaferri et al. 2011). En se basant sur une analyse combinée de 2 populations, Meridiano x Claudio et Simeto x Levante, *Sbm2* a été plus finement localisé dans un intervalle de 2.6cM. Concernant la résistance à WSSMV, un QTL majeur a été détecté sur le chromosome 2D (Khan et al., 2000). Le cultivar Soldur et la lignée Dic2 sont deux nouvelles sources de résistance contre ce virus.

## WP1 - Développement d'un outil phénotypique

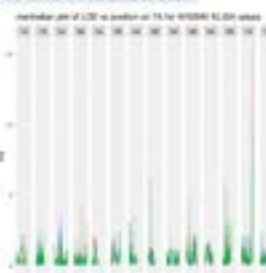
Au cours des 3 ans du projet, des sols infectés provenant de 12 champs différents ont été réceptionnés au JKI et utilisés pour des expérimentations en serre et en chambre de culture. Une collection de 28 génotypes a été construite afin de tester et de développer le nouvel outil de phénotypage en conditions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

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

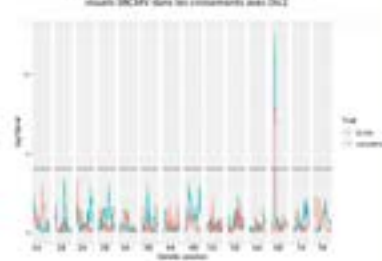


## WP2 - Identification de marqueurs liés à la résistance aux virus chez Dic2 et Soldur

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



Minuterie plot pour les marqueurs EUSA et symplecton virusés SBCMV dans les environnements avec Dic2



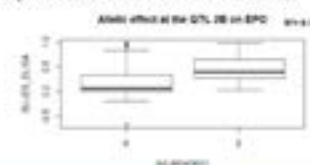
## WP3 - Identification de marqueurs liés finement au gène majeur *Sbm2* dans le blé dur

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

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

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

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



# ArchiRac : Analyse de la diversité d'architecture racinaire chez le blé tendre et le blé dur en lien avec la tolérance au stress hydrique

Michel COLOMBO<sup>1,2</sup>, Pierre ROUMET<sup>2</sup>, Christophe SALON<sup>3</sup>, Christian JEUDY<sup>3</sup>, Mickael LAMBOEUF<sup>3</sup>, Stéphane LAFARGE<sup>4</sup>, Anne-Valérie DUMAS<sup>4</sup>, Pierre DUBREUIL<sup>4</sup>, Wa NGO<sup>1</sup>, Brice DEREPAIS<sup>1</sup>, Katia BEAUCHENE<sup>5</sup>, Vincent ALLARD<sup>1</sup>, Jacques LE GOUIS<sup>1</sup>, Renaud RINCENT<sup>1,6\*</sup>

1 - INRAE-Université Clermont-Auvergne, UMR1095, GDEC, 5 chemin de Beaulieu, 63000 Clermont-Ferrand, France

2 - Univ Montpellier, CIRAD, AGAP, INRAE, Inst Agro, Montpellier, France

3 - Univ Bourgogne, Agroecol Lab, Univ Bourgogne Franche Comte, AgroSup Dijon, INRAE, Dijon, France

4 - BIOGEMMA LIMAGRAIN Site Garenne, Route Ennezat, CS 90126, Chappes, France

5 - Arvalis Institut du Végétal, 45 Voie Romaine, F-41240 Ouzouer Le Marche, Beauce la Romaine, France

6 - Université Paris-Saclay, INRAE, CNRS, AgroParisTech, GQE - Le Moulon, 91190 Gif-sur-Yvette, France

\*Coordinateur : Renaud RINCENT, renaud.rincenc@inrae.fr

## 1 Introduction

Le changement climatique a d'ores et déjà un effet sur la culture du blé en France à travers des épisodes de stress thermique et hydrique plus forts et plus fréquents. Ceci doit être pris en compte en amélioration des plantes de manière à développer des variétés adaptées à ces nouvelles conditions. Jusqu'à présent l'essentiel de l'effort de phénotypage et de sélection a porté sur la partie aérienne des plantes. Or les caractéristiques de l'architecture racinaire sont souvent déterminantes, notamment dans des conditions stressantes, puisqu'elles peuvent permettre d'accéder à plus de ressources en eau et en nutriments. Le développement d'outils de phénotypage haut-débit sur plateforme rend possible la caractérisation fine au stade juvénile de l'architecture racinaire sur un grand nombre de génotypes. Dans le projet ArchiRac nous nous sommes intéressés à quantifier la diversité du blé tendre et du blé dur pour des caractéristiques de l'architecture racinaire sur la plateforme de rhizotubes de l'INRAE de Dijon (4PMI). Pour cela, nous avons utilisé des panels spécialement conçus pour exploiter la diversité existante, et pour lesquels étaient disponible un génotypage dense (puce 420k SNP) et un phénotypage pour des caractères agronomiques sur réseau d'essais. Les objectifs du projet étaient d'identifier des relations à l'échelle du caractère et du QTL entre les caractères mesurés en plateforme et les caractères agronomiques mesurés en plein champ. Nous avons pu montrer que ces relations étaient fortement dépendantes des conditions de culture, et qu'un QTL racinaire pouvait avoir un effet bénéfique ou néfaste sur les composantes de rendement en fonction de ces conditions. Nous avons également pu calibrer et évaluer des modèles de prédiction génomique sur les caractères racinaires. Enfin, 16 génotypes ayant des architectures racinaires extrêmes ont été sélectionnés pour une évaluation racinaire et agronomique en plein champs.

Ce travail a fourni des résultats importants pour le développement de variétés de blé adaptés à des contraintes hydriques et apporte un éclairage sur l'utilisation des plateformes de phénotypage en amélioration des plantes.

Les résultats majeurs de ce projet sont synthétisés dans une publication dans la revue *Frontiers in Plant Science* (2022, DOI: 10.3389/fpls.2022.853601) :

### Genetic analysis of platform-phenotyped root system architecture of bread and durum wheat in relation to agronomic traits

Wheat is the largest primary commodity in the world with a production of 730 million tons in 2018. It is estimated that between 2009 and 2011 wheat provided humans with about 18 % of their daily intake of calories and 20 % of their protein (<http://faostat.fao.org/>). During the second half of the 20th century, wheat yields in Europe increased tremendously (Calderini and Slafer, 1998). but since the 1990s they have stagnated in many European countries (Peltonen-Sainio *et al.*, 2009; Brisson *et al.*, 2010). Surprisingly, according to analyses of variety trials there has been no corresponding inflexion in genetic progress during this period (Mackay *et al.*, 2011; Oury *et al.*, 2012). One of the main factors that explain this stagnation is abiotic stress, mainly caused by drought and high temperature during grain filling (Brisson *et al.*, 2010). For example, in France, during the 2003 and 2008 droughts, wheat yields dropped by 0.5 to 1.5 tons per hectare compared to an average year [Agreste Statistic]. According to the fifth Intergovernmental Panel on Climate Change assessment report, extreme drought events are very likely to become more frequent in the future due to lack of rainfall and increased evapotranspiration during grain filling [IPCC, Fifth Assessment report, 2014]. In addition to adapting agronomic practices, one option to mitigate this issue is to develop plants that are more adapted to dry conditions.

Two complementary strategies may help in developing drought-adapted plants. The first is to increase water use efficiency (WUE), for instance, by optimizing evapo-transpiration or photosynthesis. The second is to optimize water uptake from the soil (Lynch and Lynch, 2007). According to modeling studies, each additional millimeter of water extracted from the soil after anthesis would increase wheat grain yield by up to 55 kg ha<sup>-1</sup> (Manschadi *et al.*, 2006; Christopher *et al.*, 2013). Atta *et al.* (2013) found that crop yield, water extraction and WUE were influenced by root distribution (root length, root diameter or root length density at different depths) in water deficit conditions, where root traits explained



45 % of grain yield variance. Similarly, Postic *et al.* (2019) found a significant correlation ( $r^2 > 0.40$ ) between wheat root length surface density at the anthesis stage and grain yield under various conditions. As roots are responsible for water and nutrient uptake they are a key aspect to consider when developing varieties with increased tolerance to abiotic stress.

In the past, breeding mostly focused on above-ground traits, so any effects of breeding on root traits probably derived from indirect selection. Some authors found evidence of indirect selection for root traits (Siddique *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 2019) whereas other did not (Lupton *et al.*, 1974; Cholick *et al.*, 1977; Friedli *et al.*, 2019). In any case, no clear functional link between root traits and adaptation to a particular environment has been found so far (Hurd, 1974; Chloupek *et al.*, 2006; Waines and Ehdaie, 2007; Wojciechowski *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2013; Elazab *et al.*, 2016; Aziz *et al.*, 2017). A clear understanding of the adaptive value of root traits could be relevant to speed up breeding for adaptation to specific environment.

Studying root traits is highly complex because field root phenotyping is difficult, expensive and labor-intensive. Dating back to Weaver in 1926 who excavated the whole root system architecture (RSA) and until recently, phenotyping mainly focused on easily measurable traits (e.g. insertion angle of nodal roots, root lengths) that only roughly describe RSA (Palta *et al.*, 2011) with methods that tended to be destructive. Since then, soil cores, mesh bags and shovelomics techniques have been developed (Sharma *et al.*, 2011; Trachsel *et al.*, 2011; Lou *et al.*, 2015). A more ambitious non-destructive solution to overcome field phenotyping difficulties is provided by high-throughput phenotyping platform (HTPP) technology explicitly dedicated to root system characterization (Svane *et al.*, 2019).

In an HTPP, root traits of a large number of individual plants can be observed in controlled conditions at early developmental stages (Kuijken *et al.*, 2015). The growth methods used in HTPP vary widely, for example: hydroponics (Ayalew *et al.*, 2015), pots filled with soil (Cao *et al.*, 2014), germination bags (Robertson *et al.*, 1979), gel-filled chambers with transparent walls (Bengough *et al.*, 2004; Manschadi *et al.*, 2006; Christopher *et al.*, 2013), paper-based «cigar roll» system (Zhu *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011), germination paper with growth pouch for wheat and maize (Hund *et al.*, 2009; Atkinson *et al.*, 2015), and compressed columns of soil with X-rays to detect roots (Doussan *et al.*, 2006; Gregory *et al.*, 2009). A recent review (Paez-Garcia *et al.*, 2015) highlighted the strengths and the weaknesses of most of these methods. The main advantages common to these different methods is to enable high-throughput and cheap phenotyping of large genetic panels to facilitate QTL detection, association mapping, or the calibration of genomic prediction models for RSA traits. However, HTPP does not record phenotypes that are robustly relevant for later stages of the crop cycle because the explored soil volume becomes restricted after a few days to a few weeks in pots or root growth boxes (Palta *et al.*, 2011).

Until now, HTPP have shown contrasted results in detecting relation between root traits measured in controlled conditions and field performances. Some

wheat traits affecting grain yield in specific environments have been identified. These include: higher root density at depth to improve deep water capture (O'Brien, 1979), deeper roots (Hurd, 1974), faster elongation rates to extract water from deeper soil layers (O'Brien, 1979), narrower diameter of the xylem vessel in the seminal roots to conserve soil water (Richards and Passioura, 1989), reduced insertion angle of seminal roots to access water from deeper soil layers (Nakamoto and Oyanagi, 1994; Manschadi *et al.*, 2006) and more integrative traits such as higher root-shoot ratio to improve water capture across the soil profile (Siddique *et al.*, 1990; Reynolds *et al.*, 2007). However, these traits observed in controlled conditions, reviewed by Palta *et al.* (2011), never passed field validation trials and to our knowledge, have not been used in breeding programs. While the assumption when using an HTPP is that genotypes differing at an early developmental stage will also differ later under field conditions, the relationship between early RSA traits and mature RSA traits might depend on environmental conditions and might not be verified in all environments.

Lack of field validation may be due to genotype x environment (GxE) interactions. Indeed, RSA ideotypes to optimize agronomic performances are different from one environment to another. As a result, relationships between root traits measured in control environments and agronomic performances are inconsistent across locations and/or years (Canè *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2017a; Roselló *et al.*, 2019). For instance in water-rich environments, a large RSA enables efficient uptake of water and nutrients (concentrated in topsoil) especially during spring rainfall, increasing grain filling (Waisel *et al.*, 2002). In a water-scarce environment, large or deep RSA systems might be metabolically too costly for a plant if it does not result in additional water uptake (for instance by accessing the deeper soil layer, Palta *et al.*, 2011) and might cause yield loss. Thus, when water is scarce, investing fewer resources in root development, could spare more assimilates for above-ground organ growth (Elazab *et al.*, 2016). Thus, finding the most adapted RSA to a specific environment will require detailed environmental characterization to design the corresponding root ideotype and understand the variability in the relationship between RSA and agronomic performances.

HTPP nevertheless provide large amounts of heritable root phenotypic data, some of which have led to the discovery of many QTLs for RSA in controlled conditions (Hund *et al.*, 2011; Soriano and Alvaro, 2019). QTL mapping is a powerful tool to understand how plants function and to establish relationships between traits through co-localization. Understanding the link between early-stage RSA features and in field performance in specific environments requires better characterization of environmental variability. In the present study our main objectives were: (i) to analyze the genetic variability and the underlying genetic architecture of a range of RSA traits measured in an HTPP for one durum wheat and two bread wheat panels (Jeudy *et al.*, 2016), (ii) to evaluate the indirect effect of breeding in the last 80 years on RSA traits, and (iii) to identify relationships between RSA traits measured in HTPP and field productivity traits at the trait or QTL level with environmental characteristics.

## 2 Matériel et méthode

### ► Genetic materials and genotyping

For bread wheat (*Triticum aestivum*), two previously assembled panels were studied. The first panel BW\_div is composed of 450 varieties sampled from 4506 varieties in a worldwide collection (Balfourier *et al.*, 2019) by minimizing linkage disequilibrium and by imposing agronomic constraints (phenology and plant height). The second panel BW\_elite is composed of 265 varieties most of which are registered in Europe and were grown in France between 1980 and 2010 (Ly *et al.*, 2017; Rincent *et al.*, 2018, 2019; Touzy *et al.*, 2019; Beral *et al.*, 2020; Robert *et al.*, 2020). The complete list of varieties is indicated in Annex Table 1.

The durum wheat (*Triticum durum*) panel includes 100 elite European lines (DW\_EPO\_elit), as well as 100 pre-breeding lines (DW\_EPO\_div). The latter evolutionary pre-breeding population (EPO) lines are derived from an open-pollinated population based on the intercrossing of about 650 accessions from wild subspecies and elite lines. To promote the allogamy rate, male sterile plants have been included and maintained in this population at a frequency of 20 % over successive generations (David *et al.*, 2014). At the twelfth cycle, 500 plants were randomly sampled leading to 480 EPO single-seed descent derived lines, fixed after five self-pollinated generations. The 100 EPO lines observed here are a random subsample of the total EPO set. The complete list of varieties is indicated in Annex Table 1.

The wheat accessions were genotyped on an improved Axiom array based on the TaBW280K SNP chip (Rimbert *et al.* 2018) and composed of 409,695 SNP markers (Kitt *et al.* 2021). We extracted SNP and presence/absence variants (off-target variants). Missing values were imputed with the observed allele frequency in the panel for the corresponding marker. Redundant markers and markers with a minor allele count under 20 were filtered out. After applying these filters, we retained 222,467 markers for bread wheat and 79,910 for durum wheat. Alleles with the highest frequency were chosen as reference alleles.

### ► Growth conditions and experimental design in the 4PMI HTPP

Plants were phenotyped in three experiments in the Plant Phenotyping Platform for Plant and Microorganism Interactions (4PMI) HTPP at INRAE-Agroecology (Jeudy *et al.* 2016). Seeds were germinated at room temperature for two days and then homogenous seedlings were selected and inserted into RhizoTubes. Each plant, considered as a replicate, was grown in controlled conditions for three weeks. The growth media was a 25:75 mixture of sand (Biot B4, Silices et Refractaires de la Méditerranée) and perlite. Nutrition was provided in a solution containing: 1 mM  $K_2HPO_4$ , 5 mM  $Mg(NO_3)_2$ , 2.5 mM  $Ca(NO_3)_2$ , 2 mM  $MgSO_4$ , 2 mM  $CaCl_2$ , 50  $\mu M$  Fe EFTA, 10  $\mu M$   $H_3BO_3$ , 4.5  $\mu M$   $MnCl_2$ , 0.2  $\mu M$   $Mo(Na_2O_4)$ , 0.4  $\mu M$   $CuCl_2$ , and 0.7  $\mu M$   $ZnCl_2$ . A RhizoTube has a diameter of 17 cm and a depth of 49.5 cm (Jeudy *et al.* 2016).

Each of the three experiments (September 2017, July 2018, September 2019) consisted of 1125 RhizoTubes, each containing two plants of the same variety, which were divided between two experimental units, one with 475 RhizoTubes, the other with 650 RhizoTubes. Plants were watered in the RhizoTubes with 250 ml of the same nutrient solution from day 1 to 4. Water content was maintained at the field capacity from day 5 to day 26 (harvest day) to ensure that no hydric stress occurred. The available water capacity was 1542 mm. Temperature was on average 21.8 °C during the day and 18.4 °C during the night. Rhizotubes with varieties from the same wheat panel were grouped together. The RhizoTubes were grouped into 23 blocks in the two experimental units, with six check varieties (four bread wheats and two durum wheats) grown in each block to take any spatial effect into account. The 1125 RhizoTubes were as follows:

- 915 rhizotubes for 915 cultivars (200 durum wheats, 450 bread wheats from the diversity panel and 265 bread wheats from the elite panel).
- 72 rhizotubes for image calibration (18 cultivars, 4 replicates).
- 138 rhizotubes for the 6 check genotypes (2 from the BW\_div panel, 2 from the BW\_elit panel and 2 from the BD\_EPO panel). Each check genotype was present in one rhizotube (two plants) in each block.

### ► Measurements in the phenotyping platform

Temperatures were measured in 66 locations spread over the experimental units and incident solar radiation was measured in 12 locations to correct for any spatial heterogeneity in the experimental units. Kriging was performed with the krige function of the gstat R package (Pebesma 2004) to extrapolate temperatures and radiation values for each rhizotube of the experimental unit every 15 minutes. The parametrization of the kriging model was optimized using leave-one-sensor-out cross-validations.

Two types of traits were measured in control conditions. First, root system architecture (RSA) related traits were extracted from image analysis early during plant development. Five days after implantation we measured the seminal root angle (angle between the leftmost and the rightmost seminal roots at 3 cm from the seed (Richard *et al.* 2015) and the number of seminal roots. Every 4 days, we measured: root width, root depth, maximum rooting depth and depth\_80 (defined as the depth above which 80 % of root image pixels are located), gravity center of the RSA (CGY), and convex hull which represents the volume explored by the roots. These traits are all descriptors of the spatial distribution of the roots in the soil. The following root and shoot traits were also measured (destructively) at the end of the experiment 21 to 24 days after sowing between the 4 and 5 leaves stage: above-ground biomass, number of leaves on the main stem, number of tillers, root biomass and root-shoot biomass ratio (root-shoot ratio). These traits are good indicators of biomass allocation between organs.



### ► Growth conditions and phenotyping in the field

The BW\_elite panel was grown in fields from 2012 to 2016 in 42 environments, partly representing the diversity of growing conditions in France (Ly *et al.* 2017; Rincent *et al.* 2019; Touzy *et al.* 2019, Robert *et al.* 2020). These 42 environments correspond to 26 year-location combinations, including two treatments for 16 of them: irrigated (WW) vs rainfed (WD) treatments, well-watered (WW) vs rainout shelter (RO) and high (HN) vs low (LN) nitrogen fertilizer treatment. Environmental variables were computed in Rincent *et al.* (2019) to best characterize the growth conditions of each year x location combination. This dataset was previously used in Touzy *et al.* (2019) to cluster environments in four groups of water stress patterns in order to find drought scenario-specific QTLs. The BW\_div panel was grown in 12 environments split in different locations in France and with contrasted levels of abiotic stress (Annex Table 2).

The DW\_EPO panel was grown in 10 environments in 2018 or 2019 located in three main durum production areas in France (Paris basin, Southeast France and Southwest France) and in Italy (Po Valley) under both non-limiting (NL) and limiting (L) conditions (water and nitrogen, Annex Table 3). In total, this panel was tested in a network of 10 year-location-treatment combinations using two fully replicated designs except for two trials where only 50 % of the genotypes were replicated. A water stress index based on the available water capacity of soil was computed between the key growth stages to analyze the influence of environments on the relationships observed. Based on soil water balance at each stage of plant cycle (emergence to tillering, tillering to heading, heading to flowering and flowering to maturity), the water stress index varied from 0 indicating a severe water-stressed environment to 1 for a water-rich environment. Hereafter the term “environment” will refer to a site x year x treatment combination.

In each environment, grain yield at 0 % moisture content (GY, kg ha<sup>-1</sup>), grain protein content (GPC, % of total dry weight), grain protein deviation (GPD), thousand kernel weight (TKW, g), grain number per m<sup>2</sup> (GN) and date of earing (DOE, 50 % of ears emerged, expressed in Julian days) were measured.

### ► Correction for spatial effects and estimation of heritability for platform-phenotyped traits

Width, depth, convex hull, CGY and depth\_80 at 10 days were extracted from corrected trajectories for each plant root system. Corrected trajectories were obtained by smoothing each plant trajectory with the function locfit of the locfit package in R using 5 time points for smoothing (Loader 1999).

A spatial model using the R package SpATs (Rodríguez-Álvarez *et al.* 2018) was fitted for the five traits mentioned above and for the seven traits measured at the end of the three 4PMI HTPP experiments. In the model, the sum of temperatures (from baseline of 0°C) at the RhizoTube level was used as covariate and the block effect was declared as random. This model uses a 2-dimensional P-spline surface to model spatial heterogeneity in the greenhouse, thus correcting for spatial trends with smoothing splines. Plants with root or aerial biomasses below 0.5 g were removed from the

analysis and considered as outliers. In addition, for each trait, plants with residuals above a threshold (defined by visual examination) were also removed from the analysis (**Annex Table 4**).

Finally, for each trait, genotypes falling outside the distribution were removed by visual examination. This included one genotype for convex hull (value > 40000), one genotype for depth (value > 400), one genotype for width (value > 200 mm) and one genotype for CGY (value > 155 mm).

Marginal means (best linear unbiased estimation, BLUE) per genotype were extracted from the SpATS model to perform further analysis. At this stage, a single genotype from the BW\_div panel with trait values clearly outside the distribution was removed.

The generalized heritability of the corresponding adjusted means was computed for each trait as in (Rodríguez-Álvarez *et al.* 2018) using the SpATS function “getHeritability”, after defining genotype as a random effect.

Adjusted means and heritabilities of the agronomic traits (field trials) had already been computed in previous studies for BW\_elit (Rincent *et al.* 2019; Touzy *et al.* 2019). For the BW\_div and DW\_EPO panels, adjusted means were extracted using SpATs (Rodríguez-Alvarez *et al.* 2017).

### ► Correlations between HTPP RSA traits and agronomic traits measured in fields

Linear correlations between traits measured in the HTPP and agronomic traits measured in fields were computed. As DOE was significantly correlated to yield and yield components in some environments (**Annex Figures 1, 2, 3**), residuals from the linear regression of yield on DOE were computed to correct yield variables GY, GN and TKW for the DOE effect per environment. The corrected variables are named GYC, GNC, and TKC respectively. This avoided spurious correlation between yield and RSA traits purely due to phenology (Canè *et al.* 2014; Xie *et al.* 2017b).

The square root of the determination coefficients, that is the value of R for each model was computed. To account for multiple testing, we computed critical R with a Bonferroni correction based on the number of independent HTPP traits x the number of independent environments. The numbers of independent HTPP traits and independent environments were estimated as the number of principal component analysis (PCA) axes accounting for at least 90 % of the variability of respectively the HTPP traits dataset and the GY dataset. We identified 6 independent variables for the HTPP traits in all panels and respectively 30, 21 and 21 independent variables in BW\_elite, BW\_div and DW\_EPO multi-environment trials, which resulted in 180, 126 and 126 independent tests for the different panels. PCA were computed using the PCA function of the FactomineR package (Lê *et al.* 2008).

Multiple linear models were also used to relate agronomic variables to several root traits measured in the HTPP. Again, the R value (Pearson correlation between the value predicted by the model and the observed value) of the models was analyzed for each environment independently.

## ► QTL detection

The mixed model used for association mapping (Yu *et al.* 2006) was as follows:

$$Y = X\beta + Zu + \varepsilon \text{ with } \text{Var}(u) = K\sigma_g^2 \text{ and } \text{Var}(\varepsilon) = I\sigma_e^2$$

where  $u$  is the random polygenic effect,  $\beta$  represents the vector of fixed effects (intercept, population structure for durum wheat panel, and dosage of the tested SNP),  $K$  represents a matrix of genetic relatedness between individuals (see below),  $I$  is the identity matrix,  $X$  and  $Z$  are incidence matrices for fixed and random effects, respectively, and  $\sigma_g^2$  and  $\sigma_e^2$  are the respective polygenic and error variances.  $K$  was computed following the VanRaden (2008) equation:

$$K = VV' / 2\sum p_i (1 - p_i) \text{ with } V \text{ being the centered marker matrix and } p_i \text{ the allele frequency at marker } i.$$

Each SNP was tested successively with the function GWAS from the R package statgen which is based on the method presented in Kang *et al.* (2010). The EMMA algorithm was used to test the effects as the Fisher exact test was computationally too demanding. In the EMMA algorithm, the variance of the residual and polygenic effects is estimated only once by fitting a model with no SNP. The first principal component of the PCA (% of variability explained by this axis was above 5 %) on genotypic data was considered as a fixed effect in the G + Q model in DW\_EPO to correct for population structure. QQ-Plots were systematically inspected to check that false positives were correctly controlled.

## Selection of significant SNPs

We computed a false discovery rate (FDR) threshold of 30 % as described by Benjamini (2010). This chosen risk of false positives is high, but we expect colocalizations between multiple traits/environments to highlight the importance of some QTLs.

## Computation of QTL boundaries

To define QTL boundaries, we used a method inspired by Cormier *et al.* (2014). For each chromosome and each trait, linkage disequilibrium (LD) was computed between significant markers. Then markers were clustered by LD blocks. QTL boundaries were defined as the minimum and maximum map position of significant markers belonging to the same LD block. QTLs of different traits were considered to overlap when they had at least one common significant marker and were located at a physical distance less than one tenth of the total physical length of the chromosome as presented in (Cormier *et al.* 2014).

The  $R^2$  estimator from Hill and Robertson (1968) was used to assess LD. These LDs were square roots transformed to approximate a normally distributed random variable as in Breseghello and Sorrells (2006). Clustering was performed with the UPGMA method using a cutoff of 1 - "critical  $R^2$ ". Critical  $R^2$  ( $R^2_c$ ) was defined as the 99.9<sup>th</sup> percentile of the distribution of unlinked  $R^2$  computed between 10 000 pairs of markers randomly sampled from different chromosomes. This threshold accounts for the risk of 0.1 % of markers being in LD by chance.

For durum wheat, the panel contains both EPO and elite alleles. Therefore, portions of the genome corresponding

to elite materials create artificial correlation between markers on different chromosomes. We accounted for this effect by using corrected  $R^2_c$  for relatedness using the package LdcorSV (Mangin *et al.* 2012). For bread wheat,  $R^2_c$  was 0.23 and for durum wheat  $R^2_c$  corrected for relatedness was 0.38 rather than 0.92 without correction.

## Colocalization and effect of HTPP root QTLs on field agronomic traits explained by environmental variables

QTLs were considered to co-localize when they had at least one marker in common in their confidence interval. Note that because of the high LD extend of the durum wheat panel, co-localization might be due to both genetic linkage or pleiotropic effects of the loci. For each HTPP QTL co-localizing with a field agronomic trait QTL, for each agronomic productivity trait (GN, GY, TKW, GNC, GYC, and TKC), we regressed environmental variable values onto the QTL effect computed in each environment. Thus, for each HTPP QTL, we computed 6 regressions. Significant regressions were detected with a Bonferroni threshold accounting for the number of significant SNP tested  $\times$  the number of independent variables (estimated as the number of independent axes of a PCA accounting for 90 % of the variability of the dataset;  $n_{\text{Test}} = 66 \text{ SNP} \times 13 \text{ environments}$  for BW\_elite and  $n_{\text{Test}} = 44 \text{ SNP} \times 2 \text{ environments}$  for the durum wheat panel). Correlations were tested only in BW\_elite and in DW\_EPO as environmental variables were only available for these two panels. Multi-trait models were tested using multiple regression with lm and anova function of base R.

## ► Identifying past selection on root traits

To test the hypothesis of past indirect selection of root traits, linear regression between adjusted mean values and dates of cultivar release was performed for 81 elite cultivars of durum wheat and on all cultivars registered in France for bread wheat. Bonferroni correction was performed to account for multiple-trait testing.

# 3 Résultats

## ► Genetic variability and correlation between HTPP traits

Even though the number of replicates in this experiment was low, heritability values were moderate to high ( $0.42 < H^2 < 0.82$ ) which reflects the good quality of the phenotyping (**Table 1**). In general, traits related to biomass and aerial morphology were more heritable than root architecture traits.

	Durum wheat	Bread wheat
Above-ground biomass	0,76	0,67
Number of Leaves	0,82	0,8
Number of tillers	0,76	0,72
Root biomass	0,64	0,59
Root-to-shoot ratio	0,81	0,74
Root number	0,63	0,66
Root angle	0,52	0,64
Depth	0,45	0,69
Width	0,62	0,65
Depth_80%	0,42	0,6
Convex Hull	0,44	0,64
CGY	0,5	0,63

**Table 1 :** Heritability of platform traits in the different panels.

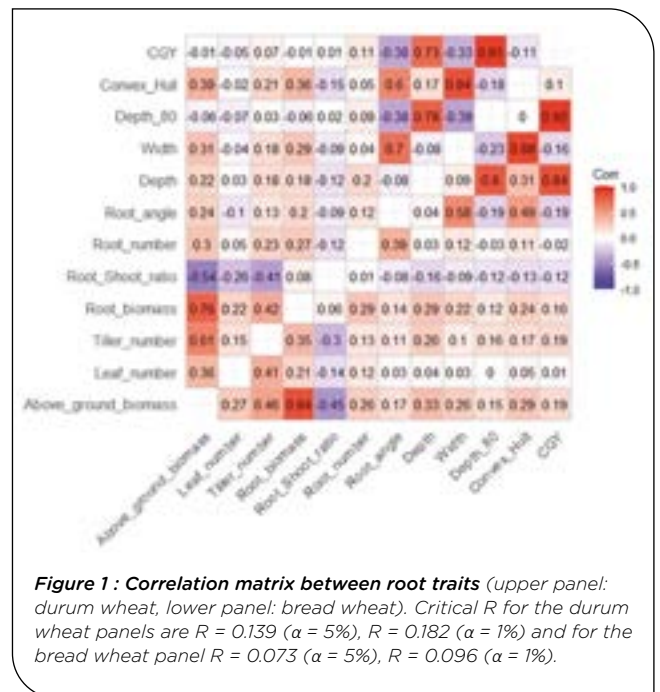
Considerable variability was observed in all panels for all traits. Standard deviations computed on marginal means of HTPP traits ranged from 4.5 % of the mean trait value for number of leaves to 26.0 % for root angle. Traits with the least variability were leaf number, root depth and root depth\_80 (**Table 2, Annex Figure 4**). Root biomass was relatively less variable than above-ground biomass, which could partly explain the high correlation between root-shoot ratio and above-ground biomass. Root angle was the trait with the highest variance. In the elite bread wheat panel phenotypic variances were relatively smaller for root-shoot ratio, root biomass, number of leaves, number of tillers, depth, depth\_80, convex hull and above ground biomass than the corresponding variances in the other panels.

	Bread wheat div	Bread wheat Elit	Durum wheat
Above-ground biomass	0,111	0,101	0,149
Number of leaves	0,045	0,037	0,047
Number of tillers	0,174	0,146	0,197
Root biomass	0,087	0,086	0,102
Root-to-shoot ratio	0,071	0,066	0,084
Root number	0,070	0,076	0,059
Root angle	0,169	0,178	0,125
Depth	0,057	0,039	0,028
Depth_80%	0,053	0,048	0,031
Convex Hull	0,245	0,222	0,138
CGY	0,052	0,044	0,035

**Table 2 :** Coefficient of genetic variation of platform traits in the different panels.

Significant correlations between root traits were similar in the three panels (**Figure 1, Annex Figure 5 and 6**). All above-ground traits were correlated with each other, and root biomass and shoot biomass were strongly correlated ( $r = 0.77$  for durum wheat,  $r = 0.84$  for bread wheat). As a result, root biomass also significantly correlated with most other above-ground traits, for example, with the number of leaves ( $r = 0.21$  for durum wheat,  $r = 0.22$  for bread wheat), and number of tillers ( $r = 0.35$  for durum wheat,  $r = 0.43$  for bread wheat). Interestingly, the root-shoot ratio was negatively

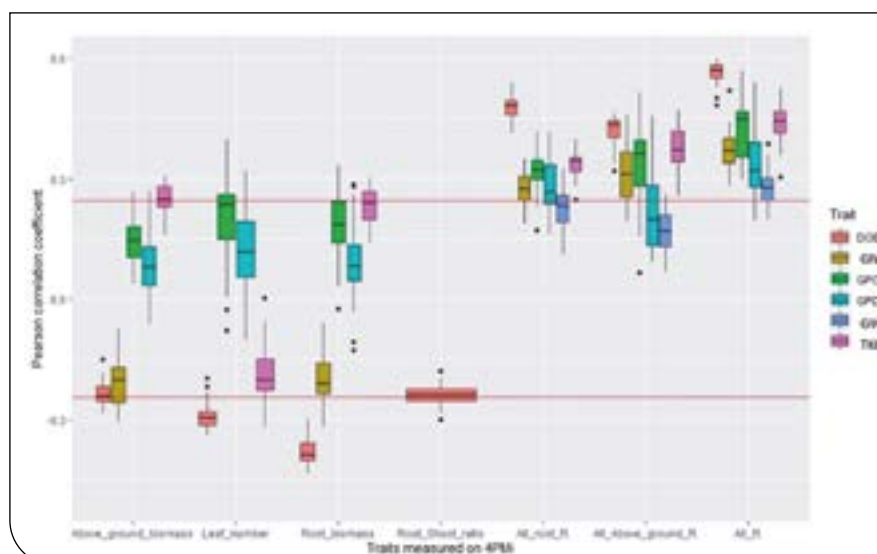
correlated with the number of leaves ( $r = -0.26$  for durum wheat,  $r = -0.14$  for bread wheat). This indicates that at a given date in the beginning of the season, late cultivars that have fewer leaves (due to the longer phyllochron) tended to allocate more resources to their roots than early cultivars that have more leaves at an equivalent stage.



## ► Phenotypic correlations between HTPP and agronomic field traits

### Single trait approach

In BW\_elite, significant correlations were found between grain yield and root traits but these correlations were not significant after correcting for phenology (DOE measured under field conditions) indicating that differences in earliness among the lines partly explain root trait variability (**Figure 2, Annex Table 5 and Figure 7**). Among yield components, TKC was positively correlated in almost half of the environments with root and shoot biomass measured in HTPP.





For BW\_div, most identified correlations disappeared after correction for earliness. However, significant positive correlations remained between root depth and GYC in three environments (17INRmon\_NUE\_HN, 17SYNmoi\_NUE\_HN and 17SYNmoi\_NUE\_LN, **Figure 3, Annex Table 6 and Figure 8**). In another environment (17LIMcas\_WUE\_SEC), root depth was significantly correlated with GNC ( $r = 0.21$ ,  $p$ -value  $< 0.05$ ). Convex hull which represents the soil exploration capacity of the roots in the HTPP, was positively and significantly correlated with GYC in three environments (17BAYmil\_WUE\_IRR,  $r = 0.16$ ; 17INRcle\_WUE\_IRR,  $r = 0.20$ ; 17INRmon\_NUE\_LN,  $r = 0.17$ ,  $p$ -value  $< 0.05$ ). The strongest correlation involving convex hull was for the environment 17INRcle\_WUE\_IRR. That was also the environment where root width was the most significantly correlated with GYC ( $r = 0.21$ ,  $p$ -value  $< 0.05$ ), but root depth was not ( $r = 0.13$ , NS).

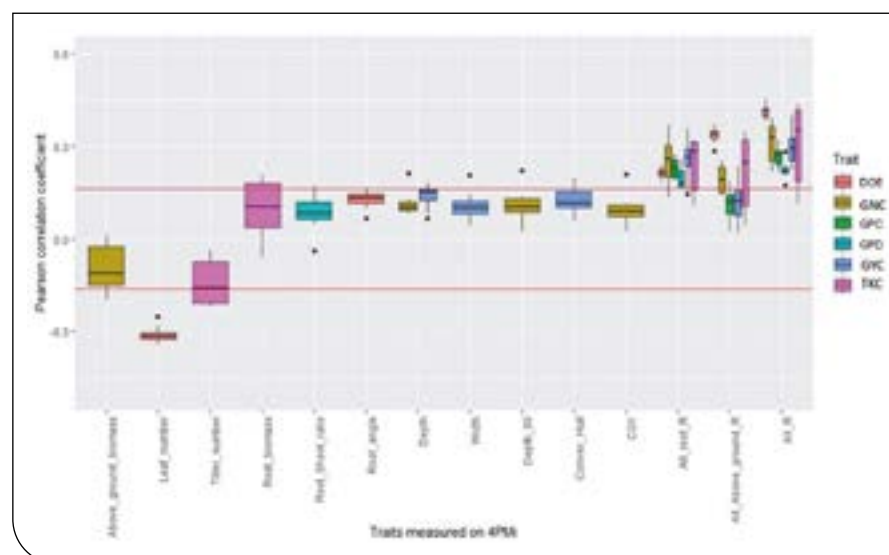
In one non-irrigated environment (17BAYmil\_WUE\_SEC), the root-shoot ratio was significantly correlated to grain protein deviation ( $r = 0.17$ ,  $p$ -value  $< 0.05$ ) but root biomass and above-ground biomass were not ( $r = -0.02$ ,  $r = -0.08$ , **Figure 3 and Annex Figure 8**).

In DW\_EPO\_Elit, no significant correlation was observed between root traits and field traits. However, in two

water-scarce environments the root-shoot ratio was positively though not significantly correlated with GYC (INRAE\_2019\_opt,  $r = 0.22$ ; QUALPREST\_2019,  $r = 0.19$ ). In addition, in the environment QUALPREST\_2019, GPD was also significantly correlated with root-shoot ratio ( $r = 0.33$ ,  $p$ -value  $< 0.05$ ) and with above-ground biomass ( $r = -0.30$ ,  $p$ -value  $< 0.05$ , **Figure 4, Annex Table 7, Figure 9**).

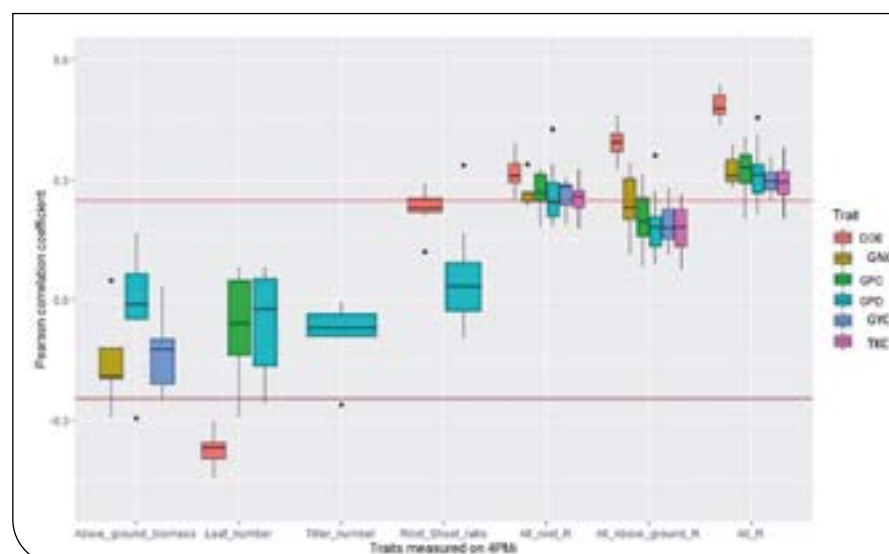
### Multi-trait approach

All the root traits measured in the 4PMI HTPP, when taken together, rarely explained more than 10 % of the variability of agronomic traits whatever the panel (**Figures 2, 3, 4 and Annex Tables 5-7 and Figures 7, 8, 9**). The proportion of variance (R of the linear model) explained by multi-trait linear regression between GYC measured in the different agronomic environments and all root traits were negatively correlated with most water-stress indexes in the durum wheat panel (Annex Table 8). These correlations ranged from -0.51 to -0.79 depending on the timing of the water-stress index considered (ranging from the emergence stage to the maturity stage). This indicates that root traits measured under controlled conditions are more efficient at predicting agronomic performance in water-stressed environments than in other environments. This was not observed in the bread wheat panels.



**Figure 3 : BBoxplot of correlation coefficient between platform traits and agronomic values measured in fields in the bread wheat diversity panel.**

Each point of a boxplot represents one of the 17 environments. Only boxplots with a significant correlation in at least one environment are plotted. The three last series of boxplots correspond to the coefficient of determination of the linear regression between agronomic trait and all root traits measured on platform (All\_root\_R), all traits measured on platform (All\_R), and all above ground traits measured on platform (all\_above\_ground\_R). Red line corresponds to significance levels at the 5% thresholds.



**Figure 4 : Boxplot of correlation coefficients between platform traits and agronomic values measured in fields in the durum wheat panel.**

Each point of a boxplot represents one of the 10 environments. Only boxplots with a significant correlation in at least one environment are plotted. The three last series of boxplots correspond to the coefficient of determination of the linear regression between agronomic trait and all root traits measured on platform (All\_root\_R), all traits measured on platform (All\_R), and all above ground traits measured on platform (all\_above\_ground\_R). Red line corresponds to significance levels at the 5% thresholds.

## ► QTL detection and colocalization between HTPP and field traits

### HTPP and agronomic traits QTL colocalization and relationship with environmental variables in bread wheat

In the bread wheat panels, 100 QTLs were found (**Annex Table 9**) for the HTPP traits (**Figure 5 and Annex Figures 13,14**). Co-localization of these QTLs with QTLs found in the multi-environment trial for agronomic traits are presented in (**Annex Figure 15**).

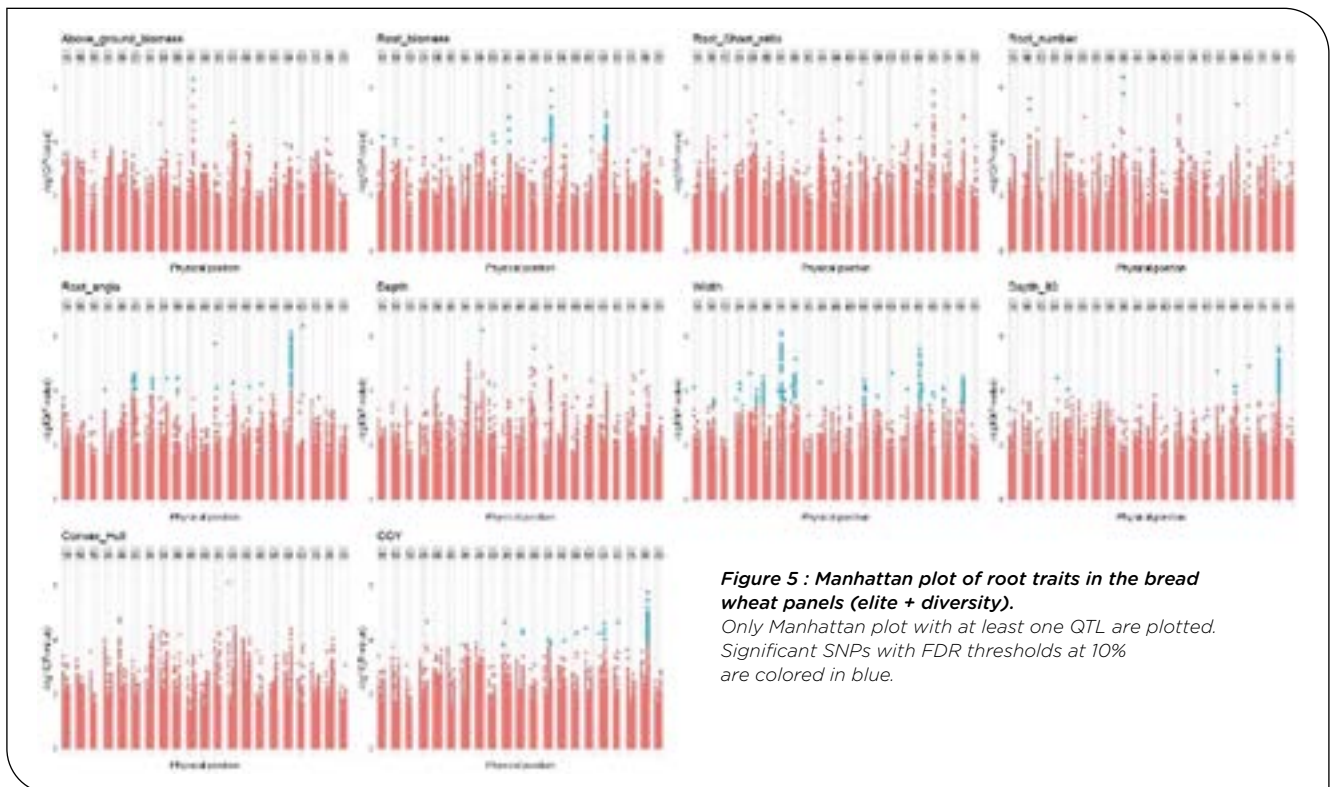
For the HTPP QTLs that colocalized with agronomic QTLs, we tried to identify an environmental variable that correlated significantly with the environment-specific agronomic QTL effect. This was possible for 6 QTLs ( $r^2 > 0.34$ ; Bonferroni correction for 66 SNP tested  $\times$  13 independent variables at a risk of 5 %). Among these 6 root QTLs, one was related to both root and above-ground biomass, and another was related only to agronomic variable non corrected by DOE. Thus, we did not consider them in the following lines. Significant relationships between agronomic QTL allelic effects and environmental variables are presented in Figure 6 and in **Annex Table 10** and **Figure 16**.

First, a QTA with a positive influence on Depth\_80 was beneficial for GYC in a water-stressed environment (during the period of elongation to meiosis) and had a negative impact in non-stressed environments ( $r^2 = 0.37$  ; **Figure 6A**).

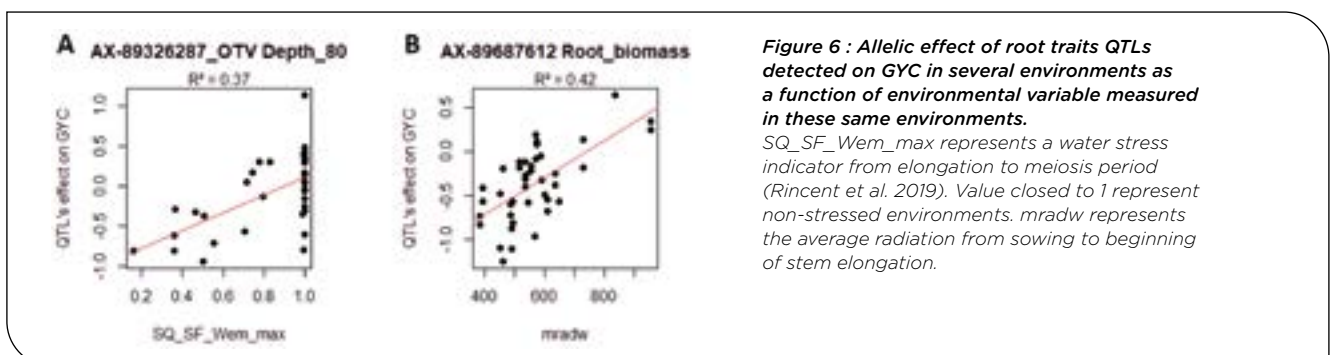
Second, a quantitative trait allele (QTA) altering root and above-ground biomass in the HTPP also had a differential effect on GYC depending on the amount of incident radiation during winter. This QTA had a negative impact on GYC in low radiation conditions and a positive effect in high radiation conditions ( $r^2 = 0.42$  ; **Figure 6B**).

Third, one QTA altering root biomass had a contrasting effect on GYC depending on the number of days with temperature below 0°C between the beginning of stem elongation and flowering. The effect was negative or null in warm environments and positive in cold environments ( $r^2 = 0.46$ ).

Finally, another QTA associated with high root angle had a significant negative effect on TKC only in the most stressed environment (AVRgre2014sec) during the period from elongation to meiosis (combined water, temperature and nitrogen stress) of the multi-environment trial.

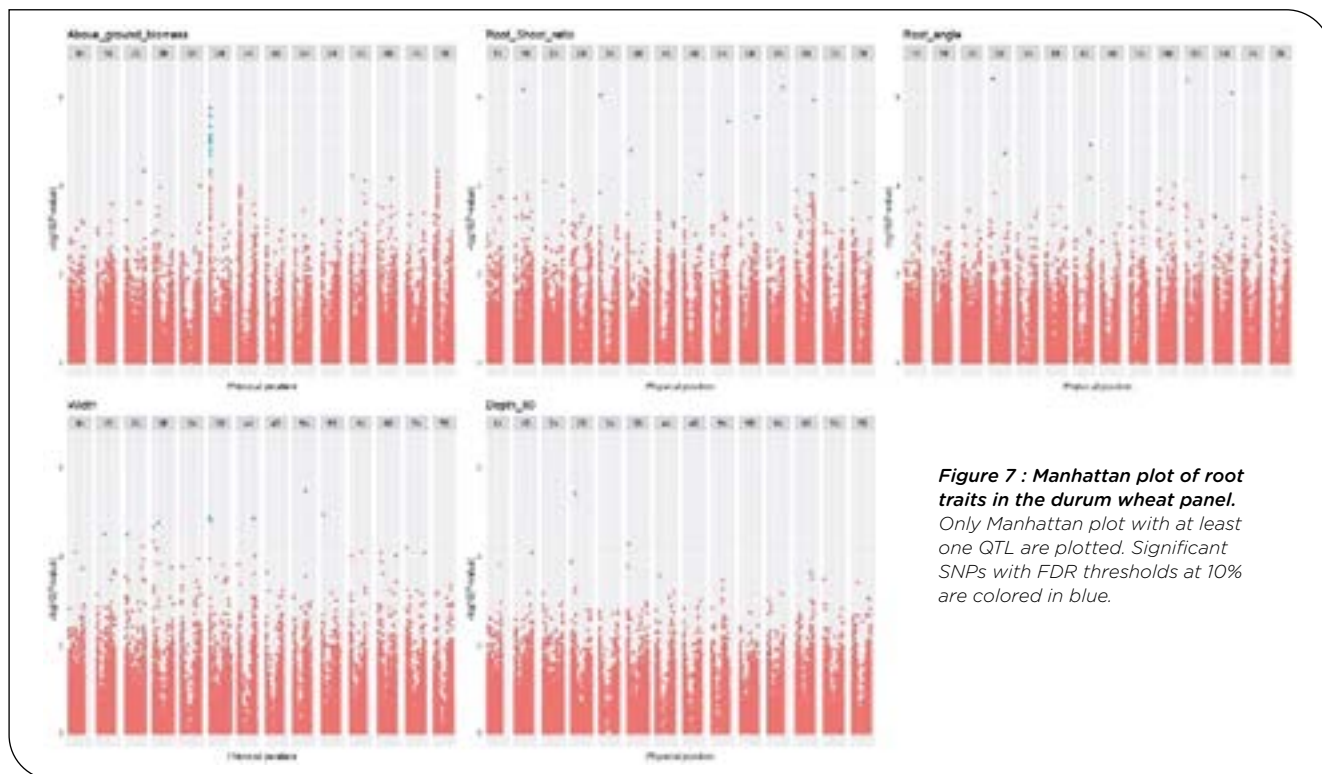


**Figure 5 : Manhattan plot of root traits in the bread wheat panels (elite + diversity).**  
Only Manhattan plot with at least one QTL are plotted. Significant SNPs with FDR thresholds at 10% are colored in blue.



**Figure 6 : Allelic effect of root traits QTLs detected on GYC in several environments as a function of environmental variable measured in these same environments.**

SQ\_SF\_Wem\_max represents a water stress indicator from elongation to meiosis period (Rincet et al. 2019). Value closed to 1 represent non-stressed environments. mradw represents the average radiation from sowing to beginning of stem elongation.



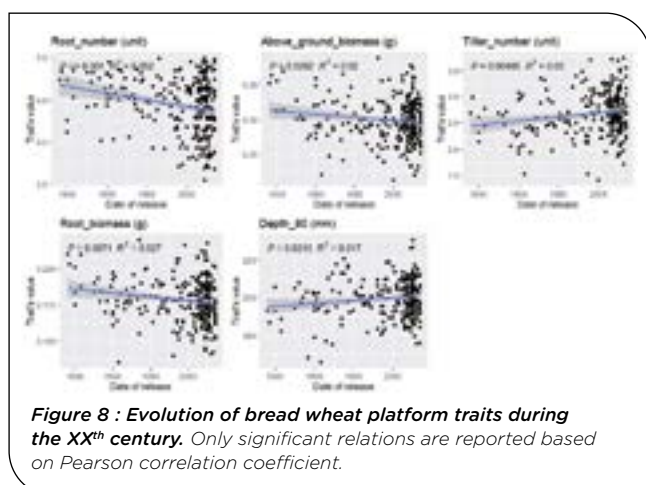
**Figure 7 : Manhattan plot of root traits in the durum wheat panel.** Only Manhattan plot with at least one QTL are plotted. Significant SNPs with FDR thresholds at 10% are colored in blue.

#### HTPP and agronomic traits QTL colocalization and relationship with environmental variables in bread wheat in durum wheat

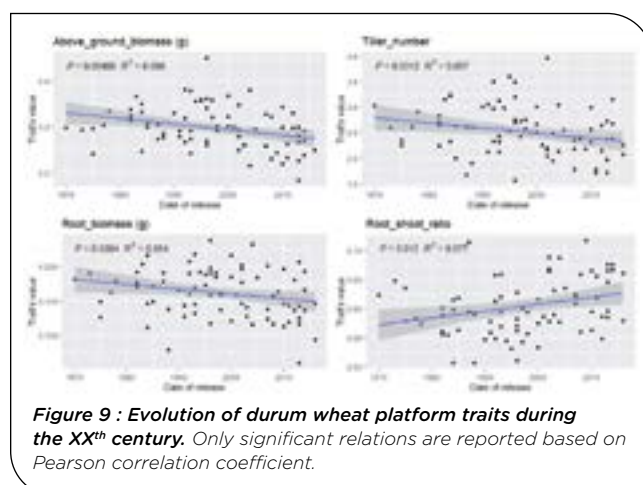
Thirty-four QTLs related to root traits measured under 4PMI HTPP conditions were found in the durum wheat panel (**Annex Table 11**): one for above-ground biomass, one for depth\_80, seven for root angle, seven for root-shoot ratio, three for convex hull, and fifteen for width (**Figure 7 and Annex Figures 17 and 18**). Most of these QTLs co-localize with QTLs of agronomic traits measured in fields (**Annex Figure 19**). Because some regions of the genome have a high LD extent, some QTL had wide confidence intervals, which may generate colocalizations involving numerous genes. We could not explain the environment-specific allelic effect of the HTPP QTLs on agronomic traits with environmental variables (highest  $R = 0.74 < R_{critical} = 0.91$ ). In addition, the highest correlations were obtained with agronomic variables that were not corrected for earliness, indicating that earliness plays an important role in this correlation.

#### Root trait variation in varieties from different registration periods

For most traits, no correlation between variety registration date and trait values was found (**Annex Figures 20, 21**). However, some trends were observed for traits related to root depth in bread wheat (**Figure 8**). Root angle, depth and CGY values increased steadily in varieties registered between 1940 and 2010 ( $p$ -value = 0.07 and 0.08, respectively). This was confirmed by the significant increase observed for Depth\_80 ( $p$ -value = 0.03) over time. Such trends were not observed in durum wheat. In bread wheat, the mean number of seminal roots has decreased significantly ( $p$ -value = 0.0002) from 4.5 in varieties registered before 1940 to 4.2 for the newest cultivars. In durum wheat, the same phenomenon occurred but not to a significant extent ( $p$ -value = 0.09). From 1940 to 2015, in bread wheat, newly registered cultivars had more tillers going from 2.4 tillers before 1960 to 2.75 for the most recent cultivars ( $p$ -value = 0.004). The



**Figure 8 : Evolution of bread wheat platform traits during the XX<sup>th</sup> century.** Only significant relations are reported based on Pearson correlation coefficient.



**Figure 9 : Evolution of durum wheat platform traits during the XX<sup>th</sup> century.** Only significant relations are reported based on Pearson correlation coefficient.



opposite was observed in durum wheat ( $p$ -value = 0.03, Figure 9) with a decrease from 2.75 tillers for varieties registered in 1970 to 2.25 in 2015. A slight decrease in root and above-ground biomass was also detected in both species ( $p$ -value < 0.05). Finally, in durum wheat a significant increase in the root-shoot ratio was observed ( $p$ -value = 0.012) over the registration period studied.

## 4 Discussion

In the present study we characterized root traits on two bread wheat panels and one durum wheat panel grown in controlled conditions in three successive experiments, to investigate whether root traits measured in platforms can be related to field performances and to what extent any relationship at the trait or at the QTL level is environment specific.

### ► Genetic variability and correlation between RSA traits

Heritabilities of the RSA traits were intermediate to high (Table 1) and similar to heritabilities observed in comparable studies, e.g.  $H^2 = 0.73$  for root angle and  $H^2 = 0.67$  for the number of roots in (Canè *et al.* 2014). Higher heritability of root biomass ( $H^2 = 0.75$ ) and seminal root angle ( $H^2 = 0.85$ ) has been reported in an experiment with 6 independent replicates (Beyer *et al.*, 2019). In our study, each non-check variety was repeated six times, but only in three independent rhizotubes and this was apparently not sufficient to reach such high heritabilities. In addition, heritabilities are highly dependent on the genetic variance of the population studied and some studies with higher values for heritability were based on inter-specific populations, which resulted in higher phenotypic variability (Xie *et al.* 2017a). Phenotypic variability was intentionally maximized when defining the durum wheat panel, which is partly composed of lines derived from crosses with wild relatives. This translated to higher genetic variances and heritabilities for several traits (Table 1), despite the panel being much smaller than the bread wheat panel. In summary, our experimental setup enables us to scan a large part of the genetic and phenotypic variability associated with studied traits in wheat species.

The range of RSA trait values measured in our study (Table 2; Annex Figure 1) are also coherent with the literature for seminal root angle, number of roots (Canè *et al.* 2014; Adeleke *et al.* 2020), and root biomass (Beyer *et al.* 2019). RSA traits were correlated in our case, which is in line with reports of high correlations between wheat root seedling traits (Adeleke *et al.* 2020; Atkinson *et al.* 2015; Bai *et al.* 2013; Beyer *et al.* 2019; Kabir *et al.* 2015). This might be attributed to high phenotypic variability in inter-species or inter-population comparisons (Adeleke *et al.* 2020; Kabir *et al.* 2015). Comparison of less diverse population might yield lower correlations. Indeed, if we merge the elite and the diversity panels for both species, correlation between traits increases. Thus, some trait correlations can be seen at a larger scale but not at the intraspecific scale. The weakness of the correlations indicates that the traits we measured might capture different independent features of RSA. This is confirmed by the detection of distinct genetic determinism (QTLs) for each trait.

Consistent correlations were observed between aerial biomass and root biomass ( $r > 0.75$  in all panels in

both species) and between aerial biomass and the root-shoot ratio. This might reflect developmental constraints and the trade-off in carbon allocation to the different organs of the plants. This interpretation is borne out by the narrower genetic variability of the observed root-shoot ratio compared to other traits.

### ► Trends in root traits in cultivars registered between 1940 and 2010

Two groups of traits have been incorporated into wheat developed during the period from 1940 to 2010. First, the number of tillers increased in both species (Figures 8, 9, Annex Figures 20-21). In bread wheat this was accompanied with a decrease in the number of seminal roots (Figure 8). During seedling development, seminal roots develop first, then tillers develop from axillary buds either from the coleoptile or leaves (Klepper *et al.* 1982). As we did not observe a significant increase in the number of leaves with respect to the cultivar registration year, we may assume that either slightly more buds develop in more recent cultivars or that buds develop more rapidly. In our experiment, plants had three, five, or seven seminal roots. More rapid bud development associated with an increase in tiller number might explain why there are fewer seminal roots if faster tiller bud growth prevents the development of the last pair of seminal roots. Not all tillers go on to carry an ear at harvest, but the data may reflect the genetic progress reported for the number of ears m<sup>-2</sup> in several studies (Austin *et al.* 1989; Green *et al.* 2012; Sanchez-Garcia *et al.* 2013).

A significant reduction in shoot and root biomass has been bred into cultivars of both species between 1940 and 2010 (Figure 8 and Figure 9). This was accompanied with a deepening of the root system during the same period in bread wheat only (Figure 8). Zhu *et al.* (2019) also observed that very recent cultivars (registered after 2008) have deeper roots than old cultivars registered before 1900. Aziz *et al.* (2017) reported that in Australian wheat root and above-ground biomass at the booting stage has been reduced. This can be interpreted in light of the group selection theory (Denison *et al.* 2003). With less competition between plants due to reduced vegetative biomass, narrow root angle and a deep root system (Nakhforoosh *et al.* 2021) the stand performance is maximized (Donald 1968). Much of modern breeding can indeed be interpreted as an endeavor to reduce the size of organs promoting competition (roots, plant heights) to maximize the performance in the fields rather than the performance of individual plants. This type of evolution has been reported during the domestication process over a longer time scale (Nakhforoosh *et al.* 2021).

In general, there is no consensus on whether root traits were indirectly selected or not (Aziz *et al.* 2017; Chloupek *et al.* 2006; Cholick *et al.* 1977; Hurd 1974; Lupton *et al.* 1974). One reason may be due to the size of sample errors as most of the studies are based on only a few genotypes (<20), insufficient to represent large periods of history (between 50 and more than 100 years). Another reason may be the high genotype x environment x management (G x E x M) interactions resulting in different adaptive values of root traits depending on the breeding environments.

In addition to these historic trends it would be interesting to look at geographic patterns related to root traits.

We can indeed expect that breeding has contributed to adapting root traits to local pedoclimatic constraints. This could for instance be used to determine local ideotype adapted to future climatic conditions.

### ► Correlation between HTPP and agronomic field performances

In several papers, inconsistent relationships between root traits and agronomic performances across years and environments were reported (Canè *et al.* 2014; Roselló *et al.* 2019; Xie *et al.* 2017, Rich *et al.* 2020). Our results are in line with this observation especially in the most phenotypically diverse panel (BW\_div, Figures 2, 3, 4). This suggests that the adaptive value of RSA varies from one environment to another. Indeed, environments where root depth was adaptive (high correlation between root depth and yield or agronomic value) were distinct from those where root width was adaptive (high correlation between root width and yield or agronomic value). All of this suggests that the relation between RSA and yield depends on the characteristics of the environment.

The adaptive value of specific root traits is known in Australian environments with specific stress patterns. For instance, in the north-eastern wheat belt of Australia, where crops rely on stored soil moisture to complete the whole cycle and with a high risk of water shortage during grain filling, the optimal strategy was to manage the available water in the soil reserve during the crop cycle by capturing less water at early stages of development, keeping resources in reserve for the grain-filling stage (Passioura 1972, Dreccer *et al.* 2000; Manschadi *et al.* 2006). In Mediterranean-like environments of the south western part of Australia, where crops rely mainly on seasonal rainfall, increasing root biomass, root length density and root volume might increase early vigour, pre-anthesis water use and crop performances (Rebetzke *et al.* 1999, Mandaschi *et al.* 2006). Contrasted performances between wheat of these two regions are mainly driven by the adaptation of cultivars to the water stress pattern whereas trials of our multi-environment trials are mostly located in France with restricted climatic variations. Thus, many stresses each explaining a small proportion of performance variability and the adaptive value of a particular RSA might be less visible in our experiment. Understanding the adaptive value of a particular trait regarding a stress requires a fine characterization of the resources of the environment and thus measurement of many environmental variables. Here we evaluate whether, according to the results of the multi-environment trials, environmental variables describing a stress pattern can explain the inconsistency of the relationships between root traits and agronomic performances, as we hypothesize.

#### At the trait level

First, in the BW\_div panel, despite the many significant correlations observed between root traits and agronomic variables, we could not test our hypothesis as we did not have information on the environmental variables. Thus we can only speculate that the relationship between root depth and GYC in three environments (17INRmon\_NUE\_HN, 17SYNmoi\_NUE\_HN and 17SYNmoi\_NUE\_LN) might be due to cultivars with deep roots gaining extra access

to nutrients and water, resulting in higher yield especially in water-scarce environments and nutrient-poor environments (Nakhforoosh *et al.* 2021; Palta *et al.* 2011, Robinson *et al.* 2018). In the same vein, we speculate that observed relationships between root biomass and TKW (and TKC) and between root-shoot ratio and GPD in the 17 BAY\_mil\_SEC environment might be explained by access to extra resources during the grain filling period. Indeed, GPD and TKW are both determined after flowering and are dependent on water and nitrogen uptake in the soil. It has indeed specifically been shown that GPD is correlated to post-flowering nitrogen absorption in a trial network set up in Northern France (Bogard *et al.* 2010).

Second, in BD\_EPO, some environmental characterizations were available especially regarding water stress. We found two elements confirming our hypothesis. First, we observed better performances in durum varieties with high root-shoot ratios in QUALPREST\_2019 and INRAE\_2019\_opt environments. The common features of these two environments were deep soil and the strongest water stress of the multi-environment trial. Specifically, the water stress index dropped early at tillering down to 0.72 compared to 0.9 for the other environments. Thus, for an equal above-ground biomass, plants with higher root biomass were able to capture more water at depth and thus avoid yield loss due to stress.

Third, using multi-trait approaches to better describe RSA, we found that the relationship between root traits and GYC was more important in water-deficient environments where roots are likely to play a major role in water uptake, especially in the most stressed environments (e.g. INRA\_2019\_sec, INRA\_2019\_opt).

Lastly, in the BW\_elit panel, environmental characterization was precise (Rincant *et al.* 2019) but no correlation was found between agronomic performances and root traits, likely due to the narrow range of phenotypic variation compared with the other panels.

#### At the allele level

We found numerous RSA QTLs which co-localize with agronomic performance QTLs. Assuming that the SNPs responsible for the variation in the RSA QTLs and the variation in agronomic performances are the same, some RSA QTLs have contrasting effects depending on the level of stress according to environmental covariates. If relationship patterns can therefore be explained at both the phenotypic and allelic level, it follows that alleles conferring specific RSA might be suboptimal in some environments and optimal in others. If so, it would be advisable for future breeding programs on root traits to carefully consider the characteristics of the target environments.

Two types of cases were identified regarding the relation between RSA QTL effects on agronomic variables and environmental variables.

First, we found some quantitative trait alleles (QTA) whose effects vary linearly with environmental variable. For instance, the QTA increasing root depth increases yield in stressed environments. Deeper roots might enable plants to access water from deeper layers and have been associated with high yield in some environments (Bai *et al.* 2019). The QTA allele decreasing both root and above-ground biomass (**Table 5**, marker AX-89687612) was detrimental to yield only in a radiation-poor

environment, and indeed low aerial biomass is expected to be detrimental in such an environment.

Second, some QTA had a significant effect on an agronomic variable only when the environmental variable reached a certain threshold. For instance, the QTA allele increasing root angle (Table 5, marker AX-89517948) had a negative effect on TKC only in the environment AVRgre2014sec, by far the most stressed conditions of the multi-environment trial. No effect was observed in less stressed environments. Wide RSA might diminish access to deep soil layers and increase competition between plants for resources and in particular water. This may have a particularly detrimental effect for TKW in water-stressed environments when the stress occurs around meiosis, for example, by inducing early senescence of the flag leave, which is normally photosynthetically active, and so limiting the resources for grain-filling.

Thus, environmental variables describing a stress pattern can be used to decipher the complex relationships between root traits and agronomic performance. This was demonstrated especially for traits related to root depth, root-shoot ratio and root biomass. Given that the same root allele or root trait can have a beneficial effect on agronomic performance in one environment and detrimental effect in another, root ideotyping is an essential step for any breeding program before performing any selection.

#### ► Future application of platform-phenotyping

Use of HTPP such as the 4PMI platform is still in its infancy. The limitations of HTPP are acknowledged, such as the lack of correlation between RSA in HTPP and RSA in field (Watt *et al.* 2013; Bai *et al.* 2019), the lack of correlation between early RSA and mature RSA even in the same environment (Lynch and Brown 2012; Watt *et al.* 2013), and the high influence of genotype x environment interactions on root variability (Botwright Acuña and Wade 2012). We have nevertheless demonstrated that it is still possible to identify interesting links between traits measured in HTPP and field performances at both the trait and allelic level. Distinct QTL and genetic determinism were found for both bread and durum wheat and for all traits, indicating that the HTPP measurements captured independent features of the RSA. With continued developments in image analysis, the 4PMI platform will be able to scan many other root traits that might be useful to breeders. Particularly, dynamic traits measured over time and derived traits from response curves to major environmental factors would be meaningful for studying RSA and detecting genotypes that are more adapted to global change. The first dynamic wheat mapping studies were conducted on aerial traits using sampled time points either in controlled conditions (Camargo *et al.* 2018) or in the field (Lyra *et al.* 2020), leading to the identification of QTLs that were persistent over the growth period and transient QTLs, both types being potential new targets for breeding. In addition, dynamic phenotyping would make it easier to compare RSA traits of cultivars with very different phenology. For instance, there is a general trend for the root-shoot ratio to decrease over time, as was shown for 17 eudicot species by (Mašková and Herben 2018). When properly calibrated, high-throughput imaging can estimate biomasses non-destructively (Tracy *et al.*

2020). at the same developmental stage (based on the number of leaves of the main stem) or at the same shoot biomass, thus allowing comparison of root traits on very different accessions with less bias linked to phenology.

## 5 Conclusion

Our study has shown that root traits measured in a platform are moderately heritable in the three studied panels of bread and durum wheat. We confirmed that the relationship between root traits measured in controlled conditions at an early stage and traits measured in fields is highly dependent on the environmental conditions experienced in the fields. We used environmental variables to explain the variability of the relationship between root traits and agronomic performances. This relation holds true at both the trait and the allelic level.

At the trait level, the geometry of RSA (wide or deep) enables adaptation to distinct environments in bread wheat. In durum wheat, the relationships between root traits (particularly root-shoot ratio) and agronomic variables (particularly GYC) were stronger in water stress.

At the allelic level, we found numerous root QTLs in both species. Some QTLs had an effect on agronomic performances varying linearly with environmental variables whereas others had an effect on agronomic performances only when the environmental variable reached a specific threshold.

This highlights that multi-environment trials are required to evaluate the agronomic value of root phenotypes measured in HTPP and that breeders should prioritize root ideotyping for target environments.

## 6 Acknowledgements

Part of the data were obtained with the support of the PIA (Investment for the Future Program) Breedwheat (ANR-10-BTBR-03) and Phenome (ANR-11-INBS-0012) projects funded by the National Research Agency (ANR), FranceAgriMer, and the French Plant Breeding Support Funds (FSOV ArchiRac).

## 7 Authors contribution statement

CM, RR and RP analysed the data. PR, SC, JC, LM, NW, DB, AV, GJL and RR participated to the 4PMI experiments. SC, JC and RR designed the 4PMI experiments. LM analysed the 4PMI images. TBWC provided the genotyping and field phenotyping data. RP, SC, JC, LM, LS, BK, JLG and RR initiated the projet. RR supervised the project and designed the experiments. CM wrote the manuscript under the supervision of RR, GJL, AV and RP. All authors reviewed the manuscript.

## 8 Conflict of interest

*Authors Stéphane Lafarge, Pierre Dubreuil, Anne-Valérie Dumas were employed by Biogemma Limagrain. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.*



## Références bibliographiques

- Atkinson, J. A., Wingen, L. U., Griffiths, M., Pound, M. P., Gaju, O., Foulkes, M. J., *et al.* (2015). Phenotyping pipeline reveals major seedling root growth QTL in hexaploid wheat. *Journal of Experimental Botany* 66, 2283–2292. doi:10.1093/jxb/erv006.
- Atta, B. M., Mahmood, T., and Trethowan, R. M. (2013). Relationship between root morphology and grain yield of wheat in north-western NSW, Australia. *Australian Journal of Crop Science*, 2013, vol. 7, no 13, p. 2108–2115.
- Austin, R. B., Ford, M. A., and Morgan, C. L. (1989). Genetic improvement in the yield of winter wheat: a further evaluation. *The Journal of Agricultural Science* 112, 295–301. doi:10.1017/S0021859600085749.
- Ayalew, H., Ma, X., and Yan, G. (2015). Screening Wheat (*Triticum spp.*) Genotypes for Root Length under Contrasting Water Regimes: Potential Sources of Variability for Drought Resistance Breeding. *Journal of Agronomy and Crop Science* 201, 189–194. doi:10.1111/jac.12116.
- Aziz, M. M., Palta, J. A., Siddique, K. H. M., and Sadras, V. O. (2017). Five decades of selection for yield reduced root length density and increased nitrogen uptake per unit root length in Australian wheat varieties. *Plant Soil* 413, 181–192. doi:10.1007/s11104-016-3059-y.
- Bai, C., Ge, Y., Ashton, R. W., Evans, J., Milne, A., Hawkesford, M. J., *et al.* (2019). The relationships between seedling root screens, root growth in the field and grain yield for wheat. *Plant Soil* 440, 311–326. doi:10.1007/s11104-019-04088-9.
- Bai, C., Liang, Y., and Hawkesford, M. J. (2013). Identification of QTLs associated with seedling root traits and their correlation with plant height in wheat. *Journal of Experimental Botany* 64, 1745–1753. doi:10.1093/jxb/ert041.
- Balfourier, F., Bouchet, S., Robert, S., Oliveira, R. D., Rimbart, H., Kitt, J., *et al.* (2019). Worldwide phylogeography and history of wheat genetic diversity. *Science Advances* 5, eaav0536. doi:10.1126/sciadv.aav0536.
- Bengough, A. G., Gordon, D. C., Al-Menaie, H., Ellis, R. P., Allan, D., Keith, R., *et al.* (2004). Gel observation chamber for rapid screening of root traits in cereal seedlings. *Plant and Soil* 262, 63–70. doi:10.1023/B:PLSO.0000037029.82618.27.
- Benjamini, Y. (2010). Discovering the false discovery rate. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)* 72, 405–416. doi:10.1111/j.1467-9868.2010.00746.x.
- Beral, A., Rincet, R., Gouis, J. L., Girousse, C., and Allard, V. (2020). Wheat individual grain-size variance originates from crop development and from specific genetic determinism. *PLOS ONE* 15, e0230689. doi:10.1371/journal.pone.0230689.
- Beyer, S., Daba, S., Tyagi, P., Bockelman, H., Brown-Guedira, G., Mohammadi, M., *et al.* (2019). Loci and candidate genes controlling root traits in wheat seedlings—a wheat root GWAS. *Funct Integr Genomics* 19, 91–107. doi:10.1007/s10142-018-0630-z.
- Bogard, M., Allard, V., Brancourt-Hulmel, M., Heumez, E., Machet, J.-M., Jeuffroy, M.-H., *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. doi:10.1093/jxb/erq238.
- Breseghello, F., and Sorrells, M. E. (2006). Association Mapping of Kernel Size and Milling Quality in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Cultivars. *Genetics* 172, 1165–1177. doi:10.1534/genetics.105.044586.
- 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 Research* 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 Research* 57, 335–347. doi:10.1016/S0378-4290(98)00080-X.
- Camargo, A. V., Mackay, I., Mott, R., Han, J., Doonan, J. H., Askew, K., *et al.* (2018). Functional Mapping of Quantitative Trait Loci (QTLs) Associated With Plant Performance in a Wheat MAGIC Mapping Population. *Front. Plant Sci.* 9. doi:10.3389/fpls.2018.00887.
- Canè, M. A., Maccaferri, M., Nazemi, G., Salvi, S., Francia, R., Colalongo, C., *et al.* (2014). Association mapping for root architectural traits in durum wheat seedlings as related to agronomic performance. *Mol Breeding* 34, 1629–1645. doi:10.1007/s11032-014-0177-1.
- Cao, P., Ren, Y., Zhang, K., Teng, W., Zhao, X., Dong, Z., *et al.* (2014). Further genetic analysis of a major quantitative trait locus controlling root length and related traits in common wheat. *Mol Breeding* 33, 975–985. doi:10.1007/s11032-013-0013-z.
- Chloupek, O., Forster, B. P., and Thomas, W. T. B. (2006). The effect of semi-dwarf genes on root system size in field-grown barley. *Theor Appl Genet* 112, 779–786. doi:10.1007/s00122-005-0147-4.
- Cholick, F. A., Welsh, J. R., and Cole, C. V. (1977). Rooting Patterns of Semi-dwarf and Tall Winter Wheat Cultivars under Dryland Field Conditions<sup>1</sup>. *Crop Science* 17, cropscl1977.0011183X001700040040x. doi:10.2135/cropscl1977.0011183X001700040040x.
- Christopher, J., Christopher, M., Jennings, R., Jones, S., Fletcher, S., Borrell, A., *et al.* (2013). QTL for root angle and number in a population developed from bread wheats (*Triticum aestivum*) with contrasting adaptation to water-limited environments. *Theor Appl Genet* 126, 1563–1574. doi:10.1007/s00122-013-2074-0.
- Cormier, F., Le Gouis, J., Dubreuil, P., Lafarge, S., and Praud, S. (2014). A genome-wide identification of chromosomal regions determining nitrogen use efficiency components in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 127, 2679–2693. doi:10.1007/s00122-014-2407-7.
- David, J., Holtz, Y., Ranwez, V., Santoni, S., Sarah, G., Ardisson, M., *et al.* (2014). Genotyping by sequencing transcriptomes in an evolutionary pre-breeding durum wheat population. *Mol Breeding* 34, 1531–1548. doi:10.1007/s11032-014-0179-z.
- Denison, R. F., Kiers, E. T., and West, S. A. (2003). Darwinian Agriculture: When Can Humans Find Solutions Beyond the Reach of Natural Selection? *The Quarterly Review of Biology* 78, 145–168. doi:10.1086/374951.
- Donald, C. M. (1968). The breeding of crop ideotypes. *Euphytica* 17, 385–403. doi:10.1007/BF00056241.
- Doussan, C., Pierret, A., Garrigues, E., and Pagès, L. (2006). Water Uptake by Plant Roots: II – Modelling of Water Transfer in the Soil Root-system with Explicit Account of Flow within the Root System – Comparison with Experiments. *Plant Soil* 283, 99–117. doi:10.1007/s11104-004-7904-z.
- Dreccer, M. F., Schapendonk, A. H. C. M., Slafer, G. A., and Rabbinge, R. (2000). Comparative response of wheat and oilseed rape to nitrogen supply: absorption and utilisation efficiency of radiation and nitrogen during the reproductive stages determining yield. *Plant and Soil* 220, 189–205. doi:10.1023/A:1004757124939.

- Elazab, A., Serret, M. D., and Araus, J. L.** (2016). Interactive effect of water and nitrogen regimes on plant growth, root traits and water status of old and modern durum wheat genotypes. *Planta* 244, 125-144. doi:10.1007/s00425-016-2500-z.
- Friedli, C. N., Abiven, S., Fossati, D., and Hund, A.** (2019). Modern wheat semi-dwarfs root deep on demand: response of rooting depth to drought in a set of Swiss era wheats covering 100 years of breeding. *Euphytica* 215, 85. doi:10.1007/s10681-019-2404-7.
- Green, A. J., Berger, G., Griffey, C. A., Pitman, R., Thomason, W., Balota, M., et al.** (2012). Genetic Yield Improvement in Soft Red Winter Wheat in the Eastern United States from 1919 to 2009. *Crop Science* 52, 2097-2108. doi:10.2135/cropsci2012.01.0026.
- Gregory, P. J., Bengough, A. G., Grinev, D., Schmidt, S., Thomas, W. (Bill) T. B., Wojciechowski, T., et al.** (2009). Root phenomics of crops: opportunities and challenges. *Functional Plant Biol.* 36, 922-929. doi:10.1071/FP09150.
- Hill, W. G., and Robertson, A.** (1968). Linkage disequilibrium in finite populations. *Theoret. Appl. Genetics* 38, 226-231. doi:10.1007/BF01245622.
- Hund, A., Reimer, R., and Messmer, R.** (2011). A consensus map of QTLs controlling the root length of maize. *Plant Soil* 344, 143-158. doi:10.1007/s11104-011-0735-9.
- Hund, A., Trachsel, S., and Stamp, P.** (2009). Growth of axile and lateral roots of maize: I development of a phenotyping platform. *Plant Soil* 325, 335-349. doi:10.1007/s11104-009-9984-2.
- Hurd, E. A.** (1974). Phenotype and drought tolerance in wheat. *Agricultural Meteorology* 14, 39-55. doi:10.1016/0002-1571(74)90009-0.
- Jeady, C., Adrian, M., Baussard, C., Bernard, C., Bernaud, E., Bourion, V., et al.** (2016). RhizoTubes as a new tool for high throughput imaging of plant root development and architecture: test, comparison with pot grown plants and validation. *Plant Methods* 12, 31. doi:10.1186/s13007-016-0131-9.
- Kang, H. M., Sul, J. H., Service, S. K., Zaitlen, N. A., Kong, S., Freimer, N. B., et al.** (2010). Variance component model to account for sample structure in genome-wide association studies. *Nat Genet* 42, 348-354. doi:10.1038/ng.548.
- Klepper, B., Rickman, R. W., and Peterson, C. M.** (1982). Quantitative Characterization of Vegetative Development in Small Cereal Grains. *Agronomy Journal* 74, 789-792. doi:10.2134/agronj1982.00021962007400050005x.
- Kuijken, R. C. P., van Eeuwijk, Fred. A., Marcelis, L. F. M., and Bouwmeester, H. J.** (2015). Root phenotyping: from component trait in the lab to breeding. *Journal of Experimental Botany* 66, 5389-5401. doi:10.1093/jxb/erv239.
- Lê, S., Josse, J., and Husson, F.** (2008). FactoMineR : An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Soft.* 25. doi:10.18637/jss.v025.i01.
- Li, P., Chen, J., Wu, Y., Zhang, J., Chu, C., See, D., et al.** (2011). Quantitative Trait Loci Analysis for the Effect of Rht-B1 Dwarfing Gene on Coleoptile Length and Seedling Root Length and Number of Bread Wheat. *Crop Science* 51, 2561. doi:10.2135/cropsci2011.03.0116.
- Loader, C. ed.** (1999). "Fitting with LOCFIT," in *Local Regression and Likelihood Statistics and Computing*. (New York, NY: Springer), 45-58. doi:10.1007/0-387-22732-6\_3.
- Lou, Q., Chen, L., Mei, H., Wei, H., Feng, F., Wang, P., et al.** (2015). Quantitative trait locus mapping of deep rooting by linkage and association analysis in rice. *Journal of Experimental Botany* 66, 4749-4757. doi:10.1093/jxb/erv246.
- Lupton, F. G. H., Oliver, R. H., Ellis, F. B., Barnes, B. T., Howse, K. R., Welbank, P. J., et al.** (1974). Root and shoot growth of semi-dwarf and taller winter wheats. *Annals of Applied Biology* 77, 129-144. doi:10.1111/j.1744-7348.1974.tb06881.x.
- Ly, D., Chenu, K., Gauffreteau, A., Rincant, R., Huet, S., Gouache, D., 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. doi:10.1016/j.fcr.2017.09.024.
- Lynch, J. P., and Brown, K. M.** (2012). New roots for agriculture: exploiting the root phenome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367, 1598-1604. doi:10.1098/rstb.2011.0243.
- Lynch, J. P., and Lynch, J. P.** (2007). Roots of the Second Green Revolution. *Aust. J. Bot.* 55, 493-512. doi:10.1071/BTO6118.
- Lyra, D. H., Virlet, N., Sadeghi-Tehran, P., Hassall, K. L., Wingen, L. U., Orford, S., et al.** (2020). Functional QTL mapping and genomic prediction of canopy height in wheat measured using a robotic field phenotyping platform. *Journal of Experimental Botany* 71, 1885-1898. doi:10.1093/jxb/erz545.
- Mackay, I., Horwell, A., Garner, J., White, J., McKee, J., and Philpott, H.** (2011). Reanalyses of the historical series of UK variety trials to quantify the contributions of genetic and environmental factors to trends and variability in yield over time. *Theor Appl Genet* 122, 225-238. doi:10.1007/s00122-010-1438-y.
- Mangin, B., Siberchicot, A., Nicolas, S., Doligez, A., This, P., and Cierco-Ayrolles, C.** (2012). Novel measures of linkage disequilibrium that correct the bias due to population structure and relatedness. *Heredity* 108, 285-291. doi:10.1038/hdy.2011.73.
- Manschadi, A. M., Christopher, J., deVoil, P., and Hammer, G. L.** (2006). The role of root architectural traits in adaptation of wheat to water-limited environments. *Functional Plant Biol.* 33, 823. doi:10.1071/FP06055.
- Mašková, T., and Herben, T.** (2018). Root:shoot ratio in developing seedlings: How seedlings change their allocation in response to seed mass and ambient nutrient supply. *Ecology and Evolution* 8, 7143-7150. doi:10.1002/ece3.4238.
- Nakamoto, T., and Oyanagi, A.** (1994). The Direction of Growth of Seminal Roots of *Triticum aestivum* L. and Experimental Modification Thereof. *Annals of Botany* 73, 363-367. doi:10.1006/anbo.1994.1045.
- Nakhforoosh, A., Nagel, K. A., Fiorani, F., and Bodner, G.** (2021). Deep soil exploration vs. topsoil exploitation: distinctive rooting strategies between wheat landraces and wild relatives. *Plant Soil* 459, 397-421. doi:10.1007/s11104-020-04794-9.
- O'Brien, L.** (1979). Genetic variability of root growth in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Aust. J. Agric. Res.* 30, 587-595. doi:10.1071/ar9790587.
- Oury, F.-X., Godin, C., Mailliar, A., Chassin, A., Gardet, O., Giraud, A., et al.** (2012). A study of genetic progress due to selection reveals a negative effect of climate change on bread wheat yield in France. *European Journal of Agronomy* 40, 28-38. doi:10.1016/j.eja.2012.02.007.
- Paez-Garcia, A., Motes, C. M., Scheible, W.-R., Chen, R., Blancaflor, E. B., and Monteros, M. J.** (2015). Root Traits and Phenotyping Strategies for Plant Improvement. *Plants* 4, 334-355. doi:10.3390/plants4020334.
- Palta, J. A., Chen, X., Milroy, S. P., Rebetzke, G. J., Dreccer, M. F., Watt, M., et al.** (2011). Large root systems: are they useful in adapting wheat to dry environments? *Functional Plant Biol.* 38, 347-354. doi:10.1071/FP11031.

**Pebesma, E. J.** (2004). Multivariable geostatistics in S: the gstat package. *Computers & Geosciences* 30, 683–691. doi:10.1016/j.cageo.2004.03.012.

**Peltonen-Sainio, P., Jauhiainen, L., and Laurila, I. P.** (2009). Cereal yield trends in northern European conditions: Changes in yield potential and its realisation. *Field Crops Research* 110, 85–90. doi:10.1016/j.fcr.2008.07.007.

**Postic, F., Beauchêne, K., Gouache, D., and Doussan, C.** (2019). Scanner-Based Minirhizotrons Help to Highlight Relations between Deep Roots and Yield in Various Wheat Cultivars under Combined Water and Nitrogen Deficit Conditions. *Agronomy* 9, 297. doi:10.3390/agronomy9060297.

**Reynolds, M., Dreccer, F., and Trethowan, R.** (2007). Drought-adaptive traits derived from wheat wild relatives and landraces. *Journal of Experimental Botany* 58, 177–186. doi:10.1093/jxb/erl250.

**Richard, C. A., Hickey, L. T., Fletcher, S., Jennings, R., Chenu, K., and Christopher, J. T.** (2015). High-throughput phenotyping of seminal root traits in wheat. *Plant Methods* 11, 13. doi:10.1186/s13007-015-0055-9.

**Richards, R. A., and Passioura, J. B.** (1989). A breeding program to reduce the diameter of the major xylem vessel in the seminal roots of wheat and its effect on grain yield in rain-fed environments. *Aust. J. Agric. Res.* 40, 943–950. doi:10.1071/ar9890943.

**Rincent, R., Charpentier, J.-P., Faivre-Rampant, P., Paux, E., Le Gouis, J., Bastien, C., et al.** (2018). Phenomic Selection Is a Low-Cost and High-Throughput Method Based on Indirect Predictions: Proof of Concept on Wheat and Poplar. *G3 Genes|Genomes|Genetics* 8, 3961–3972. doi:10.1534/g3.118.200760.

**Rincent, R., Malosetti, M., Ababaei, B., Touzy, G., Mini, A., Bogard, M., 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. doi:10.1007/s00122-019-03432-y.

**Robert, P., Le Gouis, J., The BreedWheat Consortium, and Rincent, R.** (2020). Combining Crop Growth Modeling With Trait-Assisted Prediction Improved the Prediction of Genotype by Environment Interactions. *Frontiers in Plant Science* 11, 827. doi:10.3389/fpls.2020.00827.

**Robertson, B. M., Waines, J. G., and Gill, B. S.** (1979). Genetic Variability for Seedling Root Numbers in Wild and Domesticated Wheats1. *Crop Science* 19, crops1979.0011183X001900060024x. doi:10.2135/cropsci1979.0011183X001900060024x.

**Rodríguez-Álvarez, M. X., Boer, M. P., van Eeuwijk, F. A., and Eilers, P. H. C.** (2018). Correcting for spatial heterogeneity in plant breeding experiments with P-splines. *Spatial Statistics* 23, 52–71. doi:10.1016/j.spasta.2017.10.003.

**Roselló, M., Royo, C., Sanchez-Garcia, M., and Soriano, J. M.** (2019). Genetic Dissection of the Seminal Root System Architecture in Mediterranean Durum Wheat Landraces by Genome-Wide Association Study. *Agronomy* 9, 364. doi:10.3390/agronomy9070364.

**Sanchez-Garcia, M., Royo, C., Aparicio, N., Martín-Sánchez, J. A., and Álvaro, F.** (2013). Genetic improvement of bread wheat yield and associated traits in Spain during the 20th century. *The Journal of Agricultural Science* 151, 105–118. doi:10.1017/S0021859612000330.

**Sharma, N., Singh, N. K., and Bhadwal, M. S.** (2011). Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 24, 429–438.

**Siddique, K. H. M., Tennant, D., Perry, M. W., and Belford, R. K.** (1990). Water use and water use efficiency of old and modern wheat cultivars in a Mediterranean-type environment. *Aust. J. Agric. Res.* 41, 431–447. doi:10.1071/ar9900431.

**Soriano, J. M., and Alvaro, F.** (2019). Discovering consensus genomic regions in wheat for root-related traits by QTL meta-analysis. *Sci Rep* 9, 10537. doi:10.1038/s41598-019-47038-2.

**Svane, S. F., Jensen, C. S., and Thorup-Kristensen, K.** (2019). Construction of a large-scale semi-field facility to study genotypic differences in deep root growth and resources acquisition. *Plant Methods* 15, 26. doi:10.1186/s13007-019-0409-9.

**Touzy, G., Rincent, 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.

**Trachsel, S., Kaeppler, S. M., Brown, K. M., and Lynch, J. P.** (2011). Shovelomics: high throughput phenotyping of maize (*Zea mays* L.) root architecture in the field. *Plant Soil* 341, 75–87. doi:10.1007/s11104-010-0623-8.

**Tracy, S. R., Nagel, K. A., Postma, J. A., Fassbender, H., Wasson, A., and Watt, M.** (2020). Crop Improvement from Phenotyping Roots: Highlights Reveal Expanding Opportunities. *Trends in Plant Science* 25, 105–118. doi:10.1016/j.tplants.2019.10.015.

**VanRaden, P. M.** (2008). Efficient Methods to Compute Genomic Predictions. *Journal of Dairy Science* 91, 4414–4423. doi:10.3168/jds.2007-0980.

**Waines, J. G., and Ehdaie, B.** (2007). Domestication and Crop Physiology: Roots of Green-Revolution Wheat. *Annals of Botany* 100, 991–998. doi:10.1093/aob/mcm180.

**Waisel, Y., Eshel, A., Beeckman, T., and Kafkafi, U.** (2002). *Plant Roots: The Hidden Half*, Third Edition. CRC Press.

**Watt, M., Moosavi, S., Cunningham, S. C., Kirkegaard, J. A., Rebetzke, G. J., and Richards, R. A.** (2013). A rapid, controlled-environment seedling root screen for wheat correlates well with rooting depths at vegetative, but not reproductive, stages at two field sites. *Annals of Botany* 112, 447–455. doi:10.1093/aob/mct122.

**Wojciechowski, T., Gooding, M. J., Ramsay, L., and Gregory, P. J.** (2009). The effects of dwarfing genes on seedling root growth of wheat. *Journal of Experimental Botany* 60, 2565–2573. doi:10.1093/jxb/erp107.

**Xie, Q., Fernando, K. M. C., Mayes, S., and Sparkes, D. L.** (2017a). Identifying seedling root architectural traits associated with yield and yield components in wheat. *Annals of Botany* 119, 1115–1129. doi:10.1093/aob/mcx001.

**Xie, Q., Fernando, K. M. C., Mayes, S., and Sparkes, D. L.** (2017b). Identifying seedling root architectural traits associated with yield and yield components in wheat. *Annals of Botany* 119, 1115–1129. doi:10.1093/aob/mcx001.

**Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W. H., Vroh Bi, I., Yamasaki, M., Doebley, J. F., et al.** (2006). A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat Genet* 38, 203–208. doi:10.1038/ng1702.

**Zhu, J., Mickelson, S. M., Kaeppler, S. M., and Lynch, J. P.** (2006). Detection of quantitative trait loci for seminal root traits in maize (*Zea mays* L.) seedlings grown under differential phosphorus levels. *Theor Appl Genet* 113, 1–10. doi:10.1007/s00122-006-0260-z.

**Zhu, Y.-H., Weiner, J., Yu, M.-X., and Li, F.-M.** (2019). Evolutionary agroecology: Trends in root architecture during wheat breeding. *Evolutionary Applications* 12, 733–743. doi:10.1111/eva.12749.



# ArchiRac : Analyse de la diversité d'architecture racinaire chez le blé tendre et le blé dur en lien avec la tolérance au stress hydrique

Michel COLOMBO<sup>1,2</sup>, Pierre ROUMET<sup>2</sup>, Christophe SALON<sup>3</sup>, Christian JEUDY<sup>3</sup>, Mickael LAMBOEUF<sup>3</sup>, Stéphane LAFARGE<sup>4</sup>, Anne-Valérie DUMAS<sup>4</sup>, Pierre DUBREUIL<sup>4</sup>, Wa NGO<sup>1</sup>, Brice DEREPAIS<sup>1</sup>, Katia BEAUCHENE<sup>5</sup>, Vincent ALLARD<sup>1</sup>, Jacques LE GOUIS<sup>1</sup>, Renaud RINCENT<sup>1,6\*</sup>

1 - INRAE-Université Clermont-Auvergne, UMR1095, GDEC, 5 chemin de Beaulieu, 63000 Clermont-Ferrand, France

2 - Univ Montpellier, CIRAD, AGAP, INRAE, Inst Agro, Montpellier, France

3 - Univ Bourgogne, Agrocol Lab, Univ Bourgogne Franche Comte, AgroSup Dijon, INRAE, Dijon, France

4 - BIOGEMMA LIMAGRAIN Site Garenne, Route Ennezat, CS 90126, Chappes, France

5 - Arvalis Institut du Végétal, 45 Voie Romaine, F-41240 Ouzouer Le Marche, Beauce la Romaine, France

6 - Université Paris-Saclay, INRAE, CNRS, AgroParisTech, GQE - Le Moulon, 91190 Gif-sur-Yvette, France

\*Coordinateur : Renaud RINCENT, renaud.rincenc@inrae.fr

## Contexte

### Le système racinaire est un élément clé de la tolérance aux stress abiotiques

Le changement climatique a d'ores et déjà un effet majeur sur la culture du blé en France [2]. Dans ce contexte, les caractéristiques de l'architecture racinaire peuvent être déterminantes, puisqu'elles peuvent permettre d'accéder à plus de ressources en eau et en nutriments. Dans le projet ArchiRac, nous nous sommes intéressés à quantifier la diversité du blé tendre et du blé dur pour des caractéristiques de l'architecture racinaire en utilisant la plateforme de rhizotubes de l'INRAE de Dijon (4PMI) et à les comparer avec les performances de ces mêmes variétés en plein champ.

## 715 blés tendres et 200 blés durs

- 265 variétés élités de blé tendre commercialisées en France
- 450 variétés représentatives de la diversité mondiale
- 100 blés durs élités + 100 blés durs du panel de diversité EPO
- Génotypées avec la puce TaBW280K. [3]
- Evaluées dans des réseaux multi-essais avec des conditions contrastées



## Phénotypage des traits racinaires

3 exps sur 4PMI [3] avec 1125 rhizotubes chacune

- Angles racines séminales
- Nb de racines séminales
- Biomasse racinaire et aérienne
- Profondeur d'enracinement
- Surface projetée
- Convex hull



## Analyses phénotypiques

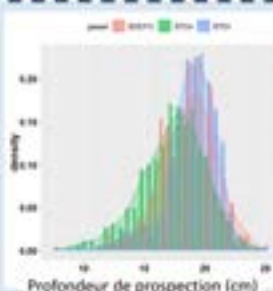
### Héritabilité et variances

	Blé tendre	Blé dur
Biom. Aérienne	0.67	0.76
Biom. Racinaire	0.59	0.64
biom. racinaire/aérien	0.74	0.81
Nb rac. séminales	0.66	0.63
Angle rac. Séminales	0.64	0.52
Profondeur	0.69	0.45
Largeur	0.65	0.62
Convex Hull	0.64	0.44
Prof. centre gravité	0.63	0.5

#### Héritabilités

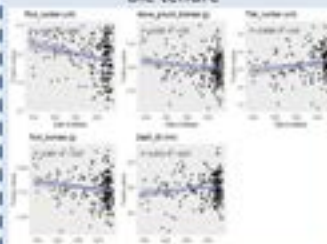
Héritabilités intermédiaires malgré le faible nombre de répétitions.

Fortes variabilités pour les traits racinaires (plus élevées pour les panels de diversité).



### Tendances historiques (selon les années d'inscription)

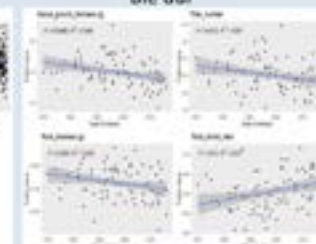
#### Blé tendre



Diminution de la biomasse et du nombre de racines séminales.

Augmentation de la profondeur d'enracinement et du nombre de tiges.

#### Blé dur

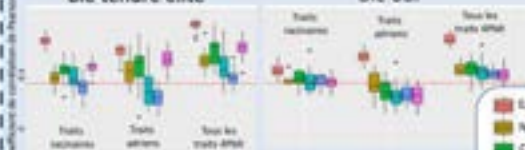


Diminution de la biomasse et du nombre de tiges.

Augmentation du ratio de biomasse racinaire/aérien.

### Relation entre mesures en plateforme et composantes de rendement aux champs

#### Blé tendre élit



Coefficient de régression (R) des traits agronomiques sur les traits mesurés sur la plateforme 4PMI

Le niveau de corrélation est environnement spécifique (interaction GxE).  
Corrélations plus prononcées dans les environnements avec stress hydrique.

## Conclusion & Perspectives

Des liens entre mesures racinaires réalisées en plateforme et les composantes de rendement ont pu être identifiés à l'échelle du caractère et à l'échelle de l'allèle. Ces relations sont environnement spécifiques et peuvent être mises en regard d'indicateurs de stress. La sélection récente a eu un effet significatif sur certains caractères aériens et racinaires. Ces travaux ouvrent la voie vers la définition d'idéotypes racinaires pour une adaptation locale.

# Genomalt : Prédiction génomique du rendement et de la qualité brassicole chez l'orge d'hiver à 6 rangs

Gilles CHARMET<sup>1</sup>, Pierre PIN<sup>2</sup>, Marc SCHMITT<sup>3</sup>, Nathalie LEROY<sup>4</sup>, Bruno CLAUSTRES<sup>4</sup>, Christopher BURT<sup>4</sup>, Amélie GENTY<sup>2</sup>

1 - INRAE- UCA UMR GDEC, 5 chemin de Beaulieu 63000 Clermont-Ferrand - France

2 - SECOBRA Recherches SAS, Centre de Bois Henry, 78580 Maule - France

3 - IFBM, 7 rue du Bois de la Champelle, F-54500 Vandœuvre les Nancy -France

4 - RAGT 2N, Place du bourg, 12510 Druelle - France

## 1 Introduction

L'orge (*Hordeum vulgare* L.) est une des deux espèces à l'origine de l'agriculture dans l'ancien monde. C'est probablement la première espèce qui fut domestiquée au moyen Orient, il y a 10 000 à 12 000 ans, à partir de l'espèce sauvage *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* comme le suggèrent les grains fossiles retrouvés dans plusieurs sites archéologiques du croissant fertile (Zohary and Hopf, 1993). Badr *et al.* (2000) ont montré l'origine monophylétique de cette domestication, et émis l'hypothèse de la zone Israel-Jordanie comme berceau de sa culture, avec la région de l'Himalaya comme centre diversification secondaire.

L'ancêtre sauvage (*H. vulgare* ssp. *spontaneum*) possède un épi de type 2 rangs, avec les fleurs latérales demeurant vestigiales. Il est possible que les fermiers du néolithique aient sélectionné des mutants à 6 rangs, qui donnaient ainsi davantage de grains et par là un meilleur rendement. Le gène responsable du type 6, *vrs1* (*six-rowed spike 1*), a été isolé par clonage positionnel (Komatsuda *et al.*, 2007). L'allèle sauvage *Vrs1* (type 2 rangs) code pour un facteur de transcription qui inclus un homéo domaine associé à un motif de type leucine zipper. La perte de fonction de *Vrs1* provoque la conversion des épillets latéraux rudimentaires chez les 2 rangs en épillets normaux et fertiles chez les 6 rangs. Les analyses phylogénétiques ont montré que le phénotype à 6 rangs est ainsi apparu de façon répétée dans le temps et dans différentes régions, par des mutations indépendantes de *Vrs1*.

Les orges à 6 rangs, (légèrement) plus productives, sont généralement préférées comme céréales fourragères, tandis que les orges à deux rangs sont privilégiées pour la production de malt et de bière. En effet, les orges à deux rangs ont des caractéristiques plus favorables pour la production de bière, notamment sa première étape qui est celle du malt. Le malt est en fait de l'orge germée, puis séchée à des températures plus ou moins élevées. La qualité du malt dépend de la taille des grains et de leur homogénéité, de sa friabilité et de son pouvoir diastasique, c'est à dire sa capacité à transformer l'amidon du grain en sucres fermentescibles, base de la fermentation alcoolique. Les orges brassicoles doivent avoir une teneur limitée en protéines, qui peut être responsable d'une bière trouble. Les orges à deux rangs, qui ont des grains plus gros et de tailles plus homogènes, sont donc préférées par les malteurs, par exemple en Allemagne et au Royaume-Uni. La France,

premier producteur européen pour l'orge et premier exportateur Mondial de malt (1.2 Mt par an, 80 % de la production), utilise également des orges à 6 rangs, plus productives, généralement semées après un blé. C'est pourquoi les sélectionneurs français ont développé des programmes dédiés à l'amélioration variétale de l'orge à 6 rang brassicole. La plupart des schémas utilisent des haploïdes doubles pour accélérer les cycles de sélection.

L'évaluation de la valeur maltière s'effectue par un test de micro-maltage (ex. Haslemore *et al.*, 1982), qui demande du temps (> 4 jours) et une quantité de grains importante. Ce test n'est donc appliqué qu'à un nombre limité de lignées en fin de sélection, déjà triées pour des caractères agronomiques comme le rendement et les résistances aux maladies, juste avant les tests officiels pour l'inscription au catalogue. La pression de sélection pour la valeur maltière est donc assez faible et appliquée à des effectifs, ce qui se traduit par un progrès génétique assez lent.

Le terme sélection génomique (SG) a été proposé par Meuwissen *et al.* (2001), qui ont appliqué des méthodes de régression pénalisée ou bayésiennes à des populations animales, notamment aux taureaux de races laitières, pour estimer leur valeur génétique en descendance (breeding value). En SG, dans une première étape, les effets des marqueurs (couvrant tout le génome, c'est-à-dire non sélectionnés au préalable comme associés à des QTL) sont estimés à partir de données de génotypage et de phénotypage d'une population d'entraînement ou population de référence. Des méthodes adaptées au problème du sur-paramétrage doivent être utilisées, dans le cas général où le nombre de marqueurs excède celui des individus génotypés. Puis ces effets à tous les marqueurs sont employés pour reconstruire la valeur génétique des individus d'une population pour lesquels on dispose seulement du génotypage. Ces valeurs sont appelées GEBV (Genomic Estimates of Breeding Values). La SG a été appliquée avec succès aux vaches laitières (Goddard and Hayes, 2007). En effet, dans les troupeaux laitiers, grâce à l'insémination artificielle, la sélection est beaucoup plus intense sur les taureaux. Mais ces derniers ne produisant pas de lait, l'estimation de leur valeur laitière se fait sur leur descendance femelle, ce qui est coûteux en temps (au moins 8 ans) et en argent. L'avantage de la prédiction génomique des valeurs laitières par SG, qui peut être estimée dès la naissance des veaux pour quelques dizaines d'euros, permet donc une sélection plus intense et une mise en production (de sperme) plus précoce (3 ans). La SG



a permis de doubler le gain génétique par unité de temps, pour un coût réduit de 92 % (Shaeffer, 2006). Même si l'avantage de la SG est moins évident chez les plantes, il peut néanmoins s'avérer positif à condition que 1) le coût du génotypage soit significativement plus faible que celui du phénotypage (qui demande souvent de nombreuses répétitions dans des environnements différents pour être précis et 2) que la précision des prédictions génomiques soit comparable à celle des phénotypes, c'est-à-dire l'héritabilité des caractères (Bernardo & Yu, 2007; Crossa *et al.*, 2010; Heffner *et al.*, 2009; Jannink *et al.*, 2010; De los Campos *et al.*, 2013).

La condition 1 s'applique assez bien aux traits de qualité des céréales comme la qualité boulangère du blé ou la valeur brassicole de l'orge, dont le phénotypage est relativement cher et réalisé sur des générations tardives. Dans ce projet, nous avons analysé des caractères agronomiques et de qualité brassicole dans un ensemble de variétés inscrites et de lignées de sélection d'orge d'hiver à 6 rangs, et conduit une étude de faisabilité d'une sélection génomique intégrée dans des schémas d'amélioration variétale.

## 2 Matériel et méthode

### ► Matériel végétal

Deux sélectionneurs français, RAGT 2N et SECOBRA Recherche, anonymisés plus loin en breeder1 et breeder2, ont fourni chacun un set de lignées haploïdes doublées (HD) « propriétaires », qui avaient été préalablement triés pour des caractères adaptatifs comme la hauteur, résistance à la verse et aux maladies, date de floraison. Chaque set de lignées propriétaire a été évalué par son sélectionneur en 2 ou 3 lieux pendant deux campagnes, 2017/2018 et 2018/2019. Pour assurer une connectivité dans les données expérimentales, chaque sélectionneur a également évalué un set commun de variétés inscrites récemment au catalogue, plus loin appelées « fondateurs » (car fréquemment utilisées comme parents de croisement par les sélectionneurs).

### ► Données de génotypage

La « barley 50K iSelect SNP Array » (Bayer *et al.*, 2017) a été utilisée pour le génotypage pan-génomique des 679 lignées et cultivars. Des 44,040 SNP initialement présents sur la puce, 24 945 ont été retenus après filtrage sur les données manquantes (< 20 % par SNP), l'hétérozygotie des SNP (< 5 %) et la fréquence de l'allèle minoritaire (> 1 %), parmi lesquels 24,101 étaient cartographiés sur la « barley physical map V2 » et utilisés dans la suite des analyses. Les données manquantes ont été imputées avec l'algorithme EM (expectation-maximization) (Poland *et al.*, 2012) implémenté dans la fonction A.mat du package rrBLUP (Endelman, 2011).

Une matrice des relations additives génomique,  $K$ , a été calculée avec les 24 101 marqueurs selon van Raden (2008) avec la fonction A.mat :

$$K = WW^T / (2\sum(p_k - 1)p_k)$$

Où  $W$  est une matrice centrée  $N \times M$  dont la ligne  $i$   $W_{ik} = X_{ik} - 1 - 2p_k$  avec  $X_{ik}$  le génotype du  $i$ -ième individu pour le  $k$ -ième marqueur codé  $\{-1, 0, 1\}$  et  $p_k$  la fréquence de l'allèle majoritaire au  $k$ -ième marqueur.

Une analyse en coordonnée principale (PCoA, commande "cmdscale" en R) a été appliquée à une matrice des distances de Rogers (Rogers 1972) calculée par la commande "dist" en R, pour illustrer les relations génétiques entre les lignées d'orge.

### ► Données phénotypiques

Breeder1 a fourni 259 lignées HD propriétaires et Breeder2, 315 HD. 105 « fondateurs », cad des variétés inscrites disponibles pour expérimentation selon le règlement UPOV ont été évaluées par chaque sélectionneur pour corriger les effets principaux lieux.

Breeder1 a évalué ses HD et 104 variétés dans 3 lieux en France, Thoiry, Auffay, Warmeriville, durant les 2 campagnes récolte 2018 (1872 parcelles) and 2019 (1327 parcelles). Dans chaque lieu était implanté un essai en 6 blocks incomplets, la majorité des lignées sans répétitions, avec quelques témoins répétés 15 à 20 fois (cv Etincel, Pixel and Visuel), et jusqu'à 50-60 fois (cv KWS-Tonic) en 2018. En 2019, un dispositif plus simple a été implanté avec seulement 3 blocs et un seul témoin (cv Pixel) répété 42 à 50 fois. Comme ces témoins étaient distribués au hasard dans la parcelle expérimentale, des modèles spatiaux ont été utilisés pour tenter de corriger les effets de l'hétérogénéité dans la parcelle. Les essais ont été conduits selon les pratiques agricoles locales, incluant un traitement fongicide.

Breeder2 a évalué ses 315 lignées HD et 91 des 105 variétés dans deux lieux, Cuperly et Premesques, durant les mêmes années 2018 (904 parcelles) and 2019. Dans chaque lieu était implanté un essai en 19 blocs incomplets avec les HD non répétés et des témoins répétés 10 fois (cv Amistar) ou 15-20 fois (cv Casino and Etincel) en 2018. Comme pour Breeder 1, des modèles spatiaux ont été employés pour corriger des hétérogénéités du champ.

Le jeu de variables commun disponible sur toutes les parcelles comprenait le rendement Yield (dt/ha), la teneur en protéines (%), le poids de 1000 grains (g), poids spécifique (Kg/hl), Calibration (% grains > 2.5 mm) et date d'épiaison (jour julien après le 1 janvier), ci-après dénommés variables agronomiques.

En outre, les traits suivants associés à la valeur maltière ont été mesurés par tests de micro-maltage sur un plus petit nombre de lieux (Cuperly et Warmeriville en 2018, Premesques and Warmeriville en 2019). Comme une seule répétition a été mesurée, y compris pour les témoins, aucune correction spatiale n'était possible pour ces 4 variables : friabilité du malt, extrait, viscosité et teneur en beta-glucanes.

La friabilité du malt a été estimée par la méthode (European Brewery Convention) 4.15

L'Extrait du malt a été déterminé par la méthode EBC 4.5.e1. Il définit le potentiel du malt à produire du moût soluble par un procédé standard de brassage.

La viscosité du moût est un paramètre important de la qualité du malt. Plus elle est faible, meilleure est la modification des grains durant la germination. La viscosité du moût est mesurée à 20°C à l'aide d'un viscosimètre calibré selon la EBC 8.4.

La viscosité du moût est liée à la teneur en beta-glucanes solubles. Un bon malt contient une quantité limitée de



ces polysaccharides pariétaux. Ils sont déterminés par la méthode EBC 4.16.2 (High molecular weight  $\beta$ -glucan content of malt and malt wort: fluorimetric method).

Les tests de micro maltage et les mesures des traits de valeur maltière ont été réalisés par l'IFBM.

### ► Analyse des données phénotypiques

Sur chaque essai les témoins répétés au hasard ont été utilisés pour une correction spatiale à l'aide du package SpATS de R (Rodriguez-Alvarez *et al.*, 2018). Puis les données spatialement ajustées ont été exploitées par un modèle mixte linéaire (LMM) avec la librairie lme4 en R, avec les génotypes et leurs interactions comme facteurs aléatoires. Pour les traits de qualité du malt pour lesquels la correction spatiale n'était pas possible, les données brutes ont été utilisées.

L'utilisation du modèle mixte est justifiée car il est connu que dans les dispositifs très déséquilibrés comme ceux de ce projet, les prédictions des effets aléatoires sont mieux corrigées des effets fixes que les moyennes ajustées dans les modèles à effets fixes.

$$y_{ijk} = \mu + y_j + y:S_{jk} + g_i + g y_{ij} + gS_{ik} + \varepsilon_{ijk} \quad (1)$$

avec  $y_{ijk}$  la variable phénotypique spatialement ajustée ou non du  $i$ -ème génotype la  $j$ -ième année dans le  $k$ -ème site,  $\mu$  la moyenne générale,  $g_i$  l'effet  $i$ -ème génotype,  $y_j$  celui de la  $j$ -ième année,  $y:S_{jk}$  est l'effet du  $k$ -ième lieu hiérarchisé à la  $j$ -ième année,  $g y_{ij}$  est l'interaction entre le  $i$ -ème génotype et la  $j$ -ième année,  $gS_{ik}$  l'interaction entre le  $i$ -ème génotype et le  $k$ -ième lieu et  $\varepsilon_{ijk}$  l'erreur résiduelle, qui contient donc l'interaction triple qui n'est pas estimable faute de répétitions.  $g_i$  et ses interactions ont été considérés comme des effets aléatoires en LMM.

L'équation (1) a été utilisée (commande VarComp dans la librairie R lme4) pour estimer les composantes de la variance  $\sigma_g^2$ ,  $\sigma_{gy}^2$ ,  $\sigma_{gs}^2$  and  $\sigma_e^2$ , et leurs intervalles de confiance (commande confint en R), qui permettent de calculer une héritabilité au sens large comme

$$h^2 = \sigma_g^2 / (\sigma_g^2 + \sigma_{gy}^2 / ny + \sigma_{gs}^2 / ns + \sigma_e^2 / nrep)$$

Avec  $ny$ ,  $ns$  and  $nrep$  les nombres moyens d'années, de sites et de répétitions par génotype, respectivement. Les héritabilités pour chaque trait ont été calculées sur l'ensemble du dispositif, ou séparément avec les essais de chaque sélectionneur.

Les moyennes conditionnelles (cad. Corrigées des effets principaux environnement) de chaque génotype ont été extraites du LMM (commande ranef du package lme4 R) et utilisées pour la suite des analyses, en commençant pas la distribution des caractères et leurs corrélations 2 à 2.

Comme les variances génotypiques étaient en général plus grandes que les variances de leurs interactions, ces moyennes ajustées ont été utilisées par la suite pour tester la valeur prédictive des modèles de sélection génomique.

### ► Modèles de prédiction génomique

Le package R BWGS R (Charmet *et al.*, 2020) a été utilisé pour estimer la valeur prédictive de 4 modèles de sélection génomique : GBLUP, Bayes Cpi (Habier *et al.*, 2011), LASSO (Park & Casella, 2008), et EGBLUP. GBLUP est basé sur un contrôle génétique dit infinitésimal, où tous les marqueurs ont un effet tiré d'une distribution

gaussienne, tandis de Bayes Cpi suppose une proportion  $\pi_i$  de marqueurs ayant des effets nuls, et les autres des effets tirés d'une distribution de Student. LASSO suppose également une distribution des effets davantage centrée sur 0 que la loi Normale. EGBLUP est une extension de GBLUP avec un terme utilisant le carré de la matrice des relations additives pour modéliser les interactions entre paires de marqueurs (Jiang and Reif, 2015).

### ► Validation des modèles

Plusieurs stratégies ont été utilisées pour comparer la valeur prédictive des modèles :

#### 1. Validation croisée avec 10 volets tirés au hasard dans :

- a. L'ensemble des lignées Breeder1 + Breeder2 + fondateurs (N = 679)
- b. Les lignées du Breeder1 + fondateurs (N = 364)
- c. Les lignées du Breeder2 + fondateurs (N = 420)
- d. Les variétés inscrites (fondateurs) seulement (N = 105)

Chaque validation croisée (9/10-1/10) a été répétée 50 fois.

Les stratégies b et c donne une estimation de ce que chaque sélectionneur peut attendre en utilisant son propre matériel et les lignées inscrites, tandis que la stratégie a mesure l'avantage que pourraient avoir deux sélectionneurs à réunir leurs jeux de données pour construire des modèles de prédiction génomique. Enfin la stratégie d permet d'estimer la valeur prédictive d'une population d'entraînement de taille très réduite, ce que pourrait espérer par exemple un sélectionneur débutant n'ayant pas encore de matériel propre.

Pour mesurer si les valeurs prédictives des stratégies b-c comparées à a sont dues simplement à la taille de la population, on a appliqué la stratégie a) à des sous ensemble aléatoires de taille N dans {50, 100, 200, 300, 400, 500}, parmi les 679 lignées, avec 50 répétitions de chaque tirage. Nous illustrerons seulement avec les résultats pour le rendement et la friabilité du malt, les caractères qui présentent les extrêmes pour la valeur prédictive des modèles.

#### 2. Une validation inter-sélectionneurs, en utilisant :

- a. Breeder1 + variétés comme set d'entraînement et les lignées de Breeder 2 comme set de validation.
- b. Breeder2 + variétés comme set d'entraînement et les lignées de Breeder 1 comme set de validation.
- c. Les lignées de Breeder1 + Breeder2 lines pour l'entraînement et les variétés comme jeu de validation.

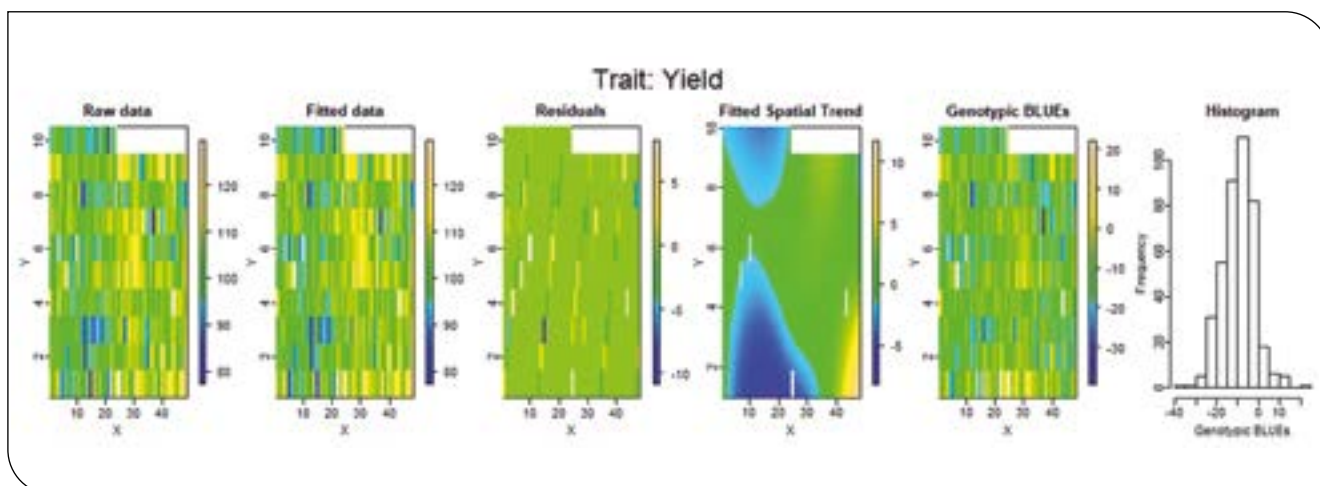
La valeur prédictive était calculée comme la corrélation entre les GEBV et les moyennes ajustées du LMM. Pour obtenir des intervalles de confiance de ces valeurs, nous avons utilisé une méthode de rééchantillonnage (bootstrap) comme décrite par Rutkoski *et al.* (2012).

## 3 Résultats

### ► Statistiques de base

L'ajustement spatial s'est révélé efficace pour réduire l'erreur résiduelle.





Le tableau 1 présente les composantes de la variance des effets aléatoires du modèle (1) appliqué aux données compète, et l'héritabilité des moyennes par génotype.

TRAIT	$\sigma^2_g$	$\sigma^2_{gS}$	$\sigma^2_{gY}$	$\sigma^2_e$	$h^2$
Yield	7.3 [5.08-9.20]	2.66 [0.93-2.25]	2.99 [0.85-2.15]	34.4 [31.8 -37.2]	<b>0.551</b>
Protein	0.067 [0.055-0.085]	0.015 [0-0.027]	0.010 [0-0.033]	0.305 [0.28-0.33]	<b>0.613</b>
TGW	7.22 [6.22-8.36]	0.52 [0.02-1.04]	0.68 [0.21-1.20]	8.59 [7.93-8.32]	<b>0.837</b>
TestW	1.90 [1.50-2.37]	0.21 [0.049-0.40]	0.20 [0.041-0.43]	1.94 [1.71-2.20]	<b>0.775</b>
Calibration	59.3 [51.2-68.4]	14.7 [10.9-18.7]	3.0 [0.13-6.23]	51.8 [47.8-56.4]	<b>0.853</b>
Heading	1.46 [1.18-2.28]	0.15 [0-0.54]	0.58 [0-0.68]	4.41 [3.99-5.11]	<b>0.652</b>
Friability	58.4 [51.2-66.6]	8.60 [6.47-11.98]	9.70 [7.56-18.2]	13.7 [10.16-19.22]	<b>0.895</b>
Extract	1.00 [0.43-1.02]	0.06 [0-0.36]	0.24 [0-0.88]	1.34 [0.94-2.12]	<b>0.753</b>
Viscosity	0.71 [0.60-0.80]	0.28 [0.16-0.31]	0.10 [0.06-0.18]	0.36 [0.207-0.55]	<b>0.769</b>
$\beta$ -Glucan	163 [141.3-187.8]	18.6 [141-18.7]	15.7 [0-52.6]	80.6 [59.7-110.1]	<b>0.851</b>

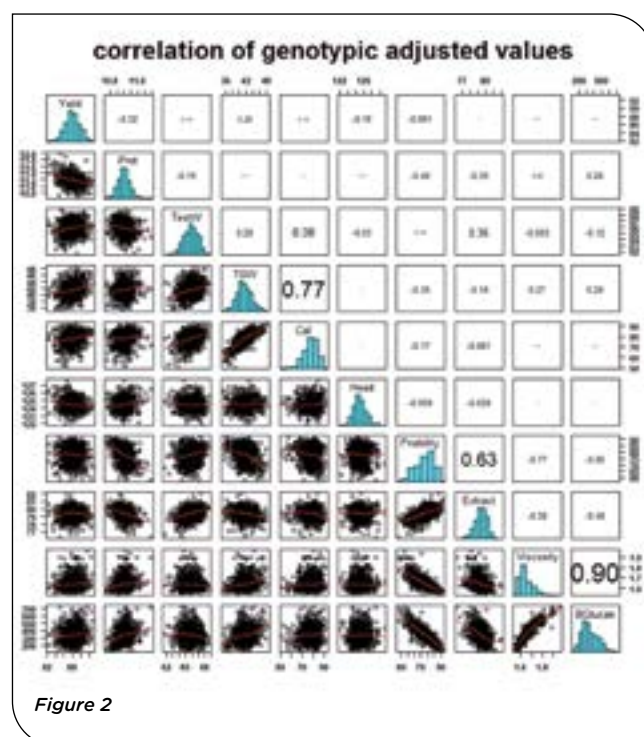
**Tableau 1 :** Composantes de la variance et leur intervalle de confiance pour les 10 caractères.

La variance génotypique  $\sigma^2_g$  apparaît plus grande que les deux composantes d'interaction  $\sigma^2_{gS}$  and  $\sigma^2_{gY}$ , conduisant à des héritabilités des moyennes génotypique variant 0.5 (rendement) à 0.9 (friabilité). Les héritabilités des caractères liés au malt sont toutes supérieures à 0.75, malgré un dispositif expérimental plus réduit que celui utilisé pour les caractères agronomiques.

### ► Corrélations et analyse en composantes principales

La figure 2 présente les distributions et corrélations 2 à 2 entre les moyennes ajustées des 10 caractères. Au sein des caractères agronomiques, la plus forte corrélation (0.77) est trouvée entre le PMG et la calibration, ce qui semble trivial. La teneur en protéines est corrélée négativement au rendement (-0.32), mais moins fortement que les valeurs rapportées pour le blé tendre (Oury *et al.*, 2003). De plus, pour l'orge brassicole, on ne cherche pas à augmenter

systématiquement la teneur en protéines comme pour les blés panifiables, puisqu'un excès de protéines peut causer des problèmes lors de la filtration, comme illustré par la corrélation négative entre la teneur en protéines et le taux d'extraction (-0.35). Ainsi, c'est plutôt une stabilisation du taux de protéines qui est recherché, afin d'assurer une croissance optimale des levures, plutôt qu'un enrichissement continu.



**Figure 2**

Au sein des caractères de valeur maltière, la plus forte corrélation est trouvée entre la viscosité et la teneur en  $\beta$ -Glucanes, et une autre entre la friabilité et le taux d'extract (0.64). Ces deux corrélations étaient attendues pour des raisons causales. La viscosité et la teneur en  $\beta$ -Glucanes sont négativement corrélées avec l'extract, ce qui est favorable puisqu'on cherche à améliorer le taux d'extract et à réduire la viscosité. Les caractères liés au malt sont faiblement corrélés aux caractères agronomiques, la plus forte en valeur absolue étant entre l'extract et le taux de protéines (-0.42). Ces valeurs suggèrent que l'amélioration des caractères

agronomiques et de la valeur brassicole peut être obtenue de façon indépendante, et que les sélectionneurs d'orge ont la chance d'avoir entre leurs caractères cibles des corrélations majoritairement favorables.

Ces corrélations peuvent être illustrées par une analyse en composante principale. Le plan des axes 1-2 (Figure 3) montre clairement les deux groupes de variables de valeur du malt fortement corrélées entre elles et opposées sur l'axe 1, tandis que les caractères agronomiques sont principalement associés à l'axe 2, donc indépendants des traits brassicoles, en particulier les poids de 1000 grains et le calibrage, la teneur en protéines étant mal représentée dans ce plan, donc elle aussi indépendante des autres variables. La précocité d'épiaison, elle aussi mal représentée, n'est pas non plus corrélée aux caractères du malt.

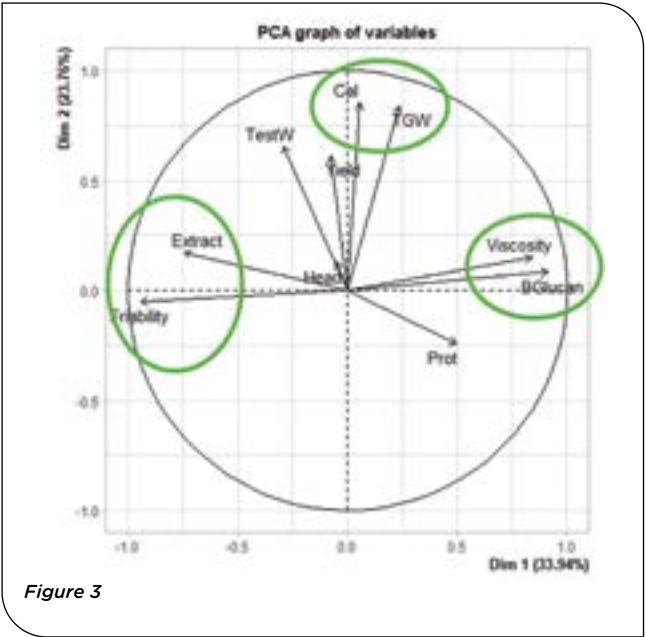


Figure 3

### ► Données moléculaires

La distribution des 24 101 marqueurs retenus après contrôle qualité est relativement homogène entre chromosomes, variant de 2 505 sur le chromosome 4H à 4 604 sur le chromosome 3H. La projection des 679 lignées et cultivars sur les axes 1 et 2 de l'analyse en coordonnées principales de la matrice de distance de Roger est présentée Figure 4.

Les nuages des lignées des deux sélectionneurs présentent à la fois une zone de recouvrement et une zone « privative ». Les cultivars sont davantage dispersés sur l'ensemble du plan, avec une plus forte densité dans la zone médiane qui correspond à la zone de superposition des deux breeders. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation par les deux sélectionneurs de variétés inscrites comme parent de croisement, mais aussi par l'existence d'un germplasma propre à chacun, qui explique un début de divergence entre les deux sets de lignées avancées de sélection. Toutefois, le chevauchement des deux sélectionneurs semble assez large pour anticiper la possibilité d'une prédiction croisée, en utilisant le matériel d'un sélectionneur pour construire le modèle et celui de l'autre pour valider les prédictions. L'indice de différenciation *Fst* calculé

entre les deux populations, 0.03, est en effet largement inférieur à celui rapporté pour des programmes de sélection de blé tendre entre différents états des USA, 0.09 à 0.15 (Sneller *et al* 2021).

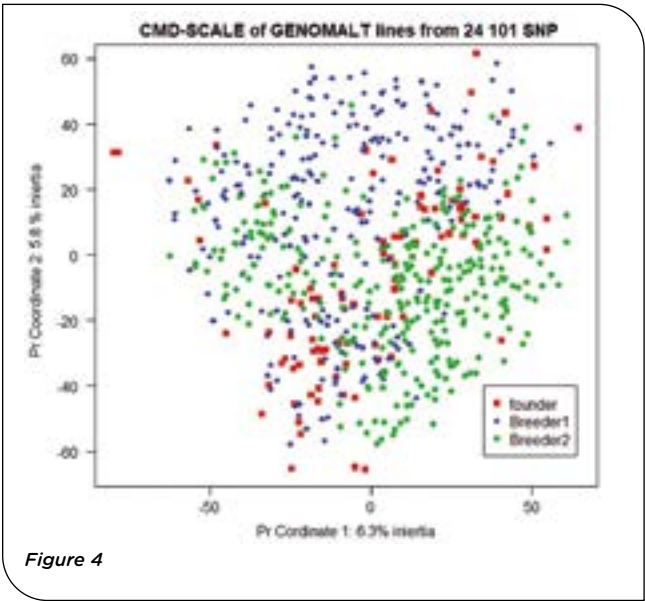


Figure 4

### ► Prédictions génomiques

Les résultats de valeurs prédictives obtenues par validation croisée sur les différents jeux de lignées sont présentés dans le tableau 2.

TRAIT	randomCV	BRE1 +FO.CV	BRE2 +FO.CV	FounderCV
Yield	0.446 / 0.022	0.451 / 0.028	0.395 / 0.025	0.489 / 0.056
Prot	0.517 / 0.016	0.659 / 0.020	0.282 / 0.036	0.387 / 0.095
TGW	0.667 / 0.012	0.798 / 0.010	0.518 / 0.021	0.560 / 0.080
TestW	0.662 / 0.012	0.717 / 0.016	0.612 / 0.017	0.672 / 0.080
Cal	0.693 / 0.013	0.685 / 0.020	0.598 / 0.020	0.310 / 0.064
Head	0.522 / 0.022	0.533 / 0.028	0.371 / 0.034	0.097 / 0.110
Friability	0.805 / 0.009	0.824 / 0.009	0.775 / 0.008	0.749 / 0.030
Extract	0.654 / 0.009	0.778 / 0.014	0.635 / 0.014	0.802 / 0.030
Viscosity	0.690 / 0.011	0.729 / 0.016	0.662 / 0.012	0.694 / 0.036
β-Glucan	0.753 / 0.009	0.789 / 0.011	0.733 / 0.016	0.729 / 0.042

Tableau 2

La validation croisée au hasard utilisant l'ensemble des lignées (N = 679) donne des valeurs prédictives moyennes pour le rendement et la teneur en protéines (0.45-0.50), et bonnes à très bonnes pour les caractères de qualité liés au malt, toujours supérieures 0.65, et jusqu'à 0.80 pour la friabilité. Notons que la prise en compte d'un QTL majeur détecté par GWAS ( $r^2 = 0.25$ , résultat non montré) comme effet fixe n'améliore que très marginalement la valeur prédictive du modèle (de 0.806 à 0.814). Ces résultats sont très encourageants quant à la possibilité de trier précocement et à moindre coût un plus grand nombre de lignées candidates pour la valeur maltière, assurant ainsi un progrès génétique plus rapide pour ces caractères.

Les colonnes 2 et 3 montrent les valeurs prédictives que pourraient obtenir chaque sélectionneur en utilisant ses lignées propriétaires + les variétés inscrites, sans avoir



à partager ses données avec un autre sélectionneur. Comparé au dispositif complet de la colonne 1, la taille de la population d'entraînement serait donc plus petite (N = 359 et N = 410, respectivement), ce qui devrait conduire à de plus faibles valeurs prédictives, mais le phénotypage est issu d'un dispositif plus équilibré, ce qui devrait donner une meilleure répétabilité des données. Ces deux effets s'équilibrent sans doute l'un par l'autre, car les valeurs prédictives obtenues par chaque sélectionneur sont très proches de celles obtenues avec les données complètes. La colonne 4 présente les valeurs prédictives en validation croisée obtenues avec les seules variétés évaluées par les deux sélectionneurs (N = 95). Bien que ces valeurs soient plus variables que celles obtenues avec les données complètes (écart-type 2-4 fois plus grands), elles sont presque aussi élevées, en particulier pour les caractères du malt, ce qui est assez inattendu.

Pour déterminer si la valeur prédictive des sous-ensembles de lignées était déterminée par la taille de l'échantillon, nous avons procédé à des tirages au hasard parmi la population totale. La figure 5 présente les valeurs prédictives pour le rendement et la friabilité obtenu avec des populations d'entraînement tirées au hasard vs les populations de chaque sélectionneur ou les variétés inscrites.

Comme attendu par la théorie, la valeur prédictive des échantillons aléatoires décroît avec sa taille, tandis que la variabilité des prédictions augmente. En utilisant les lignées d'un seul sélectionneur et/ou les variétés, les résultats sont contrastés : pour les deux caractères, les

prédictions obtenues avec les lignées de Breeder 2 + variétés est proche de celle obtenues avec l'échantillon aléatoire de même taille, tandis que la valeur prédictive de Breeder 1 + variétés et des variétés seules se situent bien au-dessus des valeurs obtenues avec les échantillons aléatoires. La valeur prédictive des variétés inscrites, malgré la faible taille de la population (N=95), est particulièrement élevée pour le rendement, elle est même supérieure à celle obtenue par validation croisée en utilisant la population totale (N=679).

Ces différences de valeur prédictive entre populations d'entraînement de même taille peuvent difficilement être attribuées à des différences d'appareillement moyens entre les populations d'entraînement et de validation. En effet, les coefficients de parentés estimés (par normalisation de la matrice K issue de A.mat) au sein de chaque sous-population ne sont pas très différents en moyenne (0.195, 0.200 and 0.201 pour breeder 2, breeder 1 et variétés, respectivement). Il n'y a pas de structure nette entre les groupes de lignées et aucun qui corresponde aux germplasms de chaque sélectionneur.

Et en effet, les héritabilités au sens large estimées à partir des 95 variétés évaluées par les deux sélectionneurs sont aussi élevées, voire supérieures (rendement) à celles estimées sur l'ensemble des lignées. De plus, les héritabilités estimées dans le matériel de Breeder2 sont toujours inférieures à celles estimées dans les lignées de Breeder 1, ce qui est cohérent avec les valeurs prédictives présentées au-dessus.

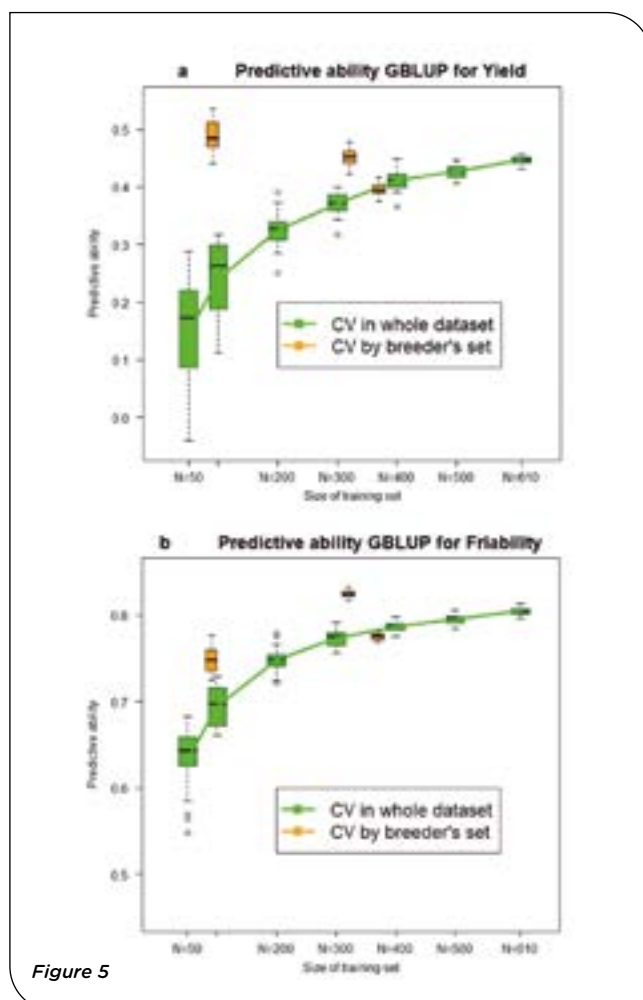
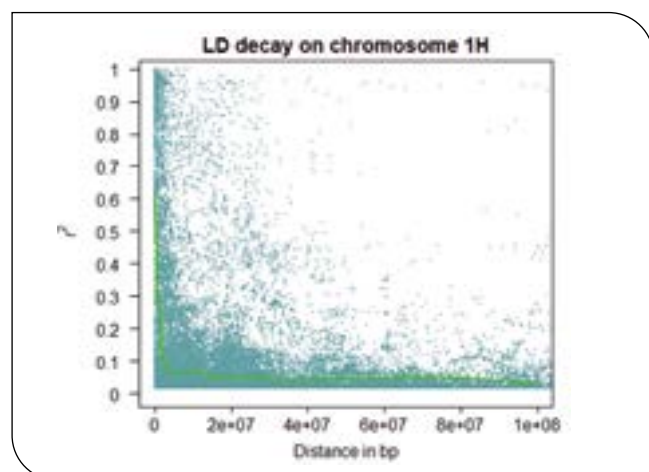


Figure 5



TRAIT / h <sup>2</sup>	All	Breeder1	Breeder2	Founders
Yield	0.551	0.479	0.459	0.600
Protein	0.613	0.493	0.575	0.670
TGW	0.837	0.834	0.680	0.840
TestW	0.775	0.727	0.695	0.810
Calibration	0.853	0.786	0.768	0.806
Heading	0.652	0.575	0.580	0.450
Friability	0.895	0.850	0.840	0.879
Extract	0.753	0.706	0.680	0.777
Viscosity	0.769	0.748	0.624	0.759
β-Glucan	0.851	0.708	0.638	0.779

La figure 4 présente l'effet du nombre de marqueurs choisis au hasard sur la valeur prédictive du GBLUP pour les deux traits extrêmes : rendement et friabilité. Comme attendu, la valeur prédictive moyenne augmente et son écart-type diminue avec le nombre de marqueurs, jusqu'à un plateau obtenu avec seulement 2000 marqueurs. L'explication la plus vraisemblable est que l'étendue du déséquilibre de liaison est assez grande entre chacun des 2000 marqueurs et ses voisins pour être capable de capturer l'information de tous les QTL localisés dans l'intervalle. Pour tester cette hypothèse, la figure 5 présente la décroissance du DL avec la distance physique pour le chromosome 1H.



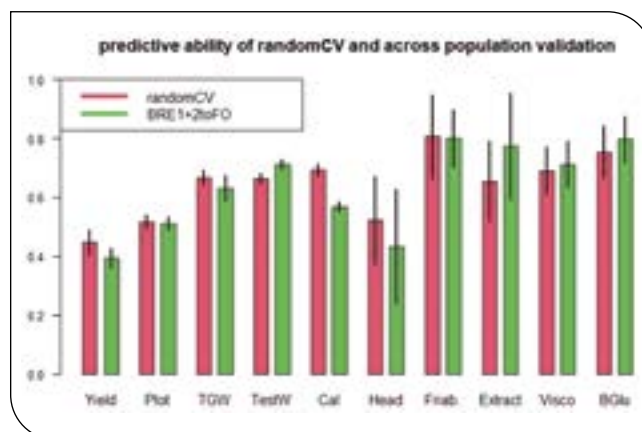
Bien que le DL semble décroître très rapidement à l'échelle du chromosome entier (courbe verte), il reste supérieur à 0.4 sur une distance d'environ 2 Mb. Compte tenu de la taille du génome de l'orge 4,250 Mb, environ 2,100 markers (4,200/2) régulièrement espacés devraient être suffisant pour assurer une couverture du génome avec un DL minimum de 0.3. Cette valeur correspond à celle déterminée empiriquement pour la valeur prédictive qui plafonne avec  $M = 2000$  marqueurs.

Le tableau 3 présente les valeurs prédictives du GBLUP obtenues entre populations, c'est-à-dire en utilisant un sous-ensemble prédéfini de lignées pour l'entraînement et un autre pour la validation. La taille des jeux d'entraînement est en gros décroissante de gauche à droite. Comme attendu les valeurs prédictives décroissent avec la taille du jeu d'entraînement, plus rapidement que les valeurs obtenues par validation croisée, particulièrement pour le rendement et la teneur en protéines. Toutefois elle demeure dans une gamme permettant une utilisation pratique pour les traits de valeur en malterie.

TRAIT	BRE1+2 to FO	BRE1 to FO	BRE2 to FO
Yield	0.394 / 0.075	0.254 / 0.101	0.248 / 0.107
Prot	0.509 / 0.097	0.575 / 0.086	0.250 / 0.095
TGW	0.630 / 0.071	0.595 / 0.064	0.547 / 0.096
TestW	0.710 / 0.049	0.562 / 0.083	0.556 / 0.066
Cal	0.568 / 0.068	0.529 / 0.071	0.472 / 0.101
Head	0.432 / 0.090	0.408 / 0.095	0.332 / 0.111
Friability	0.799 / 0.040	0.718 / 0.052	0.677 / 0.050
Extract	0.773 / 0.039	0.653 / 0.058	0.726 / 0.040
Viscosity	0.712 / 0.044	0.644 / 0.061	0.572 / 0.072
$\beta$ -Glucan	0.796 / 0.040	0.745 / 0.048	0.706 / 0.060

Tableau 3

Ainsi les valeurs en colonnes 1 sont très proches de celles de la colonne 1 du tableau 2, pour des tailles similaires du jeu d'entraînement ( $N = 612$  en validation croisée au hasard 10 feuilles,  $N = 569$  avec le subset BRE1+BRE2). La Figure 5 illustre les valeurs prédictives pour les 10 caractères obtenues par validation croisée au hasard ou par validation entre populations. Cette dernière donne des valeurs prédictives légèrement inférieures pour les caractères agronomiques, mais très proches pour les caractères liés au malt, et même supérieures pour l'extrait.



Pour explorer pourquoi les caractères liés au malt sont prédits de façon plus précise et plus robuste que les caractères agronomiques, nous avons testé d'autres modèles qui ne s'appuient pas sur le modèle génétique infinitésimal comme le GBLUP. En effet, LASSO et Bayes Cpi estiment les effets additifs d'un nombre limité de marqueurs, en autorisant un plus grand nombre à avoir des effets nuls, tandis que EGBLUP estime également les effets des interactions entre paires de marqueurs. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

TRAIT	$h^2$	$h$	GBLUP	Bayes Cpi	LASSO	EGBLUP
Yield	0.551	0.742	0.446 / 0.022	0.443 / 0.026	0.338 / 0.030	0.463 / 0.016
Prot	0.613	0.783	0.517 / 0.016	0.514 / 0.013	0.482 / 0.020	0.513 / 0.012
TGW	0.837	0.915	0.667 / 0.012	0.669 / 0.015	0.627 / 0.011	0.671 / 0.010
TestW	0.775	0.880	0.662 / 0.012	0.666 / 0.012	0.647 / 0.017	0.677 / 0.009
Cal	0.853	0.923	0.693 / 0.013	0.690 / 0.013	0.639 / 0.021	0.705 / 0.013
Head	0.652	0.807	0.522 / 0.022	0.519 / 0.018	0.511 / 0.019	0.518 / 0.017
Friability	0.895	0.946	0.805 / 0.009	0.806 / 0.006	0.789 / 0.008	0.805 / 0.011
Extract	0.753	0.868	0.654 / 0.009	0.658 / 0.009	0.650 / 0.010	0.669 / 0.009
Viscosity	0.769	0.876	0.690 / 0.011	0.697 / 0.007	0.657 / 0.015	0.700 / 0.009
$\beta$ -Glucan	0.851	0.922	0.753 / 0.009	0.754 / 0.009	0.722 / 0.015	0.761 / 0.009

Tableau 4 : hérabilités au sens large et sa racine carrée estimées dans le dispositif complet (2 années x 5 lieux) et les valeurs prédictives de 4 modèles statistiques (voir MM) obtenues par validation croisée dans la population totale de lignées (moyenne et écart-type de 50 tirages).

Comme attendu, compte-tenu des limites du dispositif, le rendement et la teneur en protéines ont des valeurs modérées d'héritabilité. C'est également le cas pour la date d'épiaison, un trait généralement considéré comme très héritable chez les céréales. Ceci est sans doute dû à une faible gamme de variation dans le matériel étudié, constitué de lignées d'orge d'hiver à 6 rangs adaptées à l'Europe de l'ouest. Il convient de noter que la colonne 1 est l'héritabilité des moyennes parcellaires, quelquefois appelée répétabilité, qui dépend donc du dispositif, et dont la racine carrée est un proxy de la limite supérieure que peut atteindre la valeur prédictive d'un modèle génomique.

Les traits ayant les plus fortes héritabilités sont donc logiquement ceux qui présentent les plus fortes valeurs prédictives. Globalement, il y a très peu de différences entre les 4 modèles, avec LASSO qui montrent des valeurs légèrement inférieures, particulièrement pour les traits à faible héritabilité, rendement et teneur en protéines. Bayes Cpi donne des valeurs prédictives très proches de celles du GBLUP, la différence étant souvent sur la troisième décimale. En comparaison, EGBLUP, qui est supposé modéliser les interactions épistatiques, montre des valeurs prédictives supérieures au GBLUP qui ne modélise que les effets additifs, avec parfois une amélioration significative bien que faible, par exemple pour le rendement.

## 4 Discussion

Malgré un dispositif expérimental de taille relativement réduite et fortement déséquilibré (2 années, 5 lieux, mais seulement 2 ou 3 pour le matériel propriétaire de chaque sélectionneur) les données ont permis d'obtenir de bonnes valeurs de répétabilité pour la majorité des caractères. Ceci nous a permis d'utiliser les moyennes ajustées par LMM pour les prédictions génomiques.

Bien que la sélection assistée par marqueurs ait été proposée il y a plus de 20 ans (e.g. Han *et al.*, 1997), seuls quelques caractères contrôlés par un petit nombre de QTL à effet fort comme le pouvoir diastase ou la teneur en  $\beta$ -glucanes content étaient concernés (Li *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2019). Le développement d'outils de marquage dans haute densité a été développé depuis une dizaine d'années et a ouvert la voie à l'utilisation des approches modernes de génétique quantitative comme la sélection génomique. Du fait de cette disponibilité récente des outils et de son importance secondaire, les publications sur la sélection génomique de l'orge sont encore plus récentes.

Etant donné leur coût financier et en temps, les caractères de qualité du malt ont fait l'objet des premières études de sélection génomique. Un des premiers rapports fut Schmidt *et al.* (2015), qui ont exploré les possibilités de la sélection génomique pour la valeur maltière dans deux programmes de sélection, orge d'hiver et orge de printemps. Les auteurs ont étudié davantage de traits que nous, incluant les activités enzymatiques ( $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -glucanase), mais nos 4 traits liés au malt étaient également inclus. Ils ont utilisé la puce Illumina-9K SNP et retenu 4359 marqueurs pour l'orge d'hiver, qui leur ont donné des valeurs prédictives variant de 0.625 (Extrait) à

0.798 (teneur en  $\beta$ -glucane), donc des valeurs très proches de celles de notre étude, malgré une taille de population d'entraînement très faible ( $N = 102$ ). Il est notable que dans l'étude de Schmidt *et al.* (2015), les valeurs prédictives étaient plus faibles chez l'orge de printemps que chez l'orge d'hiver, de 0.16 en moyenne, malgré des tailles de populations plus grandes. Les auteurs expliquent ce résultat par une plus grande homogénéité génétique des orges d'hiver, comme nous l'avons-nous même rapporté.

Nielsen *et al.* (2016) ont rapporté des valeurs prédictives du G-BLUP dans une population peu structurée d'orges de printemps avec 3540 marqueurs SNP. Par la « leave-one-out » (un cas extrême de validation croisée), ils ont obtenu des valeurs prédictives variant de 0.40 (teneur en protéine) à 0.68 (poids du grain), et même 0.83 pour la teneur en ergostérol, un trait que nous n'avons pas mesuré. Comme dans notre étude, le « leave set out » (validation inter-populations) donne des valeurs prédictives plus faibles allant de 0.31 (protéines) à 0.52 (PMG), et 0.72 pour l'ergostérol.

Il est généralement reconnu qu'augmenter la taille de la population d'entraînement améliore la valeur prédictive des modèles génomique, comme le prédisent la théorie (e.g. Daetwyler *et al.* 2008; Goddard 2009) ou des études par simulation (e.g. Iwata & Jannink, 2011). Nos résultats sont conformes aux attentes théoriques lorsque la population d'entraînement est tirée aléatoirement dans l'ensemble des lignées. De tels résultats ont été rapportés par Nielsen *et al.* (2016). Néanmoins cette relation est loin d'être une règle d'or. Par exemple, Edwards *et al.* (2019), ont montré que, pour une taille fixée, il est préférable d'augmenter le nombre de croisements (descendances) plutôt que la taille des descendances de chaque croisement. Ceci pourrait expliquer pourquoi la petite population de 95 variétés inscrites donne une valeur prédictive plus grande qu'attendue. Il est en effet probable que le nombre de croisements à l'origine de ces 95 variétés du catalogue est plus grand que celui dont dérivent les lignées avancées d'un seul sélectionneur ?

L'avantage de regrouper les lignées avancées de deux sélectionneurs pour constituer une plus grande population de référence ne conduit pas, dans notre étude, à de meilleures valeurs prédictives, du moins en validation croisée, en particulier pour les caractères de valeur maltière. Un résultat similaire avait déjà été rapporté par Lorenz & Smith (2015). En utilisant des lignées d'orge de deux programmes universitaires aux USA (MN and ND), ils montraient qu'ajouter des lignées génétiquement distantes provenant d'un autre programme à la population d'entraînement n'améliorait pas, voire diminuait la valeur prédictive des modèles. Toutefois, le matériel de sélection de ces deux programmes était nettement plus divergent génétiquement que ne le sont les matériels des deux sélectionneurs de notre étude. Une très nette structuration est visible dans leur Figure 1 (heatmap), ce qui n'est pas le cas dans notre matériel.

Bien que l'échelle pour les relations génétiques additives soient différente de la nôtre, l'apparement moyen entre les deux programmes était significativement inférieur à l'apparement moyen au sein de chaque programme,



ce qui à nouveau n'est pas le cas de notre matériel, qui apparait génétiquement beaucoup plus homogène. Toutefois, quand les modèles sont validés sur un set de validation indépendant (variétés), la valeur prédictive obtenue (tableau 3), les valeurs prédictives obtenues en assemblant les lignées des deux sélectionneurs dans la population d'entraînement sont supérieures à celle obtenues avec les lignées d'un seul sélectionneur. D'un point de vue pratique, cela signifie que les programmes d'amélioration ne présentent pas une forte divergence génétique, on peut gagner à rassembler les données pour constituer une plus grande population de référence. Nos résultats montrent également, comme Nielsen *et al.* (2016), qu'un nombre aussi faible que 200 marqueurs est suffisant pour obtenir les meilleures prédictions, ce qui est dû à l'étendue du DL dans le matériel d'orge d'hiver à 6 rangs. Ceci reflète une taille effective assez limitée dans ce germplasm, également visible dans les coefficients d'apparentements relativement élevés, que ce soit au sein ou entre les matériels des deux sélectionneurs.

Comme déjà et souvent rapporté (e.g. Heslot *et al.*, 2012), nous n'avons pas trouvé de grandes différences dans la valeur prédictive des différents modèles. Souvent le bon vieux GBLUP, qui remplace les apparentements « pedigree » par des apparentements « génomiques », apparait comme la meilleure méthode. Des résultats similaires ont été rapporté par Wang *et al.* (2015). En utilisant des données simulées, ils montrent que Bayes Cpi a une meilleure valeur prédictive uniquement dans les scénarios à 20 QTL. Pour les autres architectures génétiques, qu'elles soient simulées ou réelles, le RR-BLUP (équivalent au GVLUP) dépasse légèrement les autres méthodes. Comme dans notre précédente étude sur le blé tendre (Charmet *et al.*, 2020), le modèle qui est supposé capturer les interactions additive-additive entre marqueurs présente effectivement des valeurs prédictives légèrement supérieures à celles du GBLUP.

Dans cette étude, nous en sommes restés à des méthodes de prédiction génomique mono caractère. Bien qu'une étude récente (Bhatta *et al.*, 2020) présente des valeurs prédictives significativement supérieures en utilisant des prédictions génomiques multi caractère, nous ne pensons pas que ça puisse être le cas avec nos données. En effet, les corrélations génétiques rapportées dans Bhatta *et al.* sont bien plus élevées que les nôtres. Les seuls caractères fortement corrélés sont PMG/calibrage, friabilité/extrait et viscosité/ $\beta$ -glucane.

Or ces traits sont déjà très bien prédits (0.6-0.8), il est donc peu probable que des modèles multi caractère montrent une forte amélioration des valeurs prédictives.

Il est bon de noter que les corrélations génétiques trouvées dans ce matériel d'orge d'hiver à 6 rangs sont toutes favorables aux objectifs de sélection. En effet, friabilité et extrait, que l'on cherche à augmenter, sont corrélées négativement à la viscosité et  $\beta$ -glucanes, qui doivent être réduits. PMG et calibrage sont mécaniquement corrélés au rendement, et la teneur en protéines ne lui est pas fortement et négativement corrélée comme rapporté pour le blé tendre (e.g. Oury *et al.*, 2003). De plus, les sélectionneurs cherchent à stabiliser la teneur en protéines plutôt qu'à l'augmenter. Finalement, ces traits semblent indépendants de la précocité d'épiaison, ce qui permet d'envisager l'amélioration de la valeur brassicole aussi bien dans des variétés précoces que tardives afin de les adapter aux climats locaux, présents et futurs.

## 5 Conclusion

Cette étude, basée sur un matériel génétique représentatif de deux programmes appliqués d'amélioration variétale de l'orge d'hiver à 6 rangs, montre des résultats très encourageants quant aux possibilités d'utiliser la sélection génomique pour accélérer et rendre plus efficace les schémas de sélection, particulièrement pour les traits de valeur maltière, par exemple en permettant une sélection pour ces traits à des stades plus précoces, permettant ainsi d'augmenter l'intensité de sélection. Les ressources génétiques d'un seul sélectionneur et du matériel librement utilisable sont suffisantes pour obtenir de bonnes prédictions, mais rassembler des données de plusieurs breeders peut permettre quelques améliorations.

## 6 Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier G Cresté et PM Leroux de SECOBRA Recherches (Maule, France), R Dupont, M Tison et G Touzy de RAGT 2N (Rodez France), S Schwebel & C. Colin et leur équipe de l'IFBM (Vandœuvre-lès-Nancy, France) pour la fourniture du matériel, la conduite des expérimentations et les analyses, incluant les tests de micro maltage, la sous-traitance du génotypage et le nettoyage des données.

## Références bibliographiques

Badr, K. M., Sch, R., El Rabey, H., Effgen, S., Ibrahim, H.H., Pozzi, C., Rohde, W., Salamini, F. (2000). On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*), *Molecular Biology and Evolution*, 17, 499-510, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026330>

Bhatta, M., Gutierrez, L., Cammarota, L., Cardozo, F., Germán, S., Gómez-Guerrero, B., *et al.* (2020) Multi-trait Genomic Prediction Model Increased the Predictive Ability for Agronomic and Malting Quality Traits in Barley (*Hordeum vulgare* L.), *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 10, 1113-1124, <https://doi.org/10.1534/g3.119.400968>

Bayer, M.M., Rapazote-Flores, P., Ganai, M., Hedley, P.E., Macaulay, M., Plieske, J., Ramsay, L., Russell, J., Shaw, P.D., Thomas, W., Waugh, R. (2017). Development and Evaluation of a Barley 50k iSelect SNP Array. *Frontiers in Plant Science* 8, 1792. doi: 10.3389/fpls.2017.01792

Bernardo, R., and Yu, J.M. (2007) Prospects for genomewide selection for quantitative traits in maize. *Crop Science* 47, 1082-1090.

Breiman L. (2001). Random Forests. *Machine Learning* 45, 5-32.

- Charmet, G., Tran, L.G., Auzanneau, J., Rincet, R., Bouchet, S.** (2020). BWGS: A R package for genomic selection and its application to a wheat breeding programme. *PLoS ONE* 15(4): e0222733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222733>
- Crossa J., de los Campos G., Perez P., Gianola D., Burgueño J., Araus J.L., Makumbi D., Singh R.P., Dreisigacker S., Yan J, Arief V., Banziger M. and Braun H.J.** (2010). Prediction of Genetic Values of Quantitative Traits in Plant Breeding Using Pedigree and Molecular Markers. *Genetics* 186, 713-724
- Cullis, B. R., Smith, A.B., Coombes, N.E.** (2006). On the design of early generation variety trials with correlated data. *J. Agric. Biol. Environ. Stat.* 11: 381-393. <https://doi.org/10.1198/108571106X154443>
- Daetwyler, H.D., Villanueav, B., Wooliams, J.A.** (2008). Accuracy of Predicting the genetic risk of disease using a genome-wide approach. *PLoS ONE* 3(10):e3395
- De los Campos, G., Gianola, D., Rosa, G.J.M., Weigel, K.A., Crossa, J.** (2010). Semi-parametric genomic-enabled prediction of genetic values using reproducing kernel Hilbert spaces methods. *Genetics Research* 92, 295-308.
- De los Campos, G., Hickey, J. M., Pong-Wong, R., Daetwyler, H. D., & Calus, M. P. L.** (2013). Whole-Genome Regression and Prediction Methods Applied to Plant and Animal Breeding. *Genetics*, 193(2), 327-345. <http://doi.org/10.1534/genetics.112.143313>
- Edwards, S.M., Buntjer, J.B., Jackson, R. et al.** (2019). The effects of training population design on genomic prediction accuracy in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 132, 1943-1952 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03327-y>
- Endelman, J.B.** (2011). Ridge regression and other kernels for genomic selection with R package rrBLUP. *Plant Genome* 4,250-255. doi: 10.3835/plantgenome2011.08.0024
- Endelman, J.B., and Jannink, J.L.** (2012). Shrinkage estimation of the realized relationship matrix. *G3: Genes Genom Genet* 2, 1405-1413. doi: 10.1534/g3.112.004259
- Fang, Y., Zhang ,X., Xue, D.** (2019). Genetic Analysis and Molecular Breeding Applications of Malting Quality QTLs in Barley. *Front. Genet.* 10, 352. doi: 10.3389/fgene.2019.00352
- Goddard, M.E., and Hayes, B.J.** (2007) Genomic selection. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 124, 323-330.
- Goddard, M.** (2009). Genomic selection: prediction of accuracy and maximization of long term response. *Genetica* 136(2), 245-257.
- Habier, DRL Fernando RL, Kizilkaya K and Garrick DJ** (2011) Extension of the bayesian alphabet for genomic selection. *BMC Bioinformatics* 2011. 12:186.
- Han, F., Romagosa, I., Ullrich, S. E., Jones, B. L., Hayes, P. M., and Wesenberg, D. M.** (1997). Molecular marker-assisted selection for malting quality traits in barley. *Mol. Breed.* 3, 427-437. doi: 10.1023/A:1009608312385
- Haslemore, R. M., Slack, C.R., Brodrick, K.N.** (1982). Assessment of malting quality of lines from a barley breeding programme, New Zealand Journal of Agricultural Research, 25:4, 497-502, DOI: 10.1080/00288233.1982.10425212
- Heffner, E.L., Sorrells, M.E., Jannink, J.L.** (2009). Genomic Selection for Crop Improvement. *Crop Science* 49, 1-12.
- Heslot, N., Yang, H.P., Sorrells M.E., Jannink, J.L.** (2012). Genomic Selection in Plant Breeding: A Comparison of Models. *Crop Sci.* 52, 146-160.
- Iwata H., Jannink J. L.** (2011) Accuracy of genomic selection prediction in barley breeding programs: a simulation study based on the real single nucleotide polymorphism data of barley breeding lines. *Crop Sci* 2011,51: 1915-1927.
- Jannink J. L., Lorenz A. J., Iwata H.** (2010). Genomic selection in plant breeding: from theory to practice. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* 9, 166-177.
- Komatsuda, T., Pourkheirandish, M., He, C., Azhaguvel, P., Kanamori, H., Perovic, D., Stein, N., Graner, A., Wicker, T., Tagiri, A., Lundqvist, U., Fujimura, T., Matsuoka, M., Matsumoto, T., Masahiro Yano M.** (2007). Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (4) 1424-1429, DOI: 10.1073/pnas.0608580104
- Li C.D., Cakir M., Lance R.** (2009) Genetic Improvement of Malting Quality through Conventional Breeding and Marker-assisted Selection. In: Zhang G., Li C. (eds) *Genetics and Improvement of Barley Malt Quality*. Advanced Topics in Science and Technology in China. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-01279-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-642-01279-2_9)
- Lorenz, A., and Smith, K. P.** (2015). Adding Genetically Distant Individuals to Training Populations Reduces Genomic Prediction Accuracy in Barley. *Crop Sci.* 55, 2567-2667 doi :10.2135/cropsci2014.12.0827
- Meuwissen, T.H.E., Hayes, B., Goddard, M.E.** (2001) Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps, *Genetics* 157, 1819-1829.
- Nielsen NH, Jahoor A, Jensen JD, Orabi J, Cericola F, Edriss V, et al.** (2016) Genomic Prediction of Seed Quality Traits Using Advanced Barley Breeding Lines. *PLoS ONE* 11(10): e0164494. doi:10.1371/journal.pone.0164494
- Oury FX, Berard P, Brancourt-Hulmel M, Depatureaux C, Doussinaults G, Galic N, Heumez E, Lecomte C, Pluchard P, Rolland B, Rousset M, Trottet M** (2003) Yield and grain protein concentration in bread wheat : a review and a study of multi-annual data from a French breeding program. *J. Genet. & Breeding* 57 :59-68.
- Park, T., Casella, G.** (2008). The bayesian lasso. *Journal of the American Statistical Association.* 103, 681-686.
- Poland, J., Endelman, J., Dawson, J., Rutkoski, J., Wu, S., Manes, Y., Dreisigacker, S., Crossa, J., Sánchez-Villeda, H., Sorrells, M. and Jannink, J.L.** (2012). Genomic Selection in Wheat Breeding using Genotyping-by-Sequencing. *The Plant Genome* 5, 103-113, <https://doi.org/10.3835/plantgenome2012.06.0006>
- Rodriguez-Álvarez, M.X., Boer, M.P., van Eeuwijk, F.A., Eilers, P.H.** (2018). Correcting for spatial heterogeneity in plant breeding experiments with P-splines. *Spatial Statistics* 23, 52-71. <https://doi.org/10.1016/j.spasta.2017.10.003>
- Schaeffer, L. R.** (2006) Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 123, 218-223 DOI: 10.1111/j.1439-0388.2006.00595.x
- Schmidt, M., Kollers, S., Maasberg-Prelle, A. et al.** (2016). Prediction of malting quality traits in barley based on genome-wide marker data to assess the potential of genomic selection. *Theor Appl Genet* 129, 203-213. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2639-1>
- Sneller, C.; Ignacio, C.; Ward, B.; Rutkoski, J.; Mohammadi, M.** (2021) Using Genomic Selection to Leverage Resources among Breeding Programs: Consortium-Based Breeding. *Agronomy*, 11, 1555. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081555>
- Wang, X., Yang, Z.F., Xu, C.W.** (2015). A comparison of genomic selection methods for breeding value prediction. *Sci. Bull.*, 60, 925-935. <https://doi.org/10.1007/s11434-015-0791-2>
- Zohary, D., and M. Hopf.** (1993) Domestication of plants in the Old World. The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley. Clarendon Press, Oxford, England.

# Genomalt : Prédiction génomique du rendement et de la qualité brassicole chez l'orge d'hiver à 6 rangs

Gilles CHARMET<sup>1</sup>, Pierre PIN<sup>2</sup>, Marc SCHMITT<sup>3</sup>, Nathalie LEROY<sup>4</sup>, Bruno CLAUSTRES<sup>4</sup>, Christopher BURT<sup>4</sup>, Amélie GENTY<sup>2</sup>

1 - INRAE - UCA UMR GDEC, 5 chemin de Beaulieu 63000 Clermont-Ferrand - France

2 - SECOBRA Recherches SAS, Centre de Bois Henry, 78580 Maule - France

3 - IFBM, 7 rue du Bois de la Champelle, F-54500 Vandœuvre les Nancy - France

4 - RAGT 2N, Place du bourg, 12510 Druelle - France

## La France est le 2<sup>ème</sup> exportateur d'orge brassicole dans le monde

1,97 million d'hectares d'orge en 2021, soit 21 % de la surface céréalière sur 120 000 exploitations. 10,4 M de tonnes produits, dont 5,7 M exportées. Les orges de brasserie représentent plus de 4 millions de tonnes soit plus d'un tiers du total. La culture de l'orge d'hiver 6 rangs brassicole est une particularité française qui est grandement responsable de la compétitivité de la filière Orge-Malt-Bière.

# 30 % # <1 % # 70 %



## De l'orge au malt...

La malterie française compte 14 unités de production regroupées en 3 groupes faisant parti des 5 premiers mondiaux.

En 2020/2021, 1,6 million de tonnes d'orges de brasserie ont été transformées en 1,4 million de tonnes de malt. Depuis 1967, la malterie française est le 1<sup>er</sup> exportateur mondial de malt. La France exporte 80 % de sa production de malt soit 1,2 million de tonnes par an.



## Du malt à la bière...

Des nombreuses brasseries ont été créées en France ces dernières années. Aujourd'hui, avec plus de 2 300 brasseries la France est le 1<sup>er</sup> pays européen en nombre de brasseries. La brasserie française emploie 7 900 personnes.

La consommation française de bière est de 22 millions d'hectolitres en 2020, soit une consommation de 33 litres par habitant et par an. Cette consommation place les Français dans les plus faibles consommateurs de bière européens, juste avant l'Italie.

## Les critères de qualité brassicole

### Qualité brassicole de l'orge:

- Calibrage: pour assurer une germination rapide et homogène: % grains >2.5mm
- Protéines: suffisamment pour "nourrir" les levures mais pas trop (filtration): 9.5 à 11.5%
- beta-glucanes (fibres solubles): colmatage des filtres, trouble de la bière (mais recherchés pour nutrition humaine)

### Qualité du malt:

- Taux d'extrait: rendement en malt / tonne d'orge
- Désagréation: capacité de friabilité du grain de malt
- Pouvoir diastasique: activité enzymatique des alpha- et beta-amylases

Les tests de micromaltage sont long/coûteux/exigeants en grains  
Intérêt des prédictions génomique en (pré)sélection

## Matériel & Méthodes

### Matériel végétal:

- 574 lignées avancées des programmes de SECOBRA (Breeder1) et RAGT (Breeder2)
- 105 variétés "fondatrices" inscrites au catalogue officiel

### Phénotypage:

- parcelles observation sur 5 lieux, 2 années (2018-2019)
- Mesure du rendement grain, teneur protéine, PMG, PS, calibrage, épaisseur et hauteur
- Micromaltage réalisé sur deux lieux par an
- Caractères brassicole mesurés: friabilité, extrait, viscosité du mout et teneur en beta-glucanes

### Génotypage:

- 50k Illumina Infinium iSelect genotyping array disponible chez SGS TraitGenetics GmbH

### Analyses:

- Ajustement spatial des données phénotypiques
- Analyse GxE
- QC sur données de marquage (24K marqueurs retenus)
- Diversité génétique (multidimensional scaling)
- Modèle de sélection génomique (GBLUP, Bayes Cpi, LASSO, EGBLUP)
- Validation croisées aléatoires et indépendantes

## Résultats

- Le pourcentage de la somme des carrés suggère que l'effet du génotype est majeur pour les caractères brassicoles étudiés (Fig1).
- L'ACP des variables phénotypiques suggère des corrélations positives ou négatives entre caractères brassicoles (Fig2).
- L'analyse de diversité montre un large chevauchement du matériel des deux sélectionneurs, avec l'absence de structure apparente (Fig3), malgré un début de divergence génétique (Fst 0.03).
- Les aptitudes prédictives (r) des validations croisées réalisées sur les différents modèles varient de 0.4 à 0.8 (Fig4). Les caractères brassicoles sont très bien prédits avec des aptitudes de 0.77 en moyenne.
- Les validations croisées obtenues avec différents sous-échantillonnages de marqueurs suggèrent qu'un petit set de 1000-2000 marqueurs est suffisant (Fig5) pour construire des modèles prédictifs efficaces.

■ GÉNOTYPE ■ GxÉ ■ Environnement

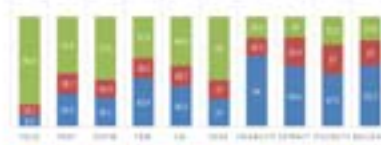


Fig1. Sommes des carrés sous des axes séparés sur les différents caractères étudiés

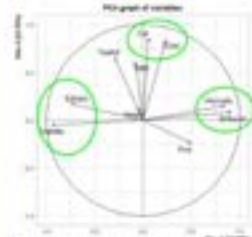


Fig2. Analyse en composantes principales des caractères phénotypiques

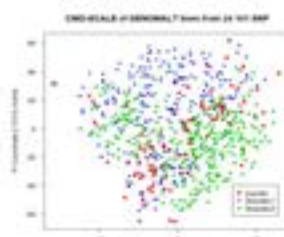


Fig3. Analyse en composantes principales du matériel végétal

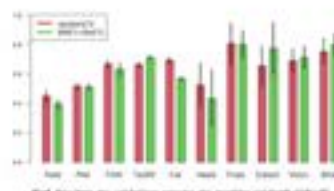


Fig4. Résultats des validations croisées des modèles prédictifs (GBLUP)

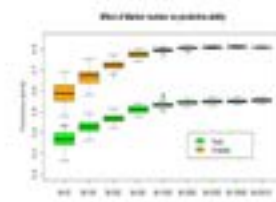


Fig5. Installations croisées pour différents sous-sets de marqueurs

## Conclusions

- Les caractères brassicoles observés sont peu sujets aux interactions GxÉ et sont corrélés favorablement pour atteindre les objectifs en sélection (cad fort extrait, forte friabilité, faible viscosité et faible teneur en beta-glucanes)
- Faible divergence entre les génotypes des deux sélectionneurs (Fst 0.03)
- Aptitude prédictive pour les caractères brassicoles très élevée avec la méthode GBLUP et quelque soit la méthode de validation croisée
- Sous-échantillonnage de 1000-2000 marqueurs semble suffisant et optimal

Résultats extrêmement encourageants pour envisager un déploiement de la sélection génomique dans les programmes d'orge d'hiver 6 rangs pour assister la sélection des caractères brassicoles

INRAE: Gilles CHARMET - IFBM: Marc SCHMITT - RAGT 2n: Nathalie LEROY, Bruno CLAUSTRES, Christopher BURT - SECOBRA Recherches: Amélie GENTY, Pierre PIN

INRAE

IFBM

RAGT 2n

SECOBRA RECHERCHES



# GlutNsafe : « Vers la sélection de variétés de blés au gluten plus digestible ? »

Mélanie LAVOIGNAT<sup>1,2</sup>, Sylvain DENIS<sup>3</sup>, Annie FAYE<sup>1</sup>, Laura HALUPKA<sup>4</sup>, Sibille PERROCHON<sup>1</sup>, Larbi RHAZI<sup>5</sup>, Sébastien DEJEAN<sup>6</sup>, Pascal GIRAudeau<sup>7</sup>, Gérard BRANLARD<sup>1</sup>, Catherine RAVEL<sup>\*1</sup>, Emmanuelle BANCEL<sup>1</sup>

1 - Université Clermont Auvergne-INRAE, UMR1095 GDEC 5 chemin de Beaulieu 63000 CLERMONT-FERRAND

2 - AgroParisTech 16 rue Claude Bernard 75005 PARIS

3 - Université Clermont Auvergne-INRAE UMR454 MEDIS CLERMONT-FERRAND

4 - CereLab 21110 Aiserey

5 - UniLaSalle 19 Rue Pierre Waguet 60000 Beauvais

6 - Institut de Mathématiques de Toulouse UMR5219 Université de Toulouse CNRS UPS 31062 TOULOUSE cedex 9

7 - Représentant l'UFS 17, rue du Louvre 75001 PARIS

\*Coordinateur : Catherine RAVEL, [catherine.ravel@inrae.fr](mailto:catherine.ravel@inrae.fr)

## 1 Introduction

Le blé est à la base de l'alimentation humaine. Consommé généralement sous forme de produits transformés, il couvre plus de 20 % des besoins en énergie et en protéines des adultes et constitue également une source importante de fibres. Les protéines de la farine représentent 10 à 15 % de la matière sèche. Elles sont constituées pour environ 20 % de protéines fonctionnelles, les albumines-globulines, et pour environ 80 % par de protéines de réserve. Ces dernières regroupent environ 60 % de gluténines et 40 % de gliadines (Seilmeier *et al.*, 1991). Les gluténines sont subdivisées en sous-unités de haut poids moléculaires (GHPM) et de faible poids moléculaires (GFPM). Les gliadines sont classées en  $\alpha/\beta$ -,  $\gamma$ -, et  $\omega$ -gliadines selon leur mobilité électrophorétique. La teneur et la composition en protéines du grain de blé dépendent de facteurs génétiques et environnementaux et de leurs interactions au cours du développement de la plante (Afzal *et al.*, 2020 ; Branlard *et al.*, 2001). Les protéines de réserve sont codées par des gènes de structure appartenant à des familles multigéniques connues pour leur grande diversité. L'expression de ces gènes est finement régulée par un réseau transcriptionnel bien conservé chez les dicotylédones. Cependant, des différences existent quant à cette régulation entre les familles de plantes et aussi entre les gènes de protéines de réserve comme le montrent Plessis *et al.* (2013) qui pointent que la régulation des gluténines se distingue de celle des gliadines. Les facteurs environnementaux, comme la nutrition azotée et soufrée des plantes, affectent également la teneur en protéines et la composition du grain (Yu. *et al.*, 2021 ; Bonnot *et al.*, 2017) qui sont des paramètres clefs de la qualité des blés.

La qualité technologique de la farine, liée aux protéines de réserve, détermine le type de transformation et d'utilisation finale du blé. Le réseau de gluten qui se forme dans la pâte, après hydratation et pétrissage de la farine, est à l'origine de cette qualité. Ce réseau provient de l'agrégation des protéines de réserve et confère à la pâte des propriétés uniques de visco-élasticité. Comme décrit dans la revue de Johansson *et al.* (2013), les GHPM peuvent former des polymères de grande taille par le biais de ponts disulfures. Ces polymères constituent le squelette du gluten. Ils sont responsables de l'élasticité et

la ténacité de la pâte. Les GFPM se lient au squelette du gluten par ponts disulfures. Les gliadines monomériques s'agrègent aux polymères de gluténines par liaisons non-covalentes (Lamacchia *et al.*, 2014), bien que certaines d'entre elles, riches en soufre, puissent également s'associer aux polymères par des ponts disulfures intermoléculaires (Johansson *et al.*, 2013). Les gliadines sont à l'origine des propriétés d'extensibilité de la pâte. En conférant force et extensibilité à la pâte, le gluten est essentiel à la panification.

La qualité nutritionnelle des protéines du grain de blé est influencée par leur digestibilité et leur composition en acides aminés (AA), notamment par la proportion d'AA essentiels (qui ne peuvent être synthétisés par les animaux) qu'elles contiennent. Cette digestibilité dépend notamment des procédés de transformation, de facteurs antinutritionnels et aussi de la structure et de la composition protéique (Joye, 2019; Rieder *et al.*, 2021). Comme le rappellent Shewry & Hey (2015), les protéines de réserve du blé, sont pauvres en lysine (comme beaucoup de protéines végétales), AA essentiel. Elles sont riches en proline et glutamine (respectivement 10-30 % et 30-50 % selon la fraction protéique). L'inconvénient de cet apparent bénéfice vient de la résistance partielle aux enzymes gastrointestinales des peptides riches en ces deux AA. En effet, certains de ces peptides sont encore intacts quand ils atteignent la muqueuse intestinale ce qui peut entraîner des réactions adverses telles que la maladie cœliaque ou l'allergie au blé. Ces deux pathologies reposent sur des réponses immunitaires. Les symptômes et la pathogénèse de ces maladies sont bien connus. Des biomarqueurs existent et le rôle du gluten dans ces pathologies est clairement établi (Scherf *et al.*, 2016). La sensibilité au gluten non cœliaque (SGNCNA), ou sensibilité au gluten, est un trouble de santé associé à l'ingestion d'aliments contenant du gluten, chez certains individus qui ne sont ni cœliaques ni allergiques au blé. Le médecin ne dispose d'aucun biomarqueur diagnostique de la SGNCNA et il y a toujours une incertitude quant aux composants du blé à l'origine de cette sensibilité. Trois composants pourraient être impliqués, le gluten, des inhibiteurs d'amylase-trypsine (IAT) ou des FODMAPS (fermentable oligo, di, monosaccharides and polyols, notamment le fructane pour le blé) (Catassi, 2015).

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer l'augmentation de la prévalence des troubles associés au gluten que l'on observe aujourd'hui. Branlard *et al.* (2020), après avoir étudié les caractéristiques des polymères de gluténines dans un panel de 192 accessions de blé tendre, suggèrent que l'augmentation de leur masse moléculaire expliquerait l'augmentation de la prévalence de SGNCNA. Sapone *et al.* (2012) suggèrent que la sélection variétale est une autre explication possible. La sélection a longtemps pris en compte des critères technologiques plutôt que nutritionnels, ce qui a conduit à une augmentation de la force du gluten (augmentation du paramètre W mesurée par l'alvéographe Chopin) par le biais d'une diminution du ratio gliadines/gluténines (donc une modification de la composition). En ce qui concerne les épitopes coéliquiques, plusieurs auteurs ont comparé variétés anciennes et modernes. A ce jour, il n'y a pas de consensus sur la question de savoir si la sélection a conduit ou non à l'augmentation de la prévalence des épitopes coéliquiques (Malalgoda *et al.*, 2018; Prandi *et al.*, 2017; Pronin *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.*, 2016; van den Broeck *et al.*, 2010). Cependant, Shewry (2018) a souligné la grande variabilité dans l'abondance des épitopes coéliquiques. Alors que de nombreuses études ont ciblé l'abondance des épitopes coéliquiques chez les espèces de blé, peu d'études ont exploré la digestibilité des protéines du blé et sa variabilité. La digestibilité in vitro des protéines de pains obtenus à partir de la farine d'un seul génotype, pour un échantillon comprenant deux landraces et 19 cultivars de blé tendre inscrits entre 1901 et 2013, a été mesurée par dosage des groupes amines primaires et montre une variabilité génétique (Gulati *et al.*, 2020). Ma et Baik (2021) ont étudié une plus grande gamme de variabilité, incluant des blé modernes (blé tendre, blé dur et blé compact) et des blé anciens (épeautre, amidonnier et engrain), et déterminé la digestibilité in vitro des protéines de farines et de fractions protéiques. La variabilité pour les données de digestibilité in vitro des protéines a été comparée à la variabilité des phénotypes. Des relations significatives ont été identifiées entre la dureté du grain, la composition protéique et la digestibilité in vitro des protéines.

Sélectionner des variétés de blé tendre (*Triticum aestivum*) capables de donner des pains dont les protéines seraient facilement hydrolysées dans le système digestif humain (protéines hautement digestibles) pourrait être un moyen de proposer des pains que pourraient tolérer les personnes SGNCNA. Dans ce contexte, l'objectif de notre travail était d'étudier la variabilité de la digestibilité in vitro des protéines de pains élaborés selon un processus standard. Nos deux hypothèses étaient que 1) les polymères protéiques de masse élevée limitent la digestibilité des protéines du pain et 2) les variétés de blé modernes diffèrent des variétés plus anciennes pour la digestibilité des protéines. Pour tester ces deux hypothèses, 17 variétés de blé panifiable différant par les caractéristiques de leurs polymères protéiques et par leur période d'inscription ont été sélectionnées dans un ensemble de 75 lignées cultivées en deux lieux et phénotypées pour la teneur et la composition en protéines du grain, les caractéristiques des polymères de la farine et les propriétés technologiques de la pâte.

Selon Evenson et Gollin (2003), le développement de variétés modernes de blé et d'autres cultures a commencé à la fin des années 1950 avec la révolution verte. Pour le blé, cette révolution est marquée par l'introgression de gènes de nanisme conduisant à des cultivars plus courts et plus productifs qui ont rapidement supplantés ceux « pré-révolution verte ». Par conséquent, dans ce travail, nous avons considéré la révolution verte comme la limite entre variétés anciennes et variétés modernes.

## 2 Matériel et méthode

### ► 2.1 - Caractérisation phénotypique et génotypique de 75 cultivars afin d'identifier des accessions contrastées à panifier

Soixante-quinze accessions de blé tendre représentatives de différentes périodes de diffusion de 1850 à 2016 et des variétés de pays ont été semées à Estrées-Mons (EM) et Clermont-Ferrand (CF), avec deux répétitions par lieu, en 2016. Ces deux lieux appartiennent à des réseaux différents pour l'inscription de nouvelles variétés de blé d'hiver panifiable en France et diffèrent donc pour leurs conditions pédoclimatiques. Nous avons considéré comme variétés modernes celles inscrites après 1960. Fournies pour la plupart par les sélectionneurs de l'UFS, ces variétés modernes sont largement utilisées par les agriculteurs et généralement bien adaptées à la panification.

Toutes les accessions ont été génotypées avec la puce Axiom BreedWheat 35k (TaBW35K) contenant 34 746 marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Les caractéristiques du grain, la composition protéique, les propriétés technologiques de la pâte, les caractéristiques des polymères de la farine (Tableau S1) ont été mesurés comme décrit dans Lavoignat *et al.* (soumis en mars 2022), et les allèles de GHMP identifiés par SDS-PAGE. La classification hiérarchique des 75 variétés, sur la base de leurs caractères phénotypiques, a permis de sélectionner 17 variétés représentatives de chaque groupe d'âge et de la diversité présente dans le matériel de départ (Tableau 1).

Pour ces 17 variétés, les grains des deux répétitions par génotype et par lieu, qui donnaient des résultats très proches, ont été rassemblés. Cet-ensemble de 17 variétés x 2 environnements a été utilisé pour la panification et la digestion in-vitro. Seules 33 combinaisons ont été considérées car la quantité de grains récoltés à CF pour le génotype W-62 était trop faible.

### ► 2.2 - Panification

Pour chaque génotype et chaque environnement, les grains du mélange des deux répétitions ont été moulus en farine T65 selon la directive BIPEA 102 D 1411. Les pains ont été fabriqués selon la norme AFNOR de panification française (NF V03-716 : 2015-12 - farine de blé tendre - essais de panification pour le pain français standard). Le volume du pain a été déterminé à l'aide d'un volumètre.

Nom de la variété	Génotype	Catégorie d'âge	Période d'inscription <sup>1</sup>	Glu-A1 <sup>2</sup>	Glu-B1	Glu-D1
Cellule	W-04	moderne	2011-2016	b	d	d
Rubisko	W-16	moderne	2011-2016	c	b	a
RGT Velasko	W-18	moderne	2011-2016	c	i	d
Izalco CS	W-22	moderne	2011-2016	b	b	d
Osmose CS	W-24	moderne	2011-2016	c	a	d
Camp Remy	W-27	moderne	1961-1980	b	a	b
Recipro	W-33	moderne	2011-2016	b	d	d
Skerzzo-NamBI	W-39	moderne	2011-2016	a	b	a
Skerzzo-NamNormal	W-40	moderne	2011-2016	a	b	a
LR-Rosso delle Langhe	W-44	ancienne	< 1800	a	b	b
Richelle	W-50	ancienne	1850-1940	a	e	d
Tramy-Puy de Dome	W-53	ancienne	1850-1940	b	c	d
Artois-Desprez	W-59	ancienne	1941-1960	a	a	a
Daeraad	W-62	ancienne	1941-1960	b	i	a
Tahti	W-64	ancienne	1941-1960	a	c	d
Glenlea	W-68	moderne	1961-1980	b	al	d
Blé de Redon Blanc 1/2 Lache 11	W-74	ancienne	< 1800	a	f	a

<sup>1</sup> Les variétés de pays sont classées comme anciennes avec une période d'inscription notée "< 1800".

<sup>2</sup> Les allèles de GHPM aux loci Glu-A1, Glu-B1 et Glu-D1 sont identifiés selon le système de numérotation de Payne et Lawrence (1983).

**Tableau 1 :** Les 17 cultivars de blé tendre étudiés.

### ► 2.3 - Digestion *in vitro* des pains

Les échantillons de pain ont été digérés *in vitro* avec le modèle de tractus gastro-intestinal TNO TIM-1 (TNO, Zeist, Pays-Bas), bien décrit (Dupont *et al.*, 2019 ; Blanquet-Diot *et al.*, 2012). Ce système est constitué de quatre compartiments successifs simulant la dynamique et les conditions de la digestion dans l'estomac et les trois segments de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon). Le modèle intègre les principaux paramètres physico-chimiques de la digestion humaine tels que la température, le pH, les profils de transit et les sécrétions gastriques, pancréatiques et biliaires. Le système reproduit l'absorption passive des produits de la digestion et la réabsorption active de l'eau à l'aide de membranes à fibres creuses (SF 90G, Nipro, Japon) reliées aux compartiments jéjunum et iléal. Dans cette étude, le TIM-1 a été programmé pour simuler la digestion d'un repas solide chez un adulte en bonne santé, comme décrit par Blanquet-Diot *et al.* (2012) avec de légères modifications. Pour simplifier l'analyse des données et se concentrer sur la dégradation du gluten, les repas étaient constitués uniquement de pain préparé en écrasant 56 g de pain congelé dans 73,3 ml de simulant salivaire (877 mg ml<sup>-1</sup> NaCl, 477 mg ml<sup>-1</sup> KCl, 816,4 mg ml<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 441 mg ml<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 5,2 g ml<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>.2H<sub>2</sub>O, pH ajusté à 6,95 avec HCl) et 200,7 ml d'eau minérale. Avant de commencer la digestion, 10 290 U d'alpha-amylase (α-Amylase de Bacillus sp., réf. 10069, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) ont été mélangés à 300 g d'aliment pendant 30 sec. Le mélange a ensuite été introduit dans le compartiment stomacal. Les digestions ont été arrêtées après 2 h, soit la moitié de la durée d'une digestion complète moyenne, afin d'obtenir une hydrolyse partielle du gluten. Les contenus gastrique et jéjunum ont été collectés séparément. Des échantillons de dialysats jéjunum et iléal cumulés, d'effluents iléaux cumulés et de contenus duodénaux et iléaux regroupés ont également été prélevés pour déterminer leur teneur en azote. Tous les échantillons ont été rapidement congelés à -20°C. Chaque pain a été digéré en deux répétitions. Une digestion à blanc, sans pain, a été traitée pour éliminer

les valeurs correspondant aux sécrétions digestives afin d'évaluer uniquement la digestion *in-vitro* des protéines du pain.

### ► 2.4 - Variables synthétiques pour refléter la digestibilité des protéines à partir d'un bilan azoté

La teneur en azote des digestats a été quantifiée par avec un analyseur élémentaire (Thermo modèle Flash EA 1112 Séries, Thermo Finnigan, USA) selon la méthode de Dumas (Dumas, 1831). Après décongélation, les échantillons ont été analysés en deux répétitions techniques. Pour cela, ils ont été placés dans des doubles capsules en étain (8 x 5mm et 10 x 10mm) pour éviter toute fuite. Les volumes de digestats liquides analysés ont été adaptés en fonction de leur compartiment d'origine, de façon à rester dans la gamme d'étalonnage : 50 µl pour les échantillons TO, c'est-à-dire les mélanges introduits dans le compartiment de l'estomac, 100 µl pour les échantillons du jéjunum, 150 µl pour les échantillons de l'estomac, du mélange duodénum-iléum, de fractions digérées post-jéjunum et de fraction non digérée, et 600 µl pour la fraction digérée post-iléon. Les échantillons TO et estomac contenant quelques morceaux de pain ont été broyés dans la glace à l'aide d'un broyeur Polytron PT1000, n°2336 (20 000 RPM, 10 secondes). Avant analyse, tous les digestats liquides ont été séchés pendant 24 h à 60°C (en parallèle de deux blancs avec de l'eau minérale uniquement). Pour chaque échantillon, la moyenne des deux répétitions d'analyses a été calculée. Une variable synthétique basée sur le bilan azoté a été créée pour refléter la digestibilité partielle des protéines (DPP) de chaque pain après 2 h de digestion. Elle correspond au rapport de l'azote dans la fraction digérée-absorbée (c'est-à-dire les dialysats jéjunum et iléal, Nfraction digérée-absorbée) sur l'azote total dans toutes les fractions (Ntoutes les fractions) :

$$DPP = 100 * \frac{N_{\text{fraction digérée-absorbée}}}{N_{\text{toutes les fractions}}}$$

La DPP varie en théorie de 0 % (aucune digestion des protéines) à 100 % (digestion complète des protéines).



## ► 2.5 - Analyses statistiques

Les données ont été analysées sous R version 4.0.5.

### 2.5.1 - Construction d'une matrice de distances génétiques

Le génotypage a donné des résultats de bonne qualité pour toutes les lignées à l'exception de W-59 qui a été écartée de cette analyse. Afin de faciliter l'intégration des données génétiques et phénotypiques, les marqueurs SNP polymorphes ont été utilisés pour calculer, par chromosome, la distance entre la variété considérée et Renan ((W-15), variété d'hiver inscrite en 1990 connue pour une bonne qualité boulangère, que nous avons choisie comme référence. Cette distance correspond à 1 - SSM. SSM est l'indice de similarité de Sokal et Michener (Sokal and Michener, 1958) pour données binaires. Il est calculé pour chaque chromosome.

### 2.5.2 - Analyse de la variance

Un modèle fixe d'ANOVA hiérarchisée a été appliqué aux données. Pour toutes les variables, ce modèle comprend les facteurs environnement (lieu de l'essai), répétition, catégorie d'âge, génotypes hiérarchisés dans les catégories d'âge et leurs interactions deux à deux. La normalité de la distribution des résidus et l'homogénéité de la variance ont été testées à l'aide, respectivement, des tests de Shapiro et de Bartlett.

Pour la suite, 14 valeurs extrêmes (c'est-à-dire avec une valeur absolue des résidus standards de l'ANOVA > 2) ont été retirées et la moyenne des deux répétitions a été calculée. L'effet de l'environnement étant significatif pour la plupart des variables phénotypiques, les données ont été ajustées en retirant cet effet estimé par l'ANOVA. Plus précisément, la différence entre la moyenne générale et la moyenne par environnement a été calculée et les valeurs individuelles ont été ajustées à l'aide de cette différence.

### 2.5.3 - Classification hiérarchique

Les 33 échantillons (16 variétés de chaque environnement et W-62 à EM) ont été regroupés à l'aide d'une classification hiérarchique, prenant en compte le rendement en grains et la teneur en protéines, après correction de l'effet environnement. La distance euclidienne et la méthode d'agrégation de Ward ont été appliquées à l'aide du paquet stats de R.

### 2.5.4 - Analyse factorielle multiple

Afin d'explorer les relations entre les traits phénotypiques et la DPP, une analyse factorielle multiple (AFM), appliquée sur les données ajustées de l'effet environnemental et centrées et réduites, a été réalisée à l'aide de FactoMineR. Cette analyse multidimensionnelle est bien adaptée aux données structurées en groupes de variables. Elle permet d'analyser à la fois des variables catégorielles et quantitatives et préserve la structure des groupes (Bécue-Bertaut & Pagès, 2008 ; <http://factominer.free.fr>). L'AFM fonctionne comme l'analyse en composantes principales pour les variables quantitatives et comme l'analyse des correspondances multiples pour les variables qualitatives. Elle considère la structure multidimensionnelle des données, en intégrant simultanément plusieurs groupes de variables pour étudier les distances entre individus. Nous avons spécifié sept groupes de variables (Tableaux 2 et S1). Toutes les variables liées à 1) la composition des protéines, 2) les caractéristiques technologiques, 3) les caractéristiques des polymères de la farine et 4) les distances génétiques ont été utilisées pour générer

les quatre groupes actifs, qui participent au calcul des axes. Les trois groupes restants ont été définis comme illustratifs. Ils concernent 1) la digestibilité (avec DPP comme variable), 2) la dureté du grain et le poids de mille grains, et 3) les facteurs de l'ANOVA (génotype, catégorie d'âge, environnement) et les allèles de GHMP. En raison de l'absence de distances génétiques pour W-59, cette variété n'a pas été considérée pour l'AMF.

## 3 Résultats et Discussion

Dix-sept variétés de blé tendre, cultivées en deux lieux, ont été phénotypées et panifiées. L'analyse de la variance a montré une absence de différence significative entre les répétitions pour la plupart des traits phénotypiques (Tableau 2). Par conséquent, les grains des deux répétitions par lieu ont été regroupés pour être transformés. Les pains standards produits ont été digérés in vitro. Les graphiques des individus de l'AMF ont montré que les deux répétitions de digestion sont généralement proches les unes des autres. Ainsi, la DPP a été calculée en utilisant les données moyennes par digestion.

### ► 3.1 - L'environnement et la catégorie d'âge de la variété influencent les traits phénotypiques mais pas la digestibilité partielle des protéines

Le facteur environnement affecte significativement au seuil  $\alpha$  de 5 % tous les traits phénotypiques (Tableau 2), à l'exception du rayon de giration moyen en poids des polymères. Le rendement moyen en grains à EM est en moyenne supérieur de 1000 kg/ha à celui de CF, tandis que la teneur en protéines de CF est en moyenne supérieure de 2 % à celle d'EM. La teneur en protéines varie de 9,40 % à 17,55 %. Elle est significativement influencée par l'interaction environnement x catégorie d'âge ( $p < 0,001$ ). Le pourcentage de protéines de réserve par rapport aux protéines totales dépend principalement de l'environnement qui explique plus de 70 % de la variation totale. La fraction moyenne des protéines de réserve dans les protéines totales est environ 20 % plus élevée à CF qu'à EM (respectivement 77,02 % et 59,10 % des protéines totales). L'interaction environnement x génotype influence significativement toutes les caractéristiques des polymères de la farine ( $p < 0,001$ ). Pour les propriétés technologiques, plus de 50 % de la variation est expliquée par les génotypes (Tableau 2.).

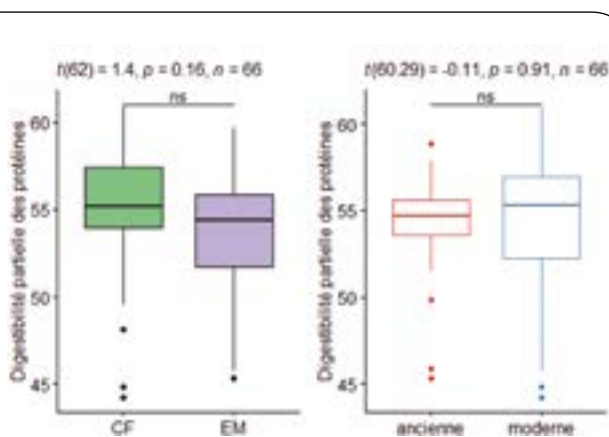
L'indice de digestibilité DPP ne dépend ni de l'environnement ( $p = 0,163$ ), ni de la catégorie d'âge de la variété ( $p = 0,816$ ) (Tableau 2 ; Figure 1). La DPP moyenne des individus à CF est de 54,80 %. Elle atteint 53,44 % à EM. Il n'y a pas de différence entre la DPP moyenne des variétés modernes et des variétés anciennes (respectivement 54,16 % et 54,06 %). La digestibilité réelle des protéines du blé chez l'homme est d'environ 90 % et la récupération cumulée de l'azote alimentaire atteint 80 %, 4h après l'ingestion du pain (Bos *et al.*, 2005). La digestibilité in vitro des protéines du pain de farine blanche varie de 63 % (exprimée en % de petits peptides des protéines totales après 2h de phase gastrique et 2h de phase intestinale) (Rieder *et al.*, 2021) à 101 % (exprimée en digestibilité fécale réelle) (Gilani *et al.*, 2005) et reflète bien la digestibilité in vivo des protéines du pain. Les valeurs moyennes de DPP obtenues à 2h de digestion sont cohérentes avec ces valeurs puisque nous sommes à mi-digestion.

Variable <sup>1</sup>	Pourcentage de variation expliquée						P value					
	E <sup>2</sup>	r <sup>2</sup>	CA <sup>2</sup>	G <sup>2</sup>	E x CA	E x G	E	r	CA	G	E x CA	E x G
rendement	20.11	1.26	34.35	33.36	2.46	3.60	0.000	0.031	0.000	0.000	0.001	0.140
dureté	0.58	0.52	5.49	76.38	1.99	11.63	0.031	0.117	0.000	0.000	0.000	0.000
PMG	21.22	0.61	20.77	47.64	1.37	6.05	0.000	0.035	0.000	0.000	0.000	0.000
GNC	0.61	0.05	45.16	47.83	0.07	3.98	0.008	0.695	0.000	0.000	0.347	0.001
p.Ptot	29.13	0.45	28.54	32.72	3.21	2.53	0.000	0.155	0.000	0.000	0.000	0.141
HPM.sur.FPM	32.01	1.33	0.40	45.41	0.06	9.17	0.000	0.210	0.330	0.000	0.746	0.129
gli.sur.glu	4.75	0.23	44.42	41.75	1.31	2.61	0.000	0.498	0.000	0.000	0.008	0.372
pHPM.Ptot	1.84	1.37	17.92	58.86	0.76	9.23	0.029	0.155	0.000	0.000	0.149	0.069
pFPM.Ptot	57.92	0.03	15.88	17.79	0.12	3.74	0.000	0.905	0.000	0.000	0.382	0.093
pglu.Ptot	45.41	0.19	20.39	23.97	0.19	5.38	0.000	0.544	0.000	0.000	0.266	0.014
pw5.Ptot	36.49	0.23	8.10	45.16	0.19	3.77	0.000	0.582	0.000	0.000	0.348	0.271
pw1.2.Ptot	3.41	0.42	17.51	59.15	3.50	8.75	0.001	0.440	0.000	0.000	0.001	0.018
pab.Ptot	35.93	0.99	14.78	36.04	1.57	5.60	0.000	0.069	0.000	0.000	0.005	0.024
pg.Ptot	47.67	0.24	11.62	29.95	1.55	4.50	0.000	0.459	0.000	0.000	0.003	0.039
pgli.Ptot	48.33	0.57	16.25	24.64	1.73	4.57	0.000	0.129	0.000	0.000	0.001	0.017
pPR.Ptot	73.79	0.53	0.00	16.84	0.38	5.04	0.000	0.117	0.949	0.000	0.078	0.004
pAG.Ptot	73.79	0.53	0.00	16.84	0.38	5.04	0.000	0.117	0.949	0.000	0.078	0.004
P	3.54	0.53	4.84	80.55	0.38	4.21	0.000	0.281	0.000	0.000	0.180	0.166
L	23.37	0.70	4.39	60.64	0.00	6.04	0.000	0.153	0.000	0.000	0.936	0.020
W	7.13	0.61	4.10	81.18	1.14	2.96	0.000	0.058	0.000	0.000	0.002	0.035
hum.glut	16.59	0.12	26.40	53.91	0.09	1.34	0.000	0.368	0.000	0.000	0.218	0.124
sec.glut	13.44	0.09	25.99	58.44	0.22	0.43	0.000	0.427	0.000	0.000	0.047	0.841
GI	1.33	0.00	42.34	51.24	0.69	3.23	0.000	0.967	0.000	0.000	0.000	0.000
volume.pain	17.13	NA	1.34	58.70	0.83	NA	0.005	NA	0.371	0.048	0.479	NA
F_Confo	14.41	0.29	0.29	39.85	0.10	41.01	0.000	0.360	0.129	0.000	0.354	0.000
F_Mw	18.20	0.50	3.90	44.09	0.29	30.34	0.000	0.077	0.000	0.000	0.083	0.000
F_Polydis	25.56	0.87	1.82	44.68	2.55	21.26	0.000	0.032	0.000	0.000	0.000	0.000
F_Rw	0.32	0.01	0.67	60.56	4.29	30.76	0.103	0.969	0.021	0.000	0.000	0.000
F_Rh.w	3.03	0.08	10.47	62.58	2.93	19.07	0.000	0.531	0.000	0.000	0.000	0.000
F_qté.polym	39.00	0.08	0.15	35.18	1.82	20.75	0.000	0.663	0.235	0.000	0.000	0.000
DPP	2.39	1.37	0.11	42.65	3.76	17.90	0.163	0.551	0.816	0.013	0.080	0.383

<sup>1</sup> Les variables sont explicitées dans le tableau S1. Les couleurs indiquent les groupes de variables de l'AFM. Caractéristiques des polymères (bleu), la composition protéique (vert) et les propriétés technologiques (marron) sont des groupes de variables actifs. La DPP ainsi que le PMG sont des groupes de variables illustratifs (orange).

<sup>2</sup> E, environnement ; r, répétitions ; CA, catégorie d'âge ; G, génotype.

**Tableau 2 :** Pourcentage de variance expliquée et p-value de l'ANOVA hiérarchisée pour 31 variables.



**Figure 1 :** Boxplots représentant la médiane et la dispersion de la digestibilité partielle des protéines du pain en fonction du lieu d'essai (à gauche) et du groupe d'âge (à droite). Dix-sept cultivars de blé tendre ont été cultivés à Clermont-Ferrand (CM) et à Estrées-Mons (EM) en deux répétitions. Les variétés anciennes et modernes ont été respectivement inscrites avant et après 1960. Les résultats du test de Welch sont indiqués au-dessus des boxplots. ns, non significatif.

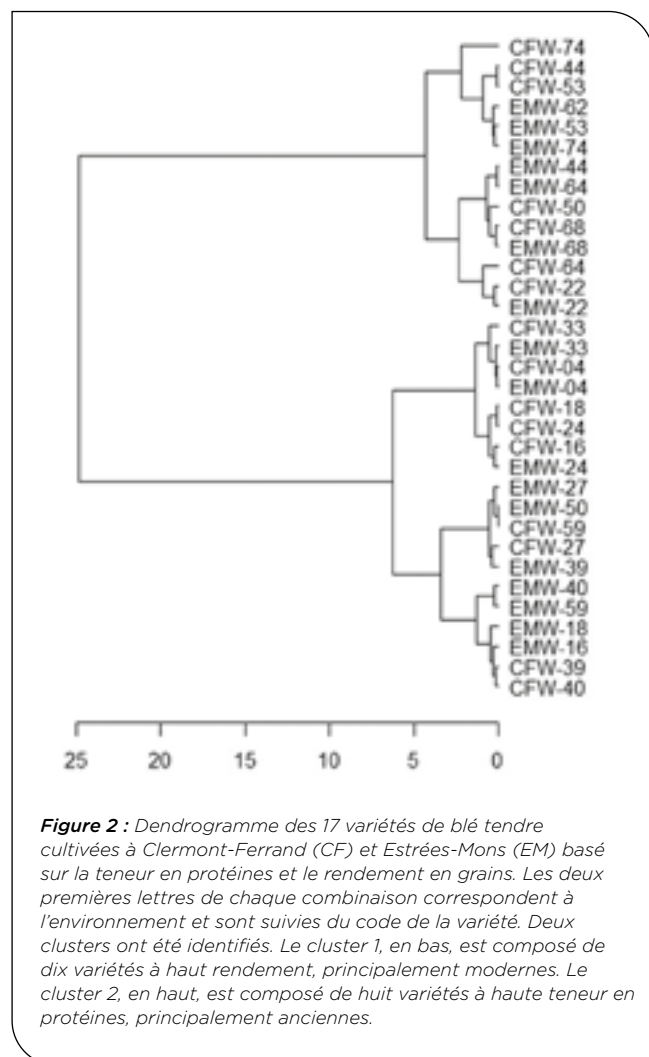
Considérant que tous les traits phénotypiques varient entre les deux environnements, l'ensemble des données a été ajusté pour cet effet afin de relier la DPP à la part génétique de chaque trait étudié.

### ► 3.2 - Les variétés sont regroupées en deux clusters

Bien que cultivées selon des pratiques agricoles similaires, les variétés ont montré des performances agronomiques diverses avec des différences de teneur en protéines et de rendement en grains. Aussi, afin de regrouper les variétés ayant des performances agronomiques similaires, une classification hiérarchique a été réalisée sur la base des moyennes ajustées pour la teneur en protéines et le rendement en grains. La classification obtenue montre que les 17 variétés forment deux clusters (Figure 2).

Le cluster 1 compte 10 accessions inscrites après 1960, à l'exception de W-50 et W-59, qui avaient un rendement élevé dans nos conditions. Le cluster 2 comprend 8 accessions, toutes inscrites avant 1960, à l'exception de W-22, un blé de force. Ces 8 accessions sont caractérisées par leur richesse en protéines.

Le génotype W-50 est présent dans les deux clusters. Cultivé à CF, il se positionne avec les variétés à haute teneur en protéines alors que cultivé à EM, il se classe avec les variétés à haut rendement, ce qui suggère une forte interaction génotype x environnement pour ces deux caractères. La classification des cultivars dans ces deux groupes (haut rendement vs haute teneur en protéines) était attendue car elle reflète la corrélation négative bien établie entre le rendement en grains et la teneur en protéines des grains (Oury *et al.*, 2003).



**Figure 2 :** Dendrogramme des 17 variétés de blé tendre cultivées à Clermont-Ferrand (CF) et Estrées-Mons (EM) basé sur la teneur en protéines et le rendement en grains. Les deux premières lettres de chaque combinaison correspondent à l'environnement et sont suivies du code de la variété. Deux clusters ont été identifiés. Le cluster 1, en bas, est composé de dix variétés à haut rendement, principalement modernes. Le cluster 2, en haut, est composé de huit variétés à haute teneur en protéines, principalement anciennes.

### ► 3.2 - Les liens entre la digestibilité partielle des protéines et les variables phénotypiques diffèrent pour le cluster 1 et le cluster 2

La classification hiérarchique indique clairement que le matériel utilisé est structuré en deux clusters. Par conséquent, une AFM par cluster a été réalisée. Pour chacune des AFM, la composition protéique, les caractéristiques des polymères, les caractéristiques technologiques et les distances génétiques étaient des groupes actifs. La dureté du grain et le poids de mille grains, la digestibilité ainsi que les facteurs ANOVA et les allèles de GHPM étaient quant à eux des groupes illustratifs.

Sur la base des deux AMF, les relations entre les variables ont été étudiées afin d'identifier les traits phénotypiques liés à la DPP.

Pour les génotypes du cluster 1 (cultivars productifs), les deux premières dimensions de l'AFM expliquent 49,9 % de la variabilité totale (Figure 3a). La DPP est bien projetée ( $\cos^2 > 0,35$ ) sur la première dimension (corrélation = 0,62,  $p < 0,01$ ) qui explique 29,1 % de la variation totale. La DPP a une relation positive avec la teneur en protéines totales (p.Ptot) (Figure 3a) sans que la régression linéaire sur ces deux variables ne soit significative ( $R^2$  ajusté = 0,11,  $p > 0,05$ ). De plus, la DPP a une relation positive avec la fraction des protéines de réserve dans les protéines totales du grain (pPR.Ptot), en particulier les gluténines HPM (pHPM.Ptot) et les  $\gamma$ -gliadines (pg.Ptot). La force boulangère (W) et l'extensibilité de la pâte (L), ainsi que le gluten sec et humide et le volume du pain, sont positivement corrélés à la fraction de gluténines (pglu.Ptot). Les propriétés technologiques sont également positivement corrélées à la DPP. La masse des polymères de la farine (F\_Mw), leurs rayons (F\_Rh.w et F\_Rw) et la polydispersité (F\_polydisp) sont indépendants de la DPP. La DPP est négativement associée aux fractions d'albumines-globulines (pAG.Ptot) et aux  $\omega 5$ -gliadines (pw5.Ptot), qui se projettent à l'opposé. Pour le cluster 1, les farines des variétés avec une concentration en protéines élevée, riches en protéines de réserve mais pauvres en  $\omega 5$ -gliadines et en albumines-globulines, montrent une protéolyse élevée après 2 h de digestion. Les relations entre la DPP, les fractions de protéines de réserve et d'albumines-globulines sont cohérentes avec les résultats de Ma et Baik (2021) qui ont constaté que la digestibilité in vitro des albumines et des globulines était inférieure à celle du gluten. De plus, la fraction des albumines peut contenir jusqu'à 20 % d'inhibiteurs d'amylase-trypsine (IAT) (Dupont *et al.*, 2011) qui peuvent, en inhibant la trypsine, augmenter la quantité de peptides non digérés (Geisslitz *et al.*, 2021). Ces IAT sont aussi partiellement résistants à la digestion enzymatique et induisent une réponse immunitaire innée (Zevallos *et al.*, 2017). Contrairement à ces résultats, Liu *et al.* (2021) ont observé une corrélation négative entre la digestibilité des protéines du pain et la teneur en protéines de la farine blanche. Cette différence pourrait résulter de différences dans les analyses (farine blanche vs farine complète, méthode de digestion in vitro statique vs dynamique, expression de la digestibilité des protéines du pain). En outre, notre analyse s'est concentrée sur un seul cluster composé de variétés productives (modernes), alors que Liu *et al.* ont considéré des cultivars commercialisés entre 1870 et 2013. Cependant, Liu *et al.* (2021) ont mis en évidence une augmentation de la proportion de GHPM et de la digestibilité du pain en fonction de l'année de mise sur le marché. Ici, nos résultats ont montré une forte corrélation positive entre la DPP et le pourcentage de GHPM. Aucune relation évidente n'a été identifiée entre les caractéristiques des polymères dans la farine et la DPP. Cela pourrait s'expliquer par des changements entre les polymères protéiques de la farine et ceux du pain dus à la panification.

Les deux premières dimensions de l'AFM réalisée avec les variétés du cluster 2 (variétés avec une concentration élevée en protéines), expliquent 52,5 % de la variabilité totale (Figure S1). La DPP est mal projetée dans ce premier plan ( $\cos^2 < 0,05$ ). Sa projection est meilleure ( $\cos^2 > 0,35$ ) sur le second plan



défini avec les troisième et quatrième composantes, qui expliquent respectivement 11,8 % et 9,2 % de la variation (Figure 3b). À l'exception de la fraction des  $\omega$ 1.2-gliadines corrélée négativement à la DPP, aucun des traits phénotypiques étudiés montre une relation avec la DPP.

Pour les deux clusters, deux fractions de  $\omega$ -gliadines, (pw5.Ptot et pw1.2.Ptot, respectivement pour les variétés des clusters 1 et 2) sont négativement corrélées à la DPP. Elles semblent se distinguer des autres classes de gliadines qui sont soit positivement corrélées (pour les cultivars productifs) soit indépendantes de la DPP (pour les cultivars riches en protéines). Une étude récente sur les assemblages de polymères de gluten a montré que les  $\omega$ -gliadines se comportent différemment des  $\alpha$ ,  $\beta$ -et  $\gamma$ -gliadines, interagissant par des liaisons non covalentes avec les polymères de gluténines (Morel *et al.*, 2020).

Dans l'ensemble, les corrélations entre variables phénotypiques et DPP diffèrent entre les deux clusters. Après 2 h de digestion, la digestibilité des variétés du cluster 1 est associée à plusieurs traits phénotypiques tels que la composition protéique, tandis que la digestibilité des variétés du cluster 2 n'est liée à aucun trait phénotypique, à l'exception de la fraction des  $\omega$ 1.2-gliadines. Ces résultats suggèrent que la DPP du pain des variétés modernes pourrait être indirectement améliorée en utilisant des variables corrélées à la DPP.

Les distances génétiques à Renan par chromosome ont également contribué à structurer l'inertie totale (Figures 3a et b), ce qui indique que des facteurs génétiques moduleraient également la DPP.

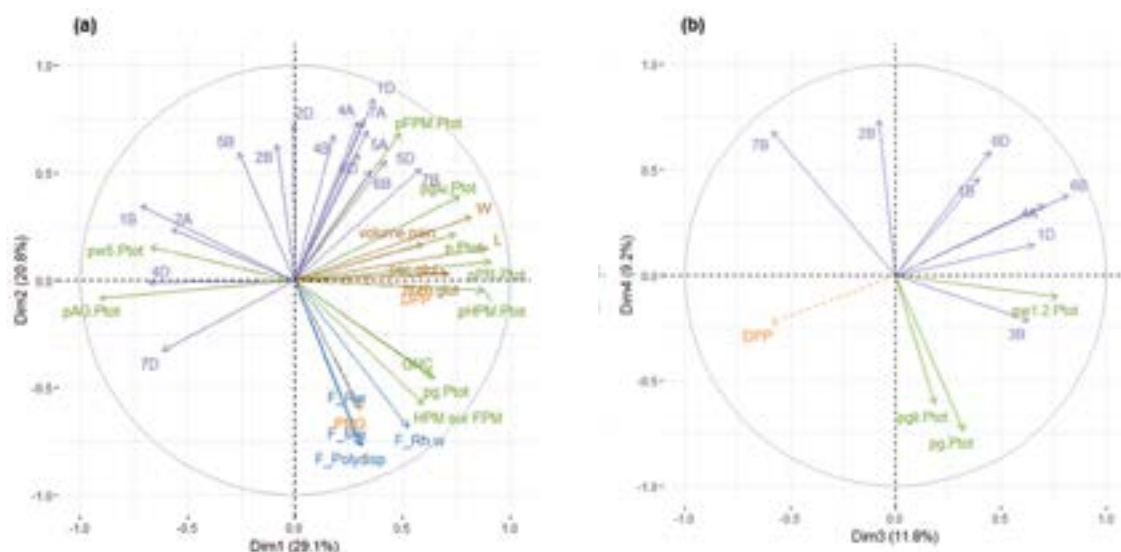
Pour les variétés du cluster 1, les distances pour les chromosomes 1B, 2A, 4D et 7D sont opposées à la DPP (Figure 3a). Pour les variétés du cluster 2, les distances pour les chromosomes 1B, 1D, 3B, 4A, 6B et 6D sont

négativement corrélées à la DPP (Figure 3b). Pour les deux clusters, la distance pour le chromosome 7B est positivement associée à la DPP. Les chromosomes des groupes 1 et 6 portent les gènes de protéines de réserve. Ils portent également des gènes impliqués dans leur régulation transcriptionnelle (Plessis *et al.*, 2013). De plus, ces auteurs ont souligné le rôle des chromosomes 6B et 7D dans la composition en gliadines et gluténines, respectivement. Cependant, ce travail ne permet pas de rechercher de marqueurs associés à la DPP par des approches de génétique d'association en raison de la petite taille de l'échantillon (17 accessions). En résumé, compte tenu des distances génétiques, des similitudes avec Renan pour neuf chromosomes (1B, 1D, 2A, 3B, 4A, 4B, 6B, 6D et 7D) favoriseraient la DPP du pain.

Enfin, l'analyse en AMF, nous a permis d'étudier simultanément les liens entre plusieurs variables qui peuvent différer de l'analyse de corrélation entre deux variables.

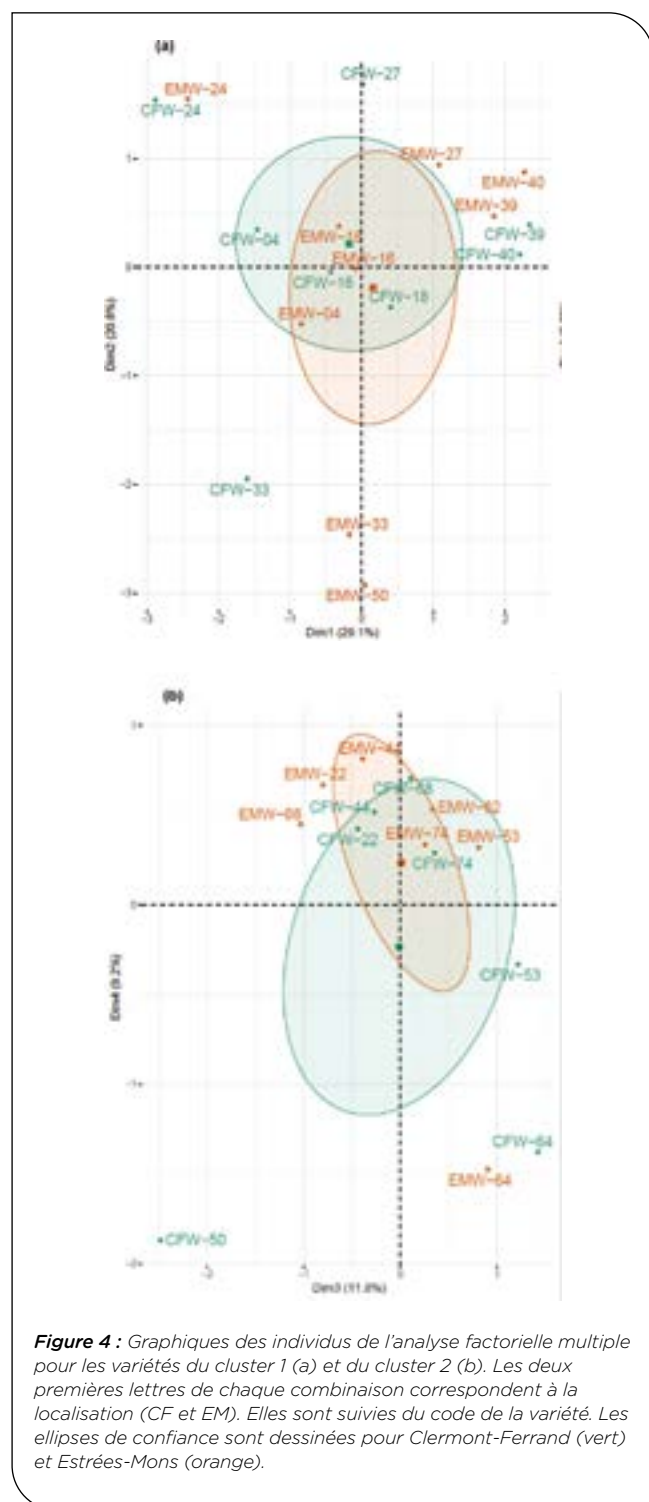
### ► 3.3 - Les génotypes diffèrent pour la digestibilité partielle des protéines du pain

Les valeurs de DPP pour W-74 et W-18 cultivés à EM ont été considérées comme des valeurs extrêmes sur la base des résidus standard et retirées de l'ANOVA. Le facteur « génotype » explique la plus grande partie (42,65 %) de la variation totale de la digestibilité (Tableau 2), ce qui confirme les résultats de l'AFM, tandis que la contribution des autres facteurs (environnement et catégorie d'âge) est faible. La résiduelle représente cependant un tiers de la variation totale. Ces résultats indiquent que la DPP ne dépend pas uniquement de facteurs génétiques. La DPP varie de manière significative entre les 17 accessions ( $p < 0,05$ ), allant de 44,21 % pour W-24 (CF, rep2) à 60,89 % pour W-18 (CF, rep 2).



**Figure 3 :** Graphiques des variables de l'analyse factorielle multiple pour les variétés du cluster 1 (a) et celles du cluster 2 (b). La distance génétique au cv Renan pour chaque chromosome (violet), les caractéristiques des polymères (bleu), la composition protéique (vert) et les propriétés technologiques (marron) sont des groupes de variables actifs. La DPP ainsi que le PMG ont été définis comme groupes de variables illustratifs (orange).

Comme le montre la superposition des ellipses de confiance pour CF et EM, l'effet environnement (lieu) est bien corrigé (Figure 4). Pour les cultivars du cluster 1 (Figure 4a), W-39 et W-40 présentent la DPP la plus élevée, tandis que W-24, qui est associé à une teneur élevée en albumines-globulines (pAG.Ptot) et en  $\omega$ 5-gliadines (pw5.Ptot) (Figure 3a), présente la DPP la plus faible. Toutes les variétés du cluster 2 ont été projetées ensemble, à l'exception de W-64 et de W-50 cultivée à CF (Figure 4b). W-50 cultivée à CF a la DPP la plus élevée. Ce résultat est cohérent avec la projection de W-50 cultivée à EM, qui est également caractérisée par une DPP élevée.



Il est à noter que W-39, W-40 et W-50 portent l'allèle a (sous-unité 1) au locus Glu-A1, comme quatre autres accessions de notre panel (Tableau 1), et que W-24 porte l'allèle c (sous-unité nulle). Les allèles de GHMP à Glu-A1 pourraient influencer la digestibilité des protéines, l'allèle a augmentant la DPP. Cet allèle est associé à une résistance de la pâte plus élevée que l'allèle Glu-A1c (Branlard *et al.*, 2001). Ceci est en accord avec le fait que la DPP est positivement associée aux caractéristiques technologiques. En outre, Branlard *et al.* (2020) ont étudié l'effet de 31 allèles de gluténines sur les caractéristiques des polymères (Mw, Rw et polydispersité) en utilisant 192 cultivars cultivés dans onze environnements. Ces auteurs ont montré que les allèles des loci *Glu1* peuvent influencer la structure du gluten avec un effet positif faible de l'allèle Glu-A1a sur Mw, Rw et la polydispersité. Cependant, dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de relation entre la DPP et les caractéristiques des polymères de la farine.

Comme Gulati *et al.* (2020), nous avons mis en évidence des différences de DPP entre les cultivars de blé utilisés. Nous avons identifié des génotypes avec une DPP plus élevée, qui pourraient être utilisés par les sélectionneurs pour améliorer cette variable. De plus, la corrélation entre la DPP et les distances génétiques à Renan observées pour certains chromosomes pourraient aider à élucider le contrôle génétique de ce caractère et à trouver des marqueurs génétiques associés. L'identification de tels marqueurs serait très utile pour les sélectionneurs, rendant possible la sélection assistée par marqueurs pour la DPP, caractère que l'on ne peut phénotyper en routine.

## 4 Conclusion

Afin d'étudier la variabilité des variétés de blé tendre pour la protéolyse du pain au cours d'une digestion in-vitro, dix cultivars modernes et sept cultivars anciens ont été génotypés, phénotypés et leur pain digéré in-vitro. Nos résultats ont montré une variation entre les cultivars pour la protéolyse du pain après 2 h de digestion. Les variétés productives et les variétés à haute teneur en protéines se comportent différemment. A partir d'une analyse multidimensionnelle, nous avons observé que la digestibilité partielle des protéines des cultivars productifs (cultivars modernes) est positivement corrélée aux distances génétiques à Renan pour certains chromosomes ainsi qu'à plusieurs traits phénotypiques, tels que la teneur et la composition en protéines. Contrairement à notre hypothèse, les polymères de la farine ayant de grands rayons de giration et une masse moléculaire élevée ne sont pas opposés à la digestibilité partielle des protéines.

Enfin, nos données suggèrent que la sélection du blé pour améliorer la digestibilité des protéines du pain est possible et semble compatible avec la sélection pour la qualité technologique. Travailler sur les procédés de panification pourrait également contribuer à améliorer la digestibilité des protéines du pain dans la mesure où la digestibilité est positivement corrélée au volume du pain. De plus, d'autres composants de la farine, comme l'amidon, devraient également influencer la digestibilité des protéines du pain.

En nutrition humaine, la valeur des protéines dépend de leur composition en acides aminés et de leur digestibilité. L'amélioration de la digestibilité des protéines du blé pourrait réduire les réactions indésirables au gluten en évitant que des peptides à longue chaîne liés à la maladie coélique et aux allergies au blé n'atteignent la muqueuse intestinale. Cependant, le lien entre cette faible digestibilité des protéines et la SGNCA reste à prouver.

En conclusion, l'amélioration de la digestibilité des protéines du blé pourrait être un objectif pour l'avenir proche de la sélection du blé, car les protéines d'origine végétale sont nécessaires pour diversifier les apports en protéines et réduire la consommation de protéines d'origine animale, contribuant ainsi à diminuer l'impact environnemental de la production de protéines.

## Références bibliographiques

- Afzal, M., Pfannstiel, J., Zimmermann, J., Bischoff, S. C., Würschum, T., Longin, C. F. H. (2020). High-resolution proteomics reveals differences in the proteome of spelt and bread wheat flour representing targets for research on wheat sensitivities. *Scientific Reports*, 10(1), 14677. <https://doi.org/10/gjsfgb>
- Blanquet-Diot, S., Denis, S., Chalancon, S., Chaira, F., Cardot, J. M., Alric, M. (2012). Use of artificial digestive systems to investigate the biopharmaceutical factors influencing the survival of probiotic yeast during gastrointestinal transit in humans. *Pharm Res*, 29, 1444-1453. <https://doi.org/10/bmj4r4v>
- Bonnot, T., Bancel, E., Alvarez, D., Davanture, M., Boudet, J., Pailloux, M., Zivy, M., Ravel, C., Martre, P. (2017). Grain subproteome responses to nitrogen and sulfur supply in diploid wheat *Triticum monococcum* ssp. *Monococcum*. *The Plant Journal*, 91(5), 894-910. <https://doi.org/10/gbqcgz>
- Bos, C., Juillet, B., Fouillet, H., Turlan, L., Daré, S., Luengo, C., N'tounda, R., Benamouzig, R., Gausserès, N., Torné, D., Gaudichon, C. (2005). Postprandial metabolic utilization of wheat protein in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 87-94. <https://doi.org/10/gmxb5n>
- 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. <https://doi.org/10/c24s6f>
- Branlard, G., Faye, A., Rhazi, L., Tahir, A., Lesage, V., Aussenac, T. (2020). Genetic and Environmental Factors Associated to Glutenin Polymer Characteristics of Wheat. *Foods*, 9(5), 683. <https://doi.org/10/gjhdxb>
- Catassi, C. (2015). Gluten Sensitivity. *Annals of Nutrition Metabolism*, 67 Suppl 2, 16-26. <https://doi.org/10/f76knf>
- Dumas, J.B.A. (1831) *Procédes de l'analyse Organique*. *Annales de Chimie et de Physique (Annals of Chemistry and of Physics)*, 247, 198-213.
- Dupont, D., Alric, M., Blanquet-Diot, S., Bornhorst, G., Cueva, C., Deglaire, A., Denis, S., Ferrua, M., Havenaar, R., Lelieveld, J., Mackie, A. R., Marzorati, M., Menard, O., Minekus, M., Miralles, B., Recio, I., Abbeele, P. V. den. (2019). Can dynamic in vitro digestion systems mimic the physiological reality? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(10), 1546-1562. <https://doi.org/10/gkzcws>
- Dupont, F. M., Vensel, W. H., Tanaka, C. K., Hurkman, W. J., Altenbach, S. B. (2011). Deciphering the complexities of the wheat flour proteome using quantitative two-dimensional electrophoresis, three proteases and tandem mass spectrometry. *Proteome Science*, 9(1), 10. <https://doi.org/10/fp9zc6>
- Evenson, R. E., Gollin, D. (2003). Assessing the impact of the green revolution, 1960 to 2000. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5620), 758-762. <https://doi.org/10/b4vm67>
- Geisslitz, S., Shewry, P., Brouns, F., America, A. H. P., Cao, G. P. I., Daly, M., D'Amico, S., De Giorgio, R., Gilissen, L., Grausgruber, H., Huang, X., Jonkers, D., Keszthelyi, D., Larré, C., Masci, S., Mills, C., Møller, M. S., Sorrells, M. E., Svensson, B., ... Weegels, P. L. (2021). Wheat ATIs: Characteristics and Role in Human Disease. *Frontiers in Nutrition*, 8, 667370. <https://doi.org/10/gmxb4t>
- Gilani, G., Cockell, K., Sepehr, E. (2005). Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acid availability in foods. *Journal of AOAC International*. <https://doi.org/10/gjvg4x>
- Gulati, P., Brahma, S., Graybosch, R. A., Chen, Y., Rose, D. J. (2020). In vitro digestibility of proteins from historical and modern wheat cultivars. In *Journal of the Science of Food and Agriculture (Vol. 100, Issue 6, pp. 2579-2584)*. WILEY. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10283>
- Johansson, E., Malik, A. H., Hussain, A., Rasheed, F., Newson, W. R., Plivelic, T., Hedenqvist, M. S., 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(4), 367-376. <https://doi.org/10/f22djp>
- Joye, I. (2019). Protein digestibility of cereal products. *Foods*, 8, 199. <https://doi.org/10.3390/foods8060199>
- Lamacchia, C., Camarca, A., Picascia, S., Di Luccia, A. (2014). Cereal-Based Gluten-Free Food: How to Reconcile Nutritional and Technological Properties of Wheat Proteins with Safety for Celiac Disease Patients. *Nutrients*, 6, 575-590. <https://doi.org/10/gchn5v>
- Liu, S. (2021). Studies on milling and baking quality and in-vitro protein digestibility of historical and modern wheats. University of Nebraska - Lincoln.
- Ma, F., Baik, B.-K. (2021). Influences of grain and protein characteristics on in vitro protein digestibility of modern and ancient wheat species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(11), 4578-4584. <https://doi.org/10/gmh29h>
- Malalgoda, M., Meinhardt, S. W., Simsek, S. (2018). Detection and quantitation of immunogenic epitopes related to celiac disease in historical and modern hard red spring wheat cultivars. *Food Chemistry*, 264, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.131>
- Morel, M.-H., Pincemaille, J., Chauveau, E., Louhichi, A., Violleau, F., Menut, P., Ramos, L., Banc, A. (2020). Insight into gluten structure in a mild chaotropic solvent by asymmetrical flow field-flow fractionation (AsFIFFF) and evidence of non-covalent assemblies between glutenin and  $\omega$ -gliadin. *Food Hydrocolloids*, 103, 105676. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105676>



Oury, F. X., Bérard, P., Brancourt-Hulmel, M., Depatureaux, C., Doussinault, G., Galic, N., Giraud, A., Heumez, E., Lecomte, C., Pluchard, P., Rolland, B., Rousset, M., Trottet, M. (2003). Yield and grain protein concentration in bread wheat: A review and a study of multi-annual data from a French breeding program. *Journal of Genetics and Breeding*, 57(1), 59–68. Scopus.

Payne, P. I., Lawrence, G. J. (1983). Catalogue of alleles for the complex gene loci, Glu-A1, Glu-B1, and Glu-D1 which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Research Communications*, 11(1), 29–35.

Plessis, A. A., Grand Ravel, C. C., Bordes, J. J., Balfourier, F., Martres, P. P. (2013). Association study of wheat grain protein composition reveals that gliadin and glutenin composition are trans-regulated by different chromosome regions. *Journal of Experimental Botany*, 64(12), 3627–3644. <https://doi.org/10/f474s5>

Prandi, B., Tedeschi, T., Folloni, S., Galaverna, G., Sforza, S. (2017). Peptides from gluten digestion: A comparison between old and modern wheat varieties. *Food Research International*, 91, 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.034>

Pronin, D., Boerner, A., Scherf, K. A. (2021). Old and modern wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars and their potential to elicit celiac disease. *Food Chemistry*, 339, 127952. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127952>

Ribeiro, M., Rodriguez-Quijano, M., Nunes, F. M., Carrillo, J. M., Branlard, G., Igrejas, G. (2016). New insights into wheat toxicity: Breeding did not seem to contribute to a prevalence of potential celiac disease's immunostimulatory epitopes. *Food Chemistry*, 213, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.043>

Rieder, A., Kristian Afseth, N., Böcker, U., Halvor Knutsen, S., Kirkhus, B., Mæhre, H. K., Ballance, S., Gizachew Wubshet, S. (2021). Improved estimation of in vitro protein digestibility of different foods using size exclusion chromatography. *Food Chemistry*, 129830. <https://doi.org/10/gjsr3j>

Sapone, A., Bai, J. C., Ciacci, C., Dolinsek, J., Green, P. H., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Rostami, K., Sanders, D.

S., Schumann, M., Ullrich, R., Villalta, D., Volta, U., Catassi, C., Fasano, A. (2012). Spectrum of gluten-related disorders: Consensus on new nomenclature and classification. *BMC Medicine*, 10(1), 13. <https://doi.org/10/gb33h2>

Sokal, R.R. and Michener, C.D. (1958) *A Statistical Methods for Evaluating Relationships*. University of Kansas Science Bulletin, 38, 1409-1448.

Scherf, K. A., Koehler, P., Wieser, H. (2016). Gluten and wheat sensitivities – An overview. *Journal of Cereal Science*, 67, 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.07.008>

Seilmeier, W., Belitz, H.-D., Wieser, H. (1991). Separation and quantitative determination of high-molecular-weight subunits of glutenin from different wheat varieties and genetic variants of the variety Sicco. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung*, 192(2), 124–129. <https://doi.org/10/b3p8fb>

Shewry, P., Hey, S. (2015). The contribution of wheat to human diet and health. *Food and Energy Security*, 4. <https://doi.org/10.1002/fes3.64>

Shewry, P. R. (2018). Do ancient types of wheat have health benefits compared with modern bread wheat? *Journal of Cereal Science*, 79, 469–476. <https://doi.org/10/gc5c4g>

Van den Broeck, H. C., de Jong, H. C., Salentijn, E. M. J., Dekking, L., Bosch, D., Hamer, R. J., Gilissen, L. J. W. J., van der Meer, I. M., Smulders, M. J. M. (2010). Presence of celiac disease epitopes in modern and old hexaploid wheat varieties: Wheat breeding may have contributed to increased prevalence of celiac disease. *Theoretical and Applied Genetics*, 121(8), 1527–1539. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1408-4>

Yu, Z., She, M., Zheng, T., Diepeveen, D., Islam, S., Zhao, Y., Zhang, Y., Tang, G., Zhang, Y., Zhang, J., Blanchard, C. L., Ma, W. (2021). Impact and mechanism of sulphur-deficiency on modern wheat farming nitrogen-related sustainability and gliadin content. *Communications Biology*, 4(1), 1–16. <https://doi.org/10/gmgmbq>

Zevallos, V. F., Raker, V., Tenzer, S., Jimenez-Calvente, C., Ashfaq-Khan, M., Rüssel, N., Pickert, G., Schild, H., Steinbrink, K., Schuppan, D. (2017). Nutritional Wheat Amylase-Trypsin Inhibitors Promote Intestinal Inflammation via Activation of Myeloid Cells. *Gastroenterology*, 152(5), 1100–1113.e12. <https://doi.org/10/f9zwg9>

# GlutNsafe : « Vers la sélection de variétés de blés au gluten plus digestible ? »

E Bancel<sup>1</sup>, M Lavoignat<sup>1,2</sup>, M Alric<sup>3</sup>, S Bagnon<sup>4</sup>, M Benigna<sup>4</sup>, S Denis<sup>5</sup>, A Chassin<sup>1</sup>, A Faye<sup>1</sup>, M Hebraud<sup>3</sup>, E Heumez<sup>5</sup>, PY Dymarski<sup>6</sup>, L Halupka<sup>6</sup>, G Pages<sup>7</sup>, C. Chambon<sup>7</sup>, T. Sayd<sup>7</sup>, S Perrochon<sup>1</sup>, MF Samson<sup>8</sup>, L Rhazi<sup>9</sup>, MC Leroux<sup>10</sup>, B Valluis<sup>10</sup>, P Giraudeau<sup>11</sup>, S Denery<sup>12</sup>, C Larré<sup>12</sup>, C Brossard<sup>12</sup>, C Ravel<sup>1\*</sup>

1- INRAE- UCA UMR GDEC ; 2-AgroParisTech ; 3-INRAE- UCA ; UMR MEDIS ; 4- Qualtech ; 5- UE GCIE, Estrées-Mons ; 6- CereLab ; 7- INRAE UR QuaPA ; 8- Université de Montpellier-SupAgro-INRAECIRAD UMR IATE ; 9- UniLaSalle ; 10- ANMF ; 11- Secobra ; 12-INRAE-BIA ; \* email address: catherine.ravel@inra.fr

Le blé est un **contributeur** majeur à l'alimentation humaine grâce à divers produits transformés, très consommés. **Les transformations sont possibles grâce au réseau de gluten.**

Le **gluten** est un réseau constitué par les protéines de réserve du grain de blé, les **gliadines** et les **gluténines**, qui se forme après pétrissage de farine et d'eau.

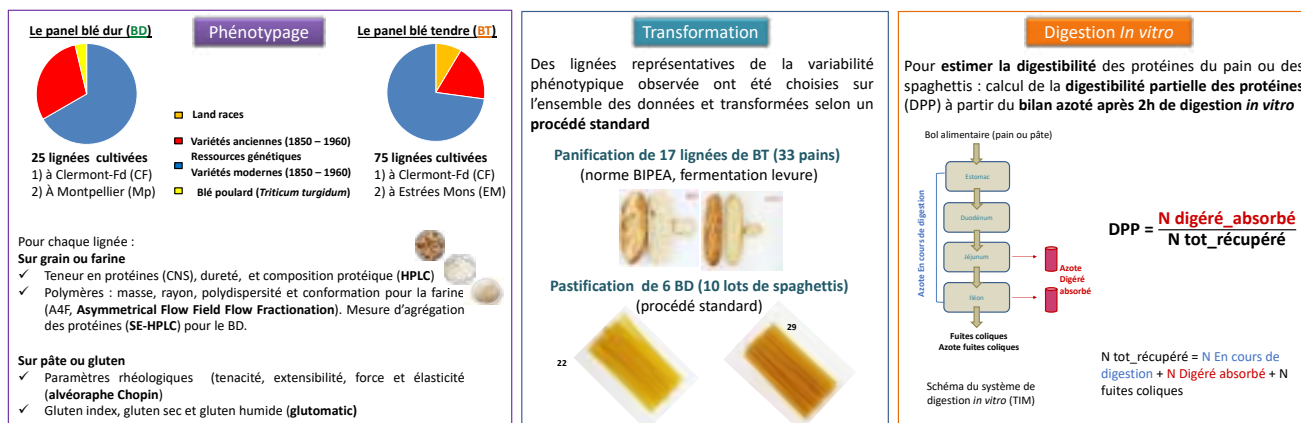


Le **gluten** confère à la pâte des **propriétés de visco-élasticité** uniques qui rendent possible sa transformation



Mais le gluten peut entraîner :  
- Allergie (0,5-1% de la population),  
- Maladie cœliaque (0,5-1,5%),  
- Sensibilité non cœliaque au gluten (3%)

## MATERIEL ET METHODES : De la fourche à l'assiette

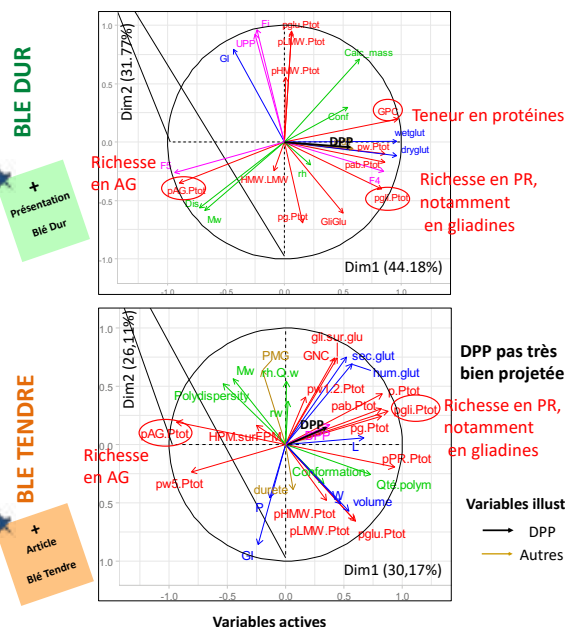


## PEUT-ON EXPLIQUER LA DIGESTIBILITE PARTIELLE DES PROTEINES A PARTIR DES VARIABLES MESUREES?

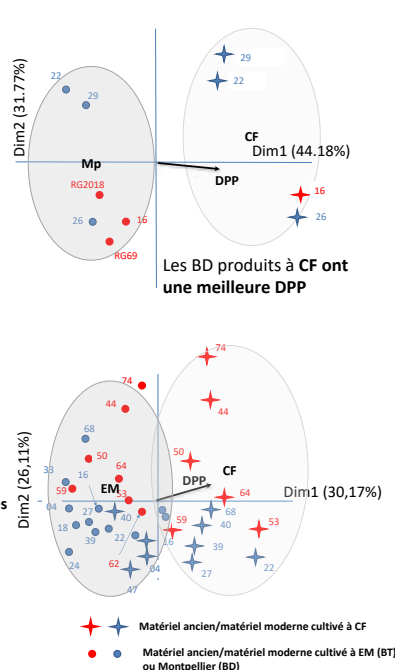
Etude des relations entre données phénotypiques et digestibilité :  
Analyse Factorielle Multiple sur l'ensemble des données réduites par espèce

### PRINCIPAUX RESULTATS

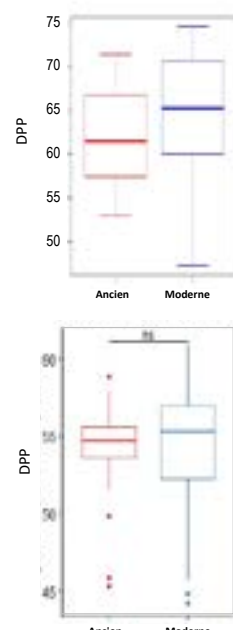
#### 1. Des variables phénotypiques liées à la DPP



#### 2. Une structuration par lieu



#### 3. La DPP ne dépend pas du groupe d'âge des cultivars



### PARTENARIAT



### CONCLUSION

Ces résultats montrent une **variation** entre les variétés pour la **digestibilité partielle des protéines** du pain et des pâtes, élaborés avec un procédé standard, après 2h de digestion (DPP). La DPP dépend du lieu de culture qui joue sur la composition protéique. La mise en relation des données phénotypiques et de la DPP montre chez les deux espèces qu'une **forte proportion d'albumines-globulines (AG) dans les protéines totales conduit à une moins bonne DPP à 2h de digestion** contrairement à une forte proportion de protéines de réserve (dans les protéines totales). Chez le BT, il n'a pas été mis en évidence de relation négative entre protéolyse et caractéristiques des polymères protéiques.

Attention aux **2 limites** de l'étude : la projection de la DPP dans le cercle des corrélations chez le BT n'est pas bonne. On dispose de peu de lignées chez le BD.

# JNOrge : De nouvelles résistances/tolérances contre la jaunisse nanisante chez l'orge : caractérisation et impacts épidémiologiques

Emmanuel JACQUOT<sup>1</sup>, Isabelle ABT<sup>1</sup>, Vincent PLAT<sup>1</sup>, Adeline PINAULT<sup>1</sup>, Marlène SOUQUET<sup>1</sup>, Isabelle CHAILLET<sup>2</sup>, Nathalie ROBIN<sup>2</sup>, Romain VALADE<sup>2</sup>, Cindy VITRY<sup>2</sup>, Thomas BALDWIN<sup>3</sup>, Louis-Marin BOSSUET<sup>3</sup>, Valérie CADOT<sup>3</sup>, Valérie LAURENT<sup>4</sup>, Lieven DEVLIES<sup>5</sup>, Amélie GENTY<sup>6\*</sup>

1 - PHIM, INRAE, CIRAD, Institut Agro, Univ Montpellier, Cirad TA A-54/K, Campus international de Baillarguet, 34398, Montpellier, PARIS

2 - ARVALIS Institut du végétal, 3 rue Joseph et Marie Hackin, 75016 Paris

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

4 - Florimond Desprez Veuve et Fils, BP 41, 59242 Cappelle en Pévèle

5 - Limagrain Europe, CS 50005 St Beauzire, 63360 Gerzat

6 - SECOBRA Recherches, Centre de Bois-Henry, 78580 Maule

\*Coordinateur : Amélie GENTY, amelie.genty@secobra.com

## 1 Introduction

La jaunisse nanisante de l'orge (JNO) est une maladie virale majeure pour la culture des céréales et principalement des orges d'hiver.

Décrite pour la première fois en 1951 en Californie (D'Arcy and Burnett, 1995), cette maladie peut être causée par différentes espèces virales qui sont elles-mêmes transmises par différentes espèces de pucerons, la plus fréquente étant *Rhopalosiphum Padi*.

Les pertes de rendement liées à la JNO peuvent être conséquentes en allant jusqu'à 80 % de la récolte.

Jusqu'en 2018, la très grande majorité des semences d'orges d'hiver semées en France étaient traitées avec un insecticide de la famille des néonicotinoïdes, ce qui permettait de protéger la plante pendant plusieurs semaines après les semis.

Les conditions hivernales n'étant ensuite plus propices au développement des pucerons, la maladie était très peu présente sur nos 1.3 millions d'ha d'orges d'hiver.

L'arrêt de l'utilisation des néonicotinoïdes en 2018 en traitement de semences a remis cette maladie sur le devant de la scène.

Les agriculteurs, pour limiter les risques de contaminations, ont pu adapter leurs itinéraires techniques, par exemple en retardant la date de semis. Néanmoins, cela n'étant pas suffisant dans la quasi-totalité des cas, ils doivent intervenir par des traitements insecticides en cours de végétation. En effet, les automnes doux permettent aux pucerons de se développer pendant une période beaucoup plus longue, voire même jusqu'au début de l'hiver.

Les enjeux écologiques actuels étant de réduire au maximum l'utilisation des produits phytosanitaires, les chercheurs et les sélectionneurs se sont efforcés de rechercher des solutions génétiques pour lutter contre la JNO.

Une très grande diversité de matériel génétique, d'origines géographiques variées, a donc été testée par les sélectionneurs pour rechercher des résistances/tolérances à cette maladie.

La résistance se caractérise par la capacité de la plante à limiter l'infection alors que la tolérance se caractérise par la capacité de la plante à limiter les effets de l'infection. La résistance peut être totale si elle conduit à absence de charge virale dans la plante ou partielle si elle permet seulement de réduire cette charge virale.

Quatre gènes ont pu être identifiés : *Ryd1* (Suneson, 1955), *Ryd2* (Schaller, 1963, Schaller et Chim, 1969), *Ryd3* (Niks et al., 2004) et beaucoup plus récemment *Ryd4* (Scholz et al., 2009).

*Ryd1* a rapidement été abandonné car son niveau de tolérance/résistance n'était pas suffisant. Les efforts des sélectionneurs se sont alors concentrés sur *Ryd2*. Ainsi, la quasi-totalité des variétés actuelles tolérantes à la JNO sont porteuses de *Ryd2*.

Dans un souci de durabilité de cette tolérance / résistance, des travaux ont été menés pour introgresser le gène *Ryd3*, mais aussi pour pyramider *Ryd2* et *Ryd3*. La découverte de *Ryd4* étant plus récente, les travaux d'introgression sont toujours en cours et aucune lignée d'intérêt n'est encore disponible.

Très peu d'études ayant été réalisées pour caractériser ces gènes, le projet JNOrge a été mis en place afin de mieux caractériser les efficacités et les spécificités des gènes *Ryd2*, *Ryd3* et du pyramidage de *Ryd2* et *Ryd3* face à la JNO.

La caractérisation des génotypes étudiés a été réalisée dans deux conditions : au champ face à des infestations naturelles, et en laboratoire sur plantules avec des inoculations contrôlées par application de pucerons porteurs de l'espèce virale BYDV-PAV de la JNO.

## 2 Matériel et méthode

Différents génotypes d'orge d'hiver, 6 rangs ou 2 rangs, contenant les gènes *Ryd2* et/ou *Ryd3*, caractérisés en marquage par les sélectionneurs qui les ont proposés, ont été évalués lors de cette étude, au champ et/ou en conditions contrôlées, en comparaison à 3 références (Tableau Ch1).





	Genotypes	nb tangs	Champ 2017	Champ 2018	Champ 2019	Laboratoire
Ref.	<b>ETINCEL</b>	6	x	x	x	x
Ref.	<b>KWS Cassia</b>	2	x	x	x	x
Ryd2 Ref.	<b>AMISTAR</b>	6	x	x	x	x
<b>Ryd2</b>	FD1601	6	x	x	x	x
<b>Ryd2</b>	FD1602	6	x	x	x	x
<b>Ryd2</b>	RAFAELA	6	x	x	x	x
<b>Ryd2</b>	SC1601	6	x	x	x	x
<b>Ryd2</b>	W983	6	x	x	x	x
<b>Ryd2</b>	SC1602	2	x	x	x	x
<b>Ryd3</b>	D14497-26	6	(x)		x	x
<b>Ryd3</b>	D14497-7	6	(x)			x
<b>Ryd3</b>	FD1603	2			x	
<b>Ryd3</b>	FD1604	2	(x)	(x)	x	
<b>Ryd3</b>	SC1603	2	(x)	(x)	x	x
<b>Ryd3</b>	SC1604	2			x	x
<b>Ryd2+Ryd3</b>	W115019	6		(x)	(x)	x
<b>Ryd2+Ryd3</b>	D14498	6		(x)	(x)	x
<b>Ryd2+Ryd3</b>	SC1605	2			(x)	
<b>Ryd2+Ryd3</b>	VAR 6					x

x : génotype étudié, volet champ : sur les différents sites  
(x) : génotype étudié, volet champ : absent sur un des sites.

**Tableau Ch1** : Caractéristiques des génotypes étudiés et répartition dans les différentes actions.

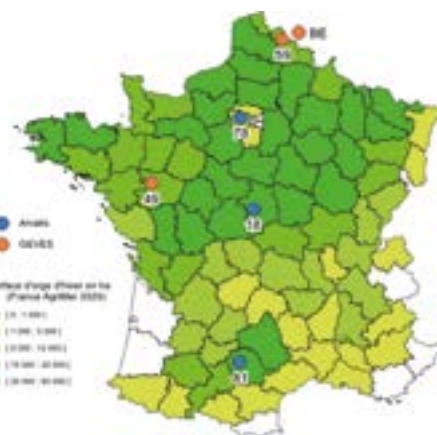
## ► Volet CHAMP

Des essais ont été mis en place au champ (Fig. Ch1) pour évaluer les génotypes lors de 3 années. Les essais ont été semés volontairement à une date précoce, 2 à 3 semaines avant la date recommandée en parcelles agricoles, afin de favoriser les infestations naturelles par des pucerons vecteurs de la JNO. Tous les génotypes d'un même essai ont été semés à la même densité.

En année 1, du fait d'une faible quantité de semences disponibles, 5 essais ont été implantés avec des microparcelles de type pépinière sur 1 seule répétition dans 4 essais, et 3 répétitions dans le cinquième essai. Ces essais ont été conduits sans protection insecticide vis-à-vis des pucerons vecteurs de la JNO pour des observations et analyses de l'état sanitaire des plantes.

En années 2 et 3, six essais par an ont été semés en microparcelles permettant une mesure du rendement, avec ou sans protection contre la JNO. Le dispositif retenu est un dispositif factoriel en bloc, avec 2 à 3 répétitions selon les sites, qui croise le facteur protection insecticide (2 modalités : avec ou sans) au facteur génotype (les génotypes étudiés et 3 variétés de référence). La protection insecticide a été appliquée sur semences (imidaclopride) en année 2, et en végétation (pyréthrinoides) en année 3 pour s'adapter à l'évolution de la réglementation qui venait d'interdire l'utilisation des néonicotinoïdes en traitement de semences.

Les contrôles ont porté sur l'état sanitaire des plantes (observations et analyses), le rendement et des caractéristiques des grains récoltés : taux de protéines (en % MS), PMG (Poids de 1000 grains), PS (Poids Spécifique) et calibrage (% > 2.5 mm).



**Figure Ch1** : Localisation des sites d'essais en France et Belgique, et affectation des analyses de détection virale entre laboratoires.

## Analyses sanitaires

Pour chaque type génétique présent au champ, de 2017 à 2019 (Tableau Ch1), 175 feuilles ont été prélevées au moment de la reprise de la végétation. Cinq lots de 15 feuilles ont été analysés par site et par génotype et répartis entre deux laboratoires (GEVES et Arvalis) qui ont analysé chacun 3 sites (sites 81, 78 et 18 pour le laboratoire d'Arvalis, sites 49, 59 et site de Tiegem (Belgique) pour le laboratoire du GEVES).

Les lots de 15 feuilles ont été soumis à l'extraction d'ARN et ensuite les amorces de Deb *et al.* (2008) ont été utilisées pour rechercher la présence de différentes espèces virales de la JNO (PAV, MAV, SGV, RPV et - pour certains échantillons - RMV) dans les extraits d'ARN par RT-PCR point final et gel électrophorèse.

Des échantillons, hors essais variétaux, ont également été prélevés dans différentes localisations sur la variété d'orge d'hiver sensible Etincel à la fin de l'automne et à la reprise de végétation, suite à un appel à prélèvement lancés auprès des interlocuteurs des différents acteurs du projet. Cette action avait vocation à compléter les informations sur la prévalence des espèces virales de la JNO en France et leur répartition.

## ► Volet LABORATOIRE

### Plantes, insectes et virus

Treize génotypes d'orge, fournis par les 3 obtenteurs membres du projet, porteurs du gène *Ryd2* (SC1601, SC1602, Rafaela, W983, FD1601 et FD1602), du gène *Ryd3* (SC1603, SC1604, D14497-7 et D14497-26) ou des gènes *Ryd2* et *Ryd3* (D14498, VAR6 et W115019) ont été utilisés pour évaluer le niveau de sensibilité/résistance de ce matériel à la jaunisse nanisante de l'orge. Trois variétés de référence (Amistar (*Ryd2*), KWS Cassia et Etincel) ont été ajoutées à cette gamme de génotypes.

Le clone *Rhopalosiphum padi* RplA (collecté dans le département de l'Yonne en 2012) a été utilisé pour réaliser les transmissions virales. Un élevage de RplA est maintenu en chambre de culture (jour/nuit : 16h/8h, 25°C/20°C, RH : 40 %) dans une mini-cage en plexiglass en présence de plantes saines d'orge cv. Etincel.

L'isolat PAV4 du virus de la jaunisse nanisante de l'orge (BYDV-PAV4 ; Chain *et al.*, 2007), utilisé dans les

expériences, a été maintenu sur orge (cv. Etincel) en présence de pucerons (RplA).

### Production du matériel végétal pour les expérimentations

L'orge a été semé sur substrat neutre (vermiculite) dans des tubes en plastique (2 cm de diamètre et 8 cm de long). Après semis, les plantes ont été maintenues en chambre de culture (24°C/20°C, jour/nuit : 16h/8h) pendant au moins 8 jours avant d'être utilisées dans les expérimentations.

### Evaluation du taux d'infection

Des plantes âgées de 8 jours (stade 2 feuilles) ont été utilisées pour évaluer la sensibilité des différents génotypes d'orge à la JNO. À l'aide d'un pinceau, 2 pucerons virulifères de stade L2/L4 ont été déposés sur l'extrémité d'une feuille de chacune des plantes du dispositif. L'extrémité de la feuille et le puceron ont été insérés dans un système de confinement (micro-tube en plastique) fermé par la pose d'un morceau de coton à l'extrémité du tube. À la fin de la période d'inoculation (IAP= 2h), les pucerons virulifères ont été retirés manuellement, les plantes ont été traitées à l'aide d'un insecticide (Pirimor® 0.1 % v/v, Syngenta®, Bâle, Suisse) et transférées en chambre de culture pour une période de 3 semaines. À la fin de cette période, les plantes ont été échantillonnées et leur statut sanitaire évalué par diagnostic sérologique (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA)). L'ensemble du dispositif expérimental a été répliqué au moins 4 fois en utilisant des lots de 9 à 20 plantes par génotype et par répétition (Table 1).

### Dynamique d'accumulation virale

Après avoir inoculé (5 pucerons/plante, IAP=24h) 40 plantes des génotypes SC1601, D14497-26, W115019, Rafaela, SC1604, FD1601, D14498 et W983, et 160 plantes du génotype de référence cv. Etincel, les plantes inoculées sont placées en serre sous confinement insect-proof. Dix plantes de chaque génotype à tester et 10 plantes du génotype de référence ont été aléatoirement prélevées au 7<sup>ème</sup>, 10<sup>ème</sup>, 14<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jour après inoculation. Les parties aériennes (feuilles) de ces plantes ont été prélevées et broyées. Le jus brut produit par chaque plante a été analysé individuellement par test ELISA de manière à définir le statut sanitaire de chaque plante du dispositif expérimental. Trois répétitions indépendantes du dispositif ont été réalisées.

### Impact de l'âge de la plante

Pour les génotypes Etincel, SC1601, D14497-26, W115019, Rafaela, SC1604, FD1601, D14498 et W983, des lots de 15 plantes âgées de 10, 24 et 38 jours ont été inoculées (2 pucerons/plante, IAP=4h40). Après retrait des vecteurs en fin de période IAP, les plantes ont été maintenues en serre pendant 21 jours. Les parties aériennes des plantes ont été prélevées et broyées. Le jus brut produit par chaque plante a été analysé par test ELISA. Quatre répétitions indépendantes du dispositif ont été réalisées.

### Estimation de la durée de latence

Des plantes (n = 40 par génotype) d'orge (Etincel, SC1601, D14497-26, W115019, Rafaela, SC1604, FD1601, D14498 et W983) âgées de 8 jours ont été inoculées (5 pucerons/plante, IAP = 72h). À la fin de cette période d'inoculation, les pucerons ont été retirés manuellement. À 4 dates après inoculation (7, 14, 21 et 28 jours), des pucerons RplA sains de stade L<sub>1</sub>/L<sub>4</sub>

ont été confinés pendant 48h (période d'acquisition = AAP) sous des sachets en plastique sur 5 plantes précédemment inoculées. Ces plantes ont été qualifiées de plantes 'sources' pour le dispositif expérimental. À la fin de l'AAP, les pucerons issus de chacune de ces plantes 'sources' ont été transférés sur 10 plantes d'orge cv. Etincel saines âgées de 8 jours (2 pucerons/plante). Ces plantes ont été qualifiées de plantes 'tests' pour le dispositif expérimental. Les plantes 'tests' ont été confinées en présence des pucerons vecteurs sous des sachets en plastique pour une IAP de 96h avant d'être traitées au Pirimor® (0,1 % v/v). L'ensemble des plantes 'tests' et les plantes 'sources' a été maintenu en chambre de culture pendant 3 semaines après inoculation. Puis leur statut sanitaire a été testé par ELISA.

### Caractérisation du statut sanitaire des échantillons

Les plantes (ensemble des feuilles d'une plantule d'orge) échantillonnées pour la réalisation de diagnostics ELISA (Clark et Adams, 1977) ont été broyées individuellement à l'aide d'une presse Pöhlhane (MEKU®, Wennigsen, Allemagne). Ce broyage a été réalisé en présence de 400 µL de tampon de broyage (PBST (137 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12H<sub>2</sub>O, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05 % (v/v) Tween 20), 2 % (w/v) polyvinylpyrrolidone 40T). Pour le test ELISA, les puits d'une plaque de microtitration (NUNC, Maxisorp) ont été incubés à 37°C pendant 3h présence d'anticorps polyclonaux anti-BYDV (PAV52, H. Lapierre, INRAE) préalablement dilués (1/1000 (v/v)) dans du tampon carbonate (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH = 9,6). Entre chaque étape, les plaques ont été lavées 3 fois avec du tampon PBST. Cent µl de jus brut ont été déposés dans les puits et incubés une nuit à 4°C. Un anticorps couplé à la phosphatase alcaline dilué (1/1000 (v/v)) dans du tampon conjugué (tampon PBST, 2 % (w/v) d'ovalbumine) a été déposé et incubé 3h à 37°C. Après un dernier lavage, 100 µL de diéthanolamine (1N, pH = 9,8) contenant du p-nitrophenylphosphate (1 mg/mL) ont été déposés dans les puits de la plaque. Après incubation à température ambiante et à l'obscurité pendant 2h, les densités optiques ont été mesurées à 405 nm (DO<sub>405</sub>) à l'aide d'un spectrophotomètre (Multiskan™ FC ; Thermo Scientific™). Le seuil de positivité du test a été fixé à deux fois la valeur de DO<sub>405</sub> des témoins sains avec une valeur minimale de DO<sub>405</sub> = 0,1. Des gammes de dilution en série ont été réalisées à partir d'une fraction enrichie en BYDV-PAV4. Les fractions diluées obtenues ont été utilisées lors des analyses sérologiques, conjointement aux échantillons à tester, de manière à pouvoir comparer les charges virales des échantillons. À partir des valeurs de densité optique (DO<sub>405nm</sub>) obtenues, le taux de plantes infectées et la charge virale des plantes infectées peuvent être calculés pour chaque génotype et à chacune des modalités appliquées (e.g. cinétique d'accumulation et âge de la plante à l'inoculation). Les données ainsi générées peuvent être utilisées pour calculer les AUPPC (aires sous la courbe de progression de l'agent pathogène) pour les cinétiques d'infection.

### Analyses statistiques

Les données brutes ont été analysées à l'aide du logiciel R (R Core Team, 2020) via des tests de Kruskal-Wallis (charge virale) et des modèles linéaires généralisés (taux d'infection et fitness des pucerons).

### 3 Résultats de caractérisation des géotypes au champ

#### Analyses sanitaires des plantes au champ

Les analyses réalisées sur les échantillons prélevés dans les essais au champ ont permis d'établir la prévalence des différentes espèces virales en fonction des sites et des années (tableau Ch2). Les résultats RT-PCR sur les lots de feuilles, qui sont qualitatifs (présence/absence), n'ont pas permis d'identifier des différences significatives entre les géotypes. On peut constater la présence majoritaire des espèces virales BYDV-PAV et BYDV-MAV dans les échantillons de tous les sites, et de façon répétée pendant les 3 années du projet. Ces données ont montré également la présence de BYDV-SGV – ainsi que celle de RMV dans les prélèvements où il a été recherché – et celle de BYDV-RPV. Le projet a également permis de démontrer, par des analyses bioinformatiques et des expérimentations, que les amorces « MAV » utilisées (Deb *et al*, 2008) n'étaient pas complètement spécifiques. Ainsi, la fréquence de BYDV-MAV est probablement surestimée, en lien avec un manque de spécificité des amorces MAV vis-à-vis du PAV.

		78	18	81	49	59	BE
2017	PAV	96%	33%	85%	ND	53%	90%
	MAV	98%	100%	100%	ND	81%	98%
	RPV	0%	4%	6%	ND	0%	2%
	RMV	15%	28%	28%	ND	ND	ND
	SGV	20%	27%	75%	ND	ND	ND
2018	PAV	85%	83%	62%	55%	96%	72%
	MAV	98%	100%	98%	83%	100%	86%
	RPV	2%	3%	5%	55%	96%	3%
	SGV	69%	66%	74%	57%	56%	38%
2019	PAV	78%	ND	41%	ND	47%	59%
	MAV	100%	ND	92%	ND	77%	88%
	RPV	4%	ND	0%	ND	9%	33%
	SGV	33%	ND	86%	ND	30%	68%

**Tableau Ch2** : Fréquence de détection d'espèces virales, par année et site (moyenne des géotypes présents)  
ND : non déterminé par absence de prélèvements et/ou d'analyses.

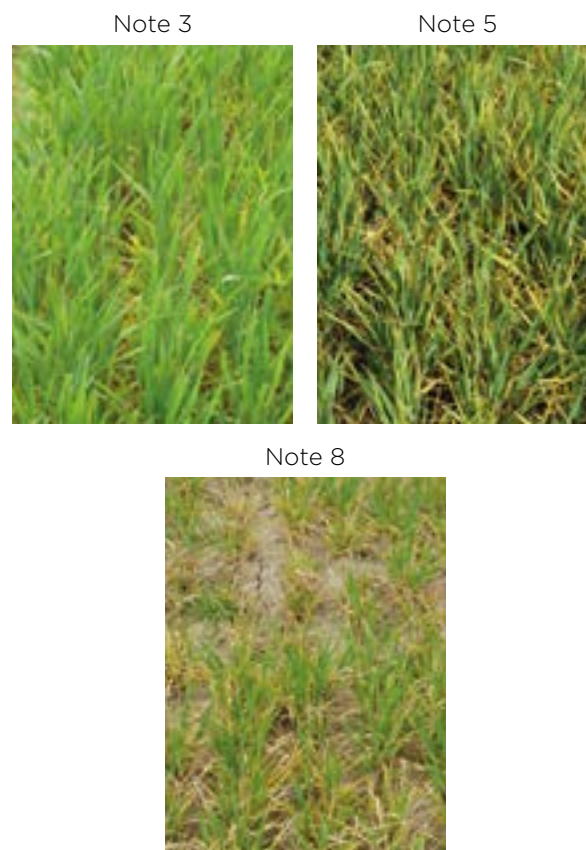
#### Expression des symptômes au champ

Les différents géotypes ont fait l'objet de notations de symptômes en s'appuyant sur la grille élaborée dans le cadre de ce projet. L'échelle de notation est sur 9 points, avec un gradient de décoloration et de nanisme (figure Ch2), allant de l'absence de tout symptôme (note 1) jusqu'à la disparition des plantes (note 9).

Les premiers symptômes, et les premières différences entre les géotypes, ont pu apparaître dès février (cf. photographie ci-après) mais les comparaisons entre ceux-ci ont porté sur la dernière notation effectuée sur chaque lieu.

Les moyennes ajustées, obtenues pour chaque lignée après compilation des notes finales obtenues sur les différents essais (Tableau Ch3), témoignent d'un écart important entre d'une part les variétés sensibles (2 références) et d'autre part, les différents géotypes

contenant *Ryd2* et/ou *Ryd3*. L'intensité des symptômes varie selon les parcelles d'essai (année, site), mais les géotypes *Ryd* étudiés ont toujours exprimé de faibles symptômes, avec essentiellement des décolorations de bout de feuille. Les écarts (faibles) entre les géotypes étudiés sont sans doute davantage à relier aux différences entre les fonds génétiques qu'au type de gène *Ryd2* et/ou *Ryd3*. Ainsi, si les lignées *Ryd2* + *Ryd3* de l'étude se comportent bien, certaines lignées *Ryd2* affichent des symptômes tout aussi faibles.



**Figure Ch2** : Illustration de trois notes de la grille



#### Perte de rendement liée à la JNO

Les essais implantés au champ en microparcelles (années 2 et 3), pour une mesure de l'impact de la JNO sur le rendement, n'ont pas tous subi d'infestation significative par des pucerons et/ou n'ont pas tous permis une présence significative de la seule infection



virale recherchée. De ce fait, certains essais ont été retirés des analyses et ne sont donc pas présentés.

		Moyenne ajustée	Ecart-type	Nbre essais
Sensible	Etincel	6.4	1.5	14
Sensible	KWS Cassia	4.9	1.4	14
	Amistar	1.6	0.6	14
	Rafaella	1.4	0.4	14
	W 983	1.5	0.5	14
Ryd2	SC1601	1.8	0.6	14
	SC1602	1.7	0.4	14
	FD1601	1.8	0.6	14
	FD1602	1.9	0.4	14
	D14497-26	1.7	0.6	8
	SC1603	2.4	0.5	12
Ryd3	SC1604	2.4	0.7	12
	FD1603	2.4	0.7	5
	FD1604	2.5	0.7	5
	D14497-7	3.2	0.7	3
Ryd2	SC1605	1.4	0.4	4
+	D14498	1.4	0.5	8
Ryd3	W115019	1.5	0.6	8

**Tableau Ch3 :** Synthèse des notations sur 3 ans (2017, 2018, 2019) : note globale (1-9)

Les résultats, sur les 5 essais de 2018 et les 3 essais de 2019 validés, témoignent de la forte nuisibilité de l'infection virale sur les variétés sensibles, et de son importante hétérogénéité selon les sites et années. Les pertes de rendement varient de 25 à 75 % pour la référence Etincel (6 rangs) et de 26 à 60 % pour KWS Cassia (2 rangs). La variété tolérante de référence Amistar (6 rangs) présente des pertes très faibles mais pouvant aller jusqu'à 18 % (tableau Ch4).

2018	ETINCEL			KWS Cassia			AMISTAR		
	Traité	Non-traité	% perte	Traité	Non-traité	% perte	Traité	Non-traité	% perte
GAILLAC (81)	80	54	32	76	57	26	87	83	5
LA POUEZE (49)	68	48	29	58	34	42	71	59	17
CAPPELLE (59)	71	17	76	42	28	34	82	80	2
MAULE (78)	85	37	56	74	41	44	87	84	4
TIEGEM (BE)	89	67	25	78	48	38	96	97	0

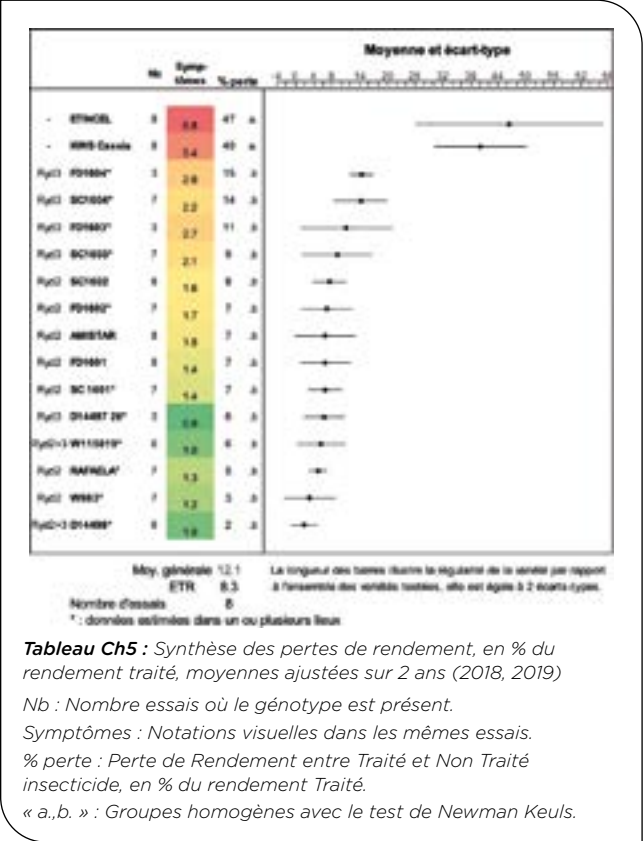
  

2019	ETINCEL			KWS Cassia			AMISTAR		
	Traité	Non-traité	% perte	Traité	Non-traité	% perte	Traité	Non-traité	% perte
CAPPELLE (59)	103	31	70	88	35	60	101	100	0
MONTANS (81)	104	77	27	89	62	31	103	84	18
TIEGEM (BE)	124	53	58	80	42	48	104	94	9

**Tableau Ch4 :** Rendement (q/ha) par essai des 3 variétés de référence, avec ou sans protection insecticide, et perte de rendement en % du rendement traité.  
Traité = Rendement avec protection insecticide  
Non Traité = Rendement en l'absence de protection insecticide

Les moyennes ajustées du taux de perte de rendement des différents génotypes sont présentées dans le tableau Ch5, avec en regard les notations de symptômes obtenues sur ces mêmes essais. Les génotypes disponibles entre les années du projet ayant pu varier (en lien avec la disponibilité des semences) et les essais n'ayant pas toujours pu être validés pour l'objectif fixé, les résultats s'appuient sur un effectif différent d'un génotype à l'autre.

Les résultats témoignent d'une bonne relation entre les notations visuelles des symptômes selon la grille établie et le taux de perte de rendement (exprimé en % du rendement traité). Les pertes sont élevées et significativement supérieures pour les deux variétés sensibles de référence (test de Newman-Keuls). Concernant les génotypes avec Ryd2 et/ou Ryd3, ils présentent tous des pertes significativement inférieures aux variétés sensibles avec un taux moyen allant de 2 à 15 %. Ces résultats moyens sont à prendre avec précaution. D'une part, les différents génotypes de précocité variable sont semés à la même date, en semis précoce, afin d'accroître l'exposition aux pucerons. D'autre part certains génotypes, testés uniquement en année 3, sont plus faiblement représentés (3 essais). De la même façon que pour les observations visuelles, on peut observer un bon comportement des génotypes Ryd2+Ryd3, mais à nouveau des lignées Ryd2 uniquement peuvent amener à des pertes de rendement tout aussi faibles.



### Impacts sur la qualité de la récolte

Teneur en protéines (% MS) : La JNO est à l'origine d'une augmentation de la teneur en protéines pour les témoins sensibles Etincel et KWS Cassia, en raison de la concentration des protéines liée à un rendement nettement plus faible. Concernant les génotypes avec Ryd2 et/ou Ryd3, la teneur protéines est relativement

stable entre les conduites, ce qui est logique car les pertes de rendement sont faibles entre le traité et non traité insecticide.

**Poids spécifique (PS) :** La JNO entraîne une diminution du PS sur les variétés sensibles respectivement de 4 et 7 points. La perte est plus faible pour les génotypes avec *Ryd2* et/ou *Ryd3*, allant de 1 à 3 points.

**Calibrage (% du poids > 2.5 mm) :** Ce paramètre est en moyenne davantage affecté par la JNO. Ainsi les témoins sensibles perdent respectivement 5 et 24 points de calibrage. Les génotypes avec *Ryd2* ou *Ryd3* sont également pénalisés (majoritairement de 5 à 8 points). Seuls les génotypes cumulant les 2 gènes semblent présenter une faible perte de calibrage. Il convient néanmoins de rester prudent dans l'interprétation de ces informations car les écart-types sont élevés.

Rég.	Génotype	Nb	Protéines (% MS)		PS		Calibrage (% > 2.5 mm)	
			Moy. écart-type	Moy. écart-type	Moy. écart-type	Moy. écart-type	Moy. écart-type	Moy. écart-type
Réf.	ETINCEL	6	10	-1.5 1.0	4	1.5	5	6.5
Réf.	KWS Cassia	2	9	-1.0 0.5	7	2.6	24	12.8
Ryd2	AMISTAR	6	10	-0.2 0.5	2	1.3	7	3.8
Ryd2	FD1601	6	10	-0.2 0.3	3	1.5	7	4.7
Ryd2	FD1602	6	10	0 0.5	2	0.6	3	3.4
Ryd2	RAFAELA	6	10	0 0.5	1	1.3	7	5.0
Ryd2	SC1601	6	10	0.2 0.6	1	1.4	4	3.1
Ryd2	W983	6	10	-0.2 0.5	2	1.3	6	5.2
Ryd2	SC1602	2	10	-0.3 0.5	3	1.6	9	3.1
Ryd3	D14497-26	6	4	-0.5 0.2	1	2.0	6	2.1
Ryd3	FD1603	2	8	-0.8 0.4	3	2.9	9	3.8
Ryd3	FD1604	2	8	-0.6 0.6	1	1.8	8	4.7
Ryd3	SC1603	2	9	0 0.3	2	0.8	5	5.0
Ryd3	SC1604	2	9	-0.2 0.6	2	1.3	8	5.5
Ryd2+3	W115019	6	8	0 0.3	0	2.6	3	4.9
Ryd2+3	D14498	6	8	0 0.4	1	1.7	1	2.6
Ryd2+3	SC1605	2	3	-0.2 0.3	2	0.5	1	3.2

**Tableau Ch6 :** Protéines, PS et calibrage : écart BRUT entre les valeurs mesurées avec protection insecticide et celles sans protection insecticide Ecart (T-NT)

Nb : Nombre essais où le génotype est présent.

## 4 Résultats de caractérisation des génotypes en laboratoire

### Analyse de la sensibilité de génotypes d'orges porteurs de gènes Ryd

Le principal enjeu associé à l'étude du niveau de sensibilité/résistance d'un génotype est de trouver les conditions expérimentales permettant d'infecter du matériel de référence sensible avec un taux d'infection proche de 50 %. En effet, ce taux d'infection est compatible avec la mise en évidence, pour les génotypes à tester, d'une plus forte ou d'une plus faible sensibilité à l'inoculation virale. Cette étape de calibration a été réalisée en utilisant le génotype d'orge Etincel. Sur la base des données disponibles dans la littérature (Brault *et al.*, 2010), plusieurs modalités d'inoculation (durée de la période d'inoculation et nombre de pucerons vecteurs par plante) ont été testées de manière à identifier les conditions optimales. Ainsi, l'utilisation de deux pucerons virulifères (BYDV-PAV4) de stades L<sub>2</sub>-L<sub>4</sub> pendant une période d'inoculation (IAP) de 2 heures permet d'obtenir un taux d'infection moyen de 71,8 % +/- 8 % (données non présentées). Ce protocole d'inoculation a été utilisé comme standard dans les expériences conduites dans

le cadre de l'étude. Ainsi, des lots de 9 à 20 plantes de 16 génotypes porteurs du gène *Ryd2* et/ou *Ryd3* et du génotype référent cv. Etincel ont été inoculés selon ce protocole décrit ci-dessous (Table 1).

Groupe	Génotype	Gène Ryd	Expérience <sup>a</sup>					
			1	2	3	4	5	6
A	Etincel	/	15/20	16/20	14/20	13/20	11/20	14/20
	SC1601	2	14/20	14/20	10/20	2/20	13/20	12/20
	SC1602	2	15/20	19/20	8/20	1/20	7/20	11/20
	Rafaela	2	15/20	11/20	2/20	1/20	5/20	10/20
	W983	2	6/10	NA	1/20	1/20	0/9	3/12
	FD1601	2	11/20	12/20	9/20	1/20	3/20	14/20
B	Etincel	/	14/20	12/20	17/20	14/20	NA	NA
	KWS Cassia	/	16/20	18/20	16/20	16/20	NA	NA
	Amistar	2	15/20	10/20	15/20	9/20	NA	NA
	SC1603	3	15/20	10/20	17/20	5/20	NA	NA
	SC1604	3	12/20	14/20	10/20	NA	NA	NA
	D14497-7	3	15/20	15/20	14/20	11/20	NA	NA
C	Etincel	/	6/10	12/20	11/20	11/20	NA	NA
	Amistar	2	2/10	8/20	3/20	8/20	NA	NA
	D14498	2 et 3	0/20	1/20	0/20	1/20	NA	NA
	W115019	2 et 3	NA	0/20	1/6	4/20	NA	NA
	VAR6	2 et 3	0/10	2/20	1/20	2/20	NA	NA
	SC1605	2 et 3	0/10	2/20	1/20	2/20	NA	NA

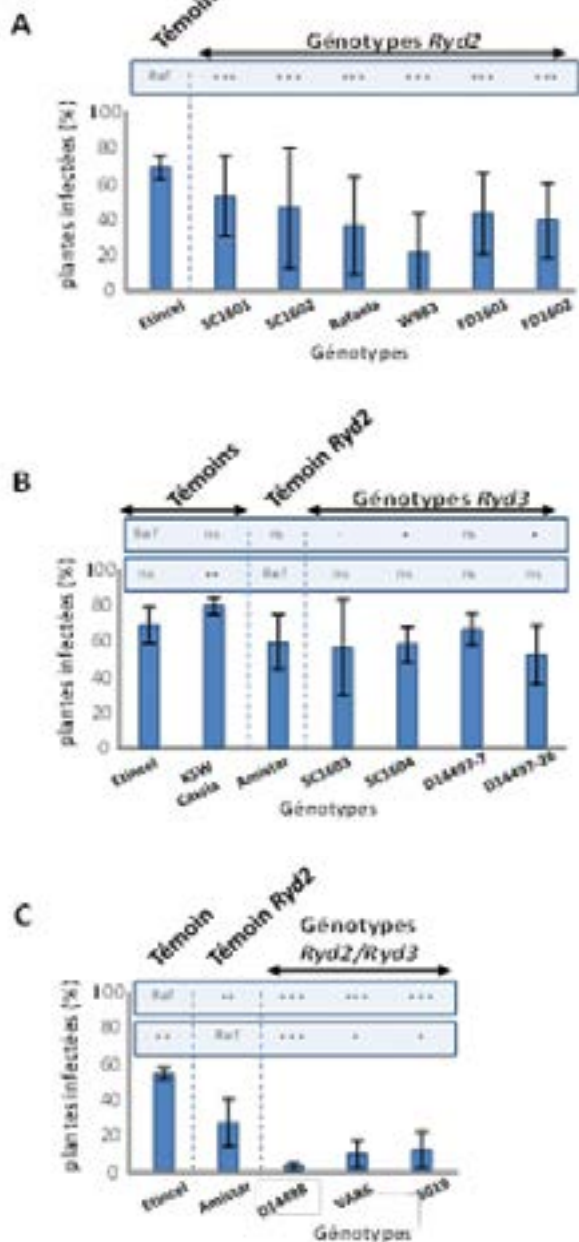
**Table 1 :** Taux d'infection des génotypes tests

<sup>a</sup> : Nombre de plantes infectées/nombre de plantes inoculées

NA : données non disponibles

L'analyse statistique, réalisée à l'aide d'un modèle linéaire généralisé, des taux d'infection obtenus pour chaque génotype *Ryd2*, *Ryd3* et *Ryd2/Ryd3* a été conduite pour chaque groupe d'expérimentation de manière à comparer ces taux à ceux obtenus pour une variété de référence (i.e. Etincel pour les groupes A, B et C, ou Amistar pour les groupes B et C). Les génotypes *Ryd2* (Fig. 1A) présentent des taux moyens d'infection allant de 20,0 % (W983) à 53,0 % (SC1601). Les taux d'infection obtenus pour ces 6 génotypes sont significativement plus faibles que celui obtenu pour Etincel ( $p < 0.001$  pour SC1601 et  $p < 0.0001$  pour SC1602, Rafaela, W983, FD1601 et FD1602). Les données associées aux génotypes *Ryd3* (Fig. 1B) montrent que ces génotypes sont infectés avec des taux moyens allant de 54,6 % (D14497-26) à 68,8 % (D14497-7). Bien que ces taux se révèlent être assez proches du taux d'infection moyen obtenu pour la variété Etincel (i.e. 71,3 %), l'analyse statistique révèle que, à l'exception du génotype D14497-7, les taux d'infection associés aux génotypes *Ryd3* sont significativement plus faibles ( $p = 0,097$ ,  $p = 0,046$  et  $p = 0,026$  pour SC1603, SC1604 et D14497-26, respectivement) que ceux obtenus pour Etincel. L'analyse conduite sur ces données mais en utilisant la variété Amistar (*Ryd2*) comme génotype de référence montre que les taux d'infection obtenus pour les 4 génotypes *Ryd3* ne sont pas significativement différents de ceux obtenus pour Amistar. Enfin, les données produites lors de l'étude des génotypes *Ryd2/Ryd3* (Fig. 1C) montrent que les génotypes D14498, VAR6 et W115019 sont associés, dans les conditions expérimentales définies par l'inoculation standardisée, à des taux moyens d'infection particulièrement faibles allant de 2,5 % pour D14498 à 12,2 % pour W115019.

Ces taux d'infection sont significativement plus faibles que ceux obtenus pour Etincel ( $p < 0.0001$  pour les trois génotypes) et que ceux obtenus pour Amistar ( $p < 0.001$  pour D14498 et  $p < 0.05$  pour VAR6 et W115019). Il est important de noter que dans les groupes d'expériences B et C, le génotype Amistar (*Ryd2*) se comporte différemment avec un taux d'infection significativement ( $p = 0,002$  groupe C) et non significativement ( $p = 0,166$ , groupe B) différent de la référence Etincel.

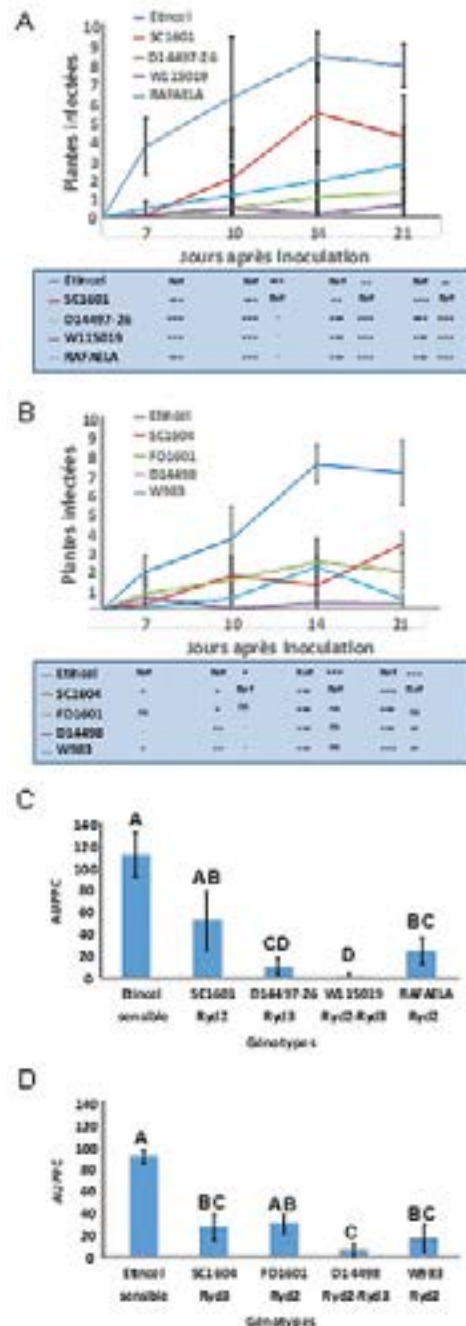


**Figure 1 : Taux d'infection des différents génotypes Ryd2 (A), Ryd3 (B) et Ryd2/Ryd3 (C).** Quatre à six séries de plantes (de 10 à 20 plantes par série, voir Table 1) de chaque génotype ont été inoculées selon un protocole standardisé impliquant 2 pucerons *Rp1A* virulifère pendant 2 heures. Le pourcentage moyen de plantes infectées est représenté pour chaque génotype. Les barres verticales noires représentent les écarts-types associés aux données. Le génotype Etincel (sensible à la JNO) ou le génotype Amistar (Ryd2) sont utilisés comme témoin ('Ref') pour les analyses statistiques visant à comparer le comportement de chaque génotype Ryd vis-à-vis de l'inoculation de l'isolat BYDV-PAV4. Les résultats des analyses statistiques réalisées à l'aide d'un modèle linéaire généralisé en comparant chaque génotype au génotype témoin ('Ref') sont présentés dans les cadres bleus. 'ns' non significatif ; '\*' :  $p < 0,01$  ; '\*\*' :  $p < 0,05$  ; '\*\*\*' :  $p < 0,01$  ; '\*\*\*\*' :  $p < 0,001$ .

## Dynamique d'accumulation virale dans les génotypes Ryd

Les génotypes Etincel, SC1601, Rafaela, W983, FD1601, SC1604, D14497-26, D14498 et W115019 ont été sélectionnés pour caractériser la dynamique d'accumulation virale dans les plantes infectées durant les trois premières semaines de l'infection.

A partir des taux d'infection obtenus pour chaque date d'échantillonnage (i.e. 7, 14, 21 et 28 jours après inoculation), il est possible de reconstruire la cinétique moyenne d'infection des 9 génotypes de l'étude (Fig. 2A et 2B). Les taux d'infection obtenus pour les génotypes *Ryd2*, *Ryd3* et *Ryd2/Ryd3* sont significativement plus faibles que ceux obtenus pour le génotype de référence cv. Etincel, à l'exception du génotype FD1601 (*Ryd2*) au 7<sup>ème</sup> jour après inoculation (Fig. 2B).



**Figure 2 : Dynamique d'infection des plantes (A et B) et aire sous la courbe de progression du taux d'infection (AUPPC) (C et D).**

Le nombre moyen de plantes infectées diagnostiquées pour chaque génotype à chacune des dates de prélèvement est représenté (a et b). Ces valeurs d'appuient sur quatre répétitions du dispositif expérimental. Les barres noires représentent les écarts-types associés. La valeur moyenne de l'aire sous la courbe de progression du pathogène (AUPPC) a été calculée à partir de 4 courbes de progression (4 répétitions) obtenues pour chaque génotype (Cet D). Les barres noires représentent les écarts-types associés à ces valeurs moyennes d'AUPPC.



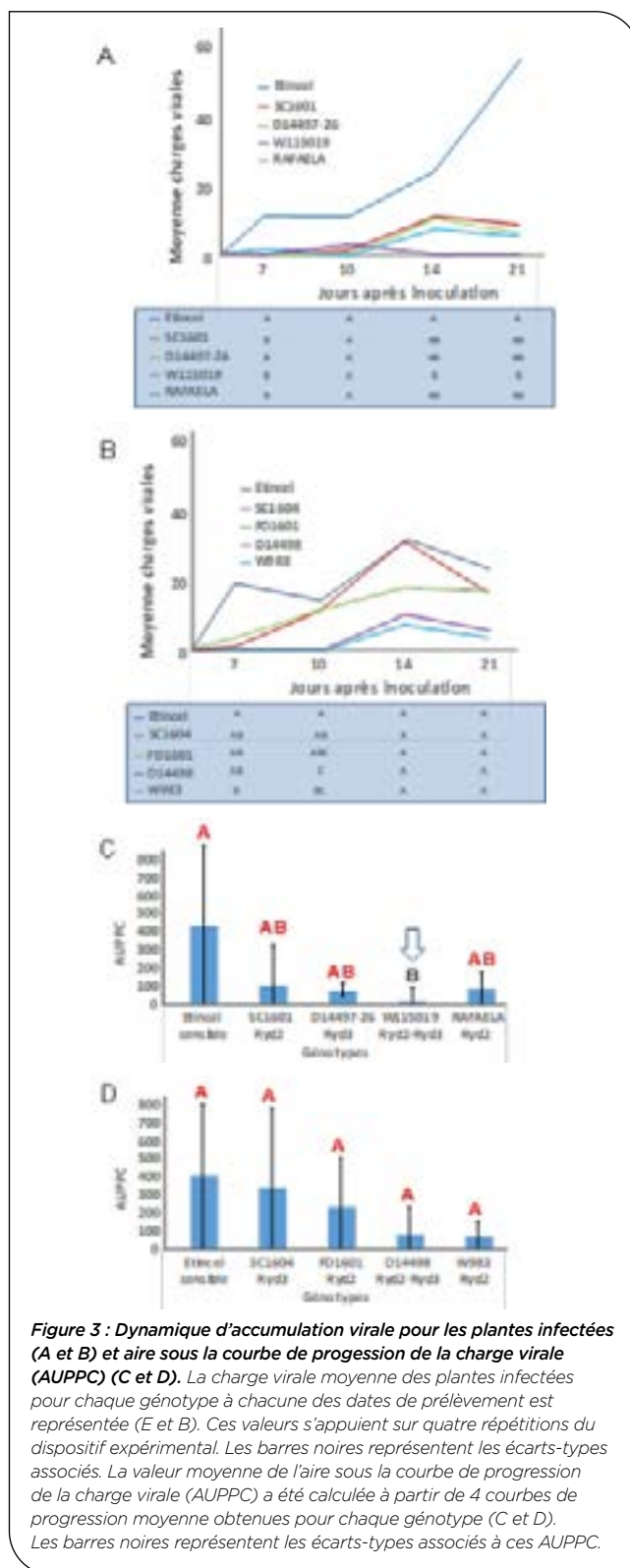
La transformation des données de cinétique en données correspondant aux surfaces sous la courbe de progression du pathogène (AUPPC, Fig. 2C et 2D) permet de constater que les AUPPC des génotypes D14997-26 (*Ryd3*), W115019 (*Ryd2/Ryd3*), Rafaela (*Ryd2*), SC1604 (*Ryd3*), D14498 (*Ryd2/Ryd3*) et W983 (*Ryd2*) sont significativement plus faibles que celle du génotype Etincel alors que les génotypes SC1601 (*Ryd2*) et FD1601 (*Ryd2*) présentent une AUPPC semblable à celle d'Etincel. Ainsi, la présence du gène de résistance *Ryd2* dans un génotype d'orge ne semble donc pas garantir le phénotype de résistance partielle observé lors du suivi de la cinétique d'infection. Ce résultat suggère un effet associé au fond génétique du génotype sur l'expression du caractère porté par le gène *Ryd2*. Les génotypes porteurs des deux gènes de résistance (i.e. W115019 et D14498) présentent des AUPPC significativement plus faibles que les autres, suggérant un gain de résistance à l'infection virale associé au pyramidage des deux gènes *Ryd*. Les données semi-quantitatives générées par l'approche sérologique peuvent être utilisées pour suivre l'évolution de la charge virale dans les plantes infectées pendant la période d'observation (Fig. 3A et 3B). Ces données ont été utilisées pour calculer l'AUPPC associée à la dynamique d'accumulation virale observée pour chaque génotype (Fig. 3C et 3D).

L'AUPPC de chaque génotype a été comparé à celle obtenue pour le génotype de référence cv. Etincel. Seul le génotype W115019 (*Ryd2/Ryd3*) présente une AUPPC plus faible que le génotype de référence sensible. Cependant, en observant les données de charges virales à chacune des dates de la cinétique, les deux génotypes *Ryd2/Ryd3* accumulent significativement moins le virus à J7, J14 et J21 pour W115019 et à J10 pour D14498 (Fig. 3A et 3B).

### Impact du stade de développement de la plante sur la sensibilité à l'inoculation virale

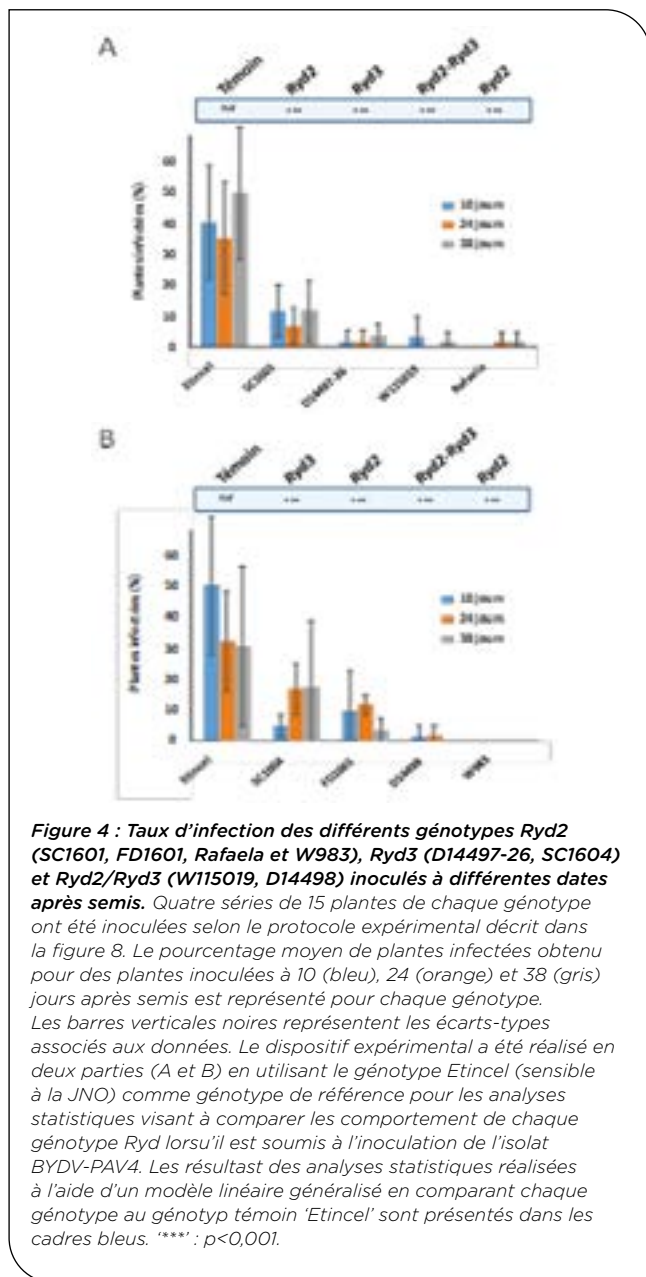
Des semis à dates décalées ont été réalisés de manière à produire des plantes d'âges différents pour procéder à l'inoculation virale. Le taux d'infection moyen obtenu pour Etincel varie, pour les différents âges de la plante à l'inoculation, entre 30 % et 50 % avec un taux moyen global d'infection de 40 % (Figure 4).

L'analyse statistique des données sanitaires montre l'absence d'effet significatif de l'âge de la plante à l'inoculation sur le taux d'infection à la fois pour le génotype sensible et pour les différents génotypes porteurs du(es) gène(s) *Ryd2/Ryd3*. Toutefois, les taux d'infection obtenus pour les différents génotypes *Ryd* aux différents âges d'inoculation sont significativement plus faibles que ceux obtenus pour le génotype sensible de référence ( $p < 0,001$ ). Ces résultats confirment la capacité des différents génotypes testés à lutter, dans les conditions expérimentales utilisées dans cette procédure, contre l'infection virale au cours des 38 premiers jours de développement de la plante dans les conditions de culture favorables à l'infection de l'hôte que représentent i) des températures de 24°C/20°C (J/N : 16h/8h) et ii) un cycle jour/nuit de 16/8 heures. Par ailleurs, des taux d'infections inférieurs à 10 % ont été obtenus pour les génotypes W983 (*Ryd2*), D14498 (*Ryd2/Ryd3*), D14497-26 (*Ryd3*), W115019 (*Ryd2/Ryd3*) et Rafaela (*Ryd2*).



### Estimation de la durée de latence

La latence est la période requise pour qu'une plante infectée acquière un statut « infectieux » et puisse ainsi servir de source pour la dispersion de virus. L'étude de la durée de latence repose initialement sur la capacité à produire des plantes sources infectées pour chacun des génotypes candidats. Le niveau de résistance élevé des deux génotypes *Ryd2/Ryd3* (i.e. W115019 et D14498) a limité le nombre de plantes sources utiles (i.e. infectées) ne permettant pas le suivi de la sortie de latence pour ces génotypes.



Pour les autres génotypes *Ryd2* et/ou *Ryd3*, les taux d'infection associés aux plantes sources ont permis de disposer de 17 (cv. SC1604) à 34 (cv. Etincel) plantes infectées (Fig. 5), ce qui correspond à 3 à 10 plantes sources infectée disponibles pour réaliser des transmissions virales pour chaque combinaison génotype/jour après inoculation. Les plantes sources du génotype Etincel permettent d'obtenir des taux de transmission proches de 80 % dès 14 jours après inoculation suggérant que, pour ce génotype de référence, le statut infectieux est atteint au cours des deux premières semaines de l'infection. Au 7<sup>ème</sup> jour après inoculation, SC1604 et FD1601 représentent d'aussi bonnes sources de virus qu'Etincel alors que les autres génotypes sont associés à des taux de transmission plus faibles suggérant une sortie de latence moins dynamique. Au 14<sup>ème</sup> jour après inoculation, les génotypes porteurs de *Ryd2* ou de *Ryd3* sont de moins bonnes sources de virus que le génotype sensible Etincel. Enfin, l'analyse des données obtenues au 28<sup>ème</sup> jour après inoculation indiquent que Rafaela et SC1604

représentent, à ce stade tardif de l'infection, des sources de virus de qualité équivalente au génotype Etincel (Fig. 5).

## 5 Discussion

Les données générées par les essais au champ permettent de mettre en évidence un certain nombre de points. Bien que les analyses virales n'aient pas mis en évidence une diminution du taux de détection d'espèces virales, l'expression phénotypique des symptômes de la JNO s'est avérée nettement et significativement réduite pour tous les génotypes porteurs d'un ou plusieurs gènes *Ryd*. Les observations n'ont pas permis d'identifier de différence entre les gènes *Ryd* ou leur association. La méthode PCR utilisée dans le cadre de ce projet, étant qualitative, ne permet pas de quantifier des différences dans la charge virale des plantes. Pourtant dans une situation de résistance partielle et/ou tolérance, la quantification de la charge virale pourra être pertinente dans l'évaluation variétale. Ce constat, ainsi que le constat d'un manque de spécificité des amorces MAV vis-à-vis du PAV, révèlent un besoin de développer de nouveaux outils moléculaires. Par exemple la PCR en temps réel ou le séquençage permettront d'identifier spécifiquement l'ensemble des espèces virales (séquençage), et de quantifier la charge virale dans les plantes (PCR en temps réel). De la même manière, les pertes de rendement liées à l'infection sont significativement réduites pour les génotypes porteurs d'un ou plusieurs gènes *Ryd*, sans mettre en évidence, dans le cadre de cette expérimentation, de différence significative entre les différents gènes ou leur combinaison. Concernant la qualité de récolte, on peut constater un effet sur la concentration en protéines des génotypes sensibles vraisemblablement liée à la diminution du rendement, aucun effet n'est observé sur les génotypes avec *Ryd*. Le poids spécifique est pénalisé de façon plus importante pour les génotypes sensibles que pour les génotypes avec *Ryd*, sans différence entre ces derniers. L'infection virale pénalise le calibrage, de façon marquée pour le génotype sensible à 2 rangs. Les autres génotypes sensibles ou avec *Ryd* présentent une réponse similaire, à l'exception notable des génotypes porteurs des gènes *Ryd2* et *Ryd3*.

L'ensemble de ces résultats, bien que prometteur et instructif, est à prendre avec précaution du fait du faible effectif de génotypes présents, fournis par un groupe restreint de sélectionneurs, et du fait du faible nombre de données disponibles en lien avec les difficultés rencontrées à réussir ce type d'essai en contamination naturelle. Néanmoins, les résultats s'avèrent cohérents et en accord avec les mécanismes dévoilés par les travaux en conditions contrôlées.

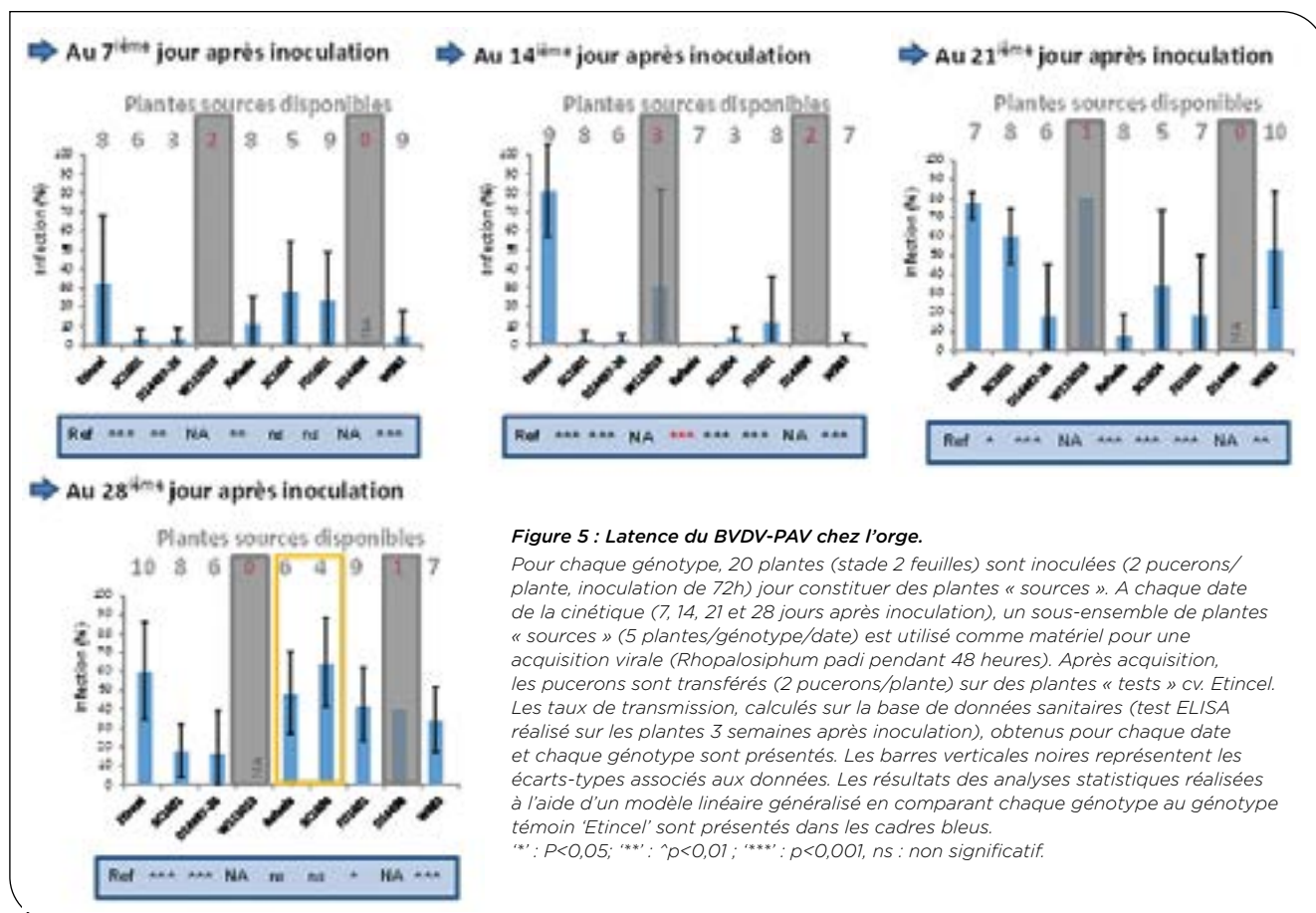
Les données générées lors du volet de l'étude au laboratoire montrent que les génotypes *Ryd2* et *Ryd3* sont moins sensibles à l'inoculation par le BYDV-PAV que la variété sensible Etincel. De plus, les trois génotypes cumulant ces deux ressources génétiques, ont présenté un phénotype particulièrement intéressant avec des taux d'infection de 5 à 20 fois plus faibles que ceux obtenus sur la variété sensible Etincel (sans gène *Ryd*) et de 3 à 10 fois plus faibles que ceux obtenus avec la variété Amistar (*Ryd2* uniquement).

Ainsi, les différents axes de recherche développés au laboratoire dans le cadre du projet JNOrge ont permis de montrer que les gènes *Ryd* étudiés confèrent une résistance partielle à l'infection virale illustrée par i) une réduction du taux d'infection, ii) un ralentissement de la dynamique d'infection virale et iii) une augmentation de la durée de latence des plantes infectées.

Sur la base de ces résultats, des variétés portant ces gènes devraient, dans un futur proche, pouvoir être utilisées en remplacement des variétés actuelles sensibles à la JNO. Nous n'avons pas pu mettre en

évidence de manière claire un effet "fond génétique" en plus des gènes cités pour la tolérance/résistance mais ce sujet mériterait d'être approfondi.

Cependant, avant de s'engager dans une stratégie d'utilisation et de déploiement de ces ressources génétiques, il conviendra d'en évaluer la durabilité face au potentiel évolutif des virus de la JNO de manière à argumenter au mieux les choix stratégiques associés à l'utilisation des gènes *Ryd* dans les programmes de sélection de l'orge et ainsi d'en augmenter l'efficacité et la longévité.



## Références bibliographiques

- Badr, K. M, Sch, R., El Rabey, H., Effgen, S., Ibrahim, H.H., Pozzi, C., Rohde, W., Salamini, F. (2000). On the Origin
- Balaji B, Bucholtz DB and Anderson JM (2003) Barley yellow dwarf virus and Cereal yellow dwarf virus quantification by real-time polymerase chain reaction in resistant and susceptible plants. *Phytopathology* 93: 1386-1392.
- Bayon F, Ayrault J-P and Pichon P (1982) La jaunisse nanisante de l'orge. *Phytoma* 342: 17-21.
- Brault V., Uzest M., Monsion B., Jacquot E., Blanc S. Aphids as transport devices for plant viruses, *C. R. Biologies* (2010), doi:10.1016/j.crvi.2010.04.001
- Bruehl GW (1961) Barley Yellow Dwarf: Monograph n°1, The American Phytopathological Society, 52.

- Burnett PA, Comeau A, Qualset CO. (1995): Tolerance or resistance for control of barley yellow dwarf. In: D'Arcy CJ, Burnett PA (eds) *Barley Yellow Dwarf 40 Years of Progress*, APS Press, Minnesota (1995). pp. 321-343.
- Carrington JC, Kasschau KD, Mahajan SK and Schaad MC (1996) Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* 8: 1669-1681.
- Chain F., Riault, G., Trottet M., Jacquot E. (2007b). Valuation of the durability of the Barley yellow dwarf virus-resistant Zhong ZH and TC14 wheat lines. *European Journal of Plant Pathology* 117(1): 35-43.
- Chain, F., Riault G, Trottet M, Jacquot E. (2007a). Characterization of two sources of tolerance/resistance to Barley yellow dwarf virus-PAV (BYDV-PAV) in wheat and estimation of their durability using serial passage experiment procedures. *Parasitica* 61, 41-46



**Clark M.F. and Adams A.N.** (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, n. 34 475-483.

**Cooper JI and Jones AT** (1983) Responses of plants to viruses: proposals for use of terms. *Phytopathology* 73: 127-128.

**D'Arcy, C. J., and P. A. Burnett.** (1995). Barley yellow dwarf, 40 years of progress. APS Press, St Paul, USA, 374 pp.

**Delaunay A., Lacroix C., Morlière S., Riault G., Chain F., Trottet M., Jacquot E.** A SSCP-derived quantitative variable to monitor the virulence of a Barley yellow dwarf virus-PAV (BYDV-PAV) isolate during adaptation to the TC14 wheat resistant line. *Molecular Plant Pathology* (2010), 11(5), 651-661.

**Domier, L.L.** (2012). "Family-Luteoviridae" in "Virus Taxonomy", 9th Edn., eds M.Q.K. Andrew, L. Elliot, J.A. Michaeland E.B. Carstens (SanDiego,CA:Elsevier), 1045-1053.

**Fabre, F., Bruchou, C., Palloix, A., & Moury, B.** (2009). Key determinants of resistance durability to plant viruses: Insights from a model linking within- and between-host dynamics. *Virus Research*, 141, 140-149.

**Garcia-Arenal, F., and McDonald, B. A.** (2003). An analysis of the durability of resistance to plant viruses. *Phytopathology*, 93, 941-952.

**Gildow FE and Rochow WF** (1980) Role of accessory salivary glands in aphid transmission of barley yellow dwarf virus. *Virology* 104: 97-108.

**Grafton KF, Poehlman JM, Sechler DT and Sehgal OP** (1982) Effect of barley yellow dwarf virus infection on winter survival and other agronomic traits in barley. *Crop science* 22: 596-600.

**Harrison, B. D.** (2002). Virus variation in relation to resistance breaking in plants. *Euphytica*, 124, 181-192.

**Henry M, George S, Arnold GM, Dedryver CA, Kendall DA, Robert Y and Smith BD** (1993) Occurrence of barley yellow dwarf virus (BYDV) isolates in different farmland habitats in western France and south-west England. *Annals of Applied Biology* 123: 315-329.

**Larkin PJ, Bretell RIS, Banks PM, Appels R, Waterhouse PM, Cheng ZM, Zhou GH, Xin ZY and Chen X** (1990) Identification, characterization and utilisation of sources of resistance to barley yellow dwarf virus. In: Burnett PA (ed.) *World Perspectives on Barley Yellow Dwarf*. (pp. 415-420). International Maize and Wheat Improvement (CIMMYT), Mexico.

**Li LH, Zheng DS, Yang XM, Li XQ, Liu SC and Song CH** (1998) Diversity evaluation of wheat germplasm resources in China. *Genetic Resources & Crop Evolution* 45: 167-172.

**Lister RM and Ranieri RR** (1995) Distribution and economic importance of Barley Yellow Dwarf. In: D'Arcy CJ and Burnett PA (eds) *Barley Yellow Dwarf, 40 years of Progress*. (pp. 29-53). St Paul.

**Miller, W.A., Krueger, E.N., and Gray, S.M.** (2013). ICTV taxonomic proposal 2013.016a,bP: In the family Luteoviridae, create species Maize yellow dwarf virus-RMV in the genus Polerovirus and remove the unassigned species Barley yellow dwarf virus-RMV. Available online at: <http://talk.ictvonline.org/files/proposals/taxonomyproposalsplant1/m/plant01/4600.aspx>

**Miller, W.A., Waterhouse P.M., and Gerlach W.L.** (1998). Sequence and organization of barley yellow dwarf virus genomic RNA. *Nucleic Acids Research*, 16 :6097-6111.

**Monneveux P, St-Pierre CA and Comeau A** (1991) Barley yellow dwarf virus tolerance in drought situations. In: Comeau A and Makkouk KM (eds) *Barley Yellow Dwarf in West Asia and North Africa*. (pp. 209-220). Aleppo.

**Moury B., Fabre F. and Senoussi R.** (2007). Estimation of the number of virus particles transmitted by an insect vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 17891-17896.

**Niks, R.E., Habekuß, A., Bekele, B., Ordon, F.** (2004). A novel major gene on chromosome 6H for resistance of barley against the barley yellow dwarf virus. *Theor Appl Genet*, 109: 1536-1543

**Qian YT, Zhou GH and Zhou XM** (1993) Screening for the sources of resistance to BYDV. [in Chinese]. *Acta Phytophylacica Sinica* 20: 71-75.

**Rimbaud L., Dallot S., Delaunay A., Borron S., Soubeyrand S., Thébaud G. and Jacquot E.** (2015). Assessing the mismatch between incubation and latent periods for vector-borne diseases: the case of sharka. *Phytopathology*. 105:1408-1416

**Sadeghi E, Dedryver CA and Gauthier JP** (1997) Role of acquisition and inoculation time in the expression of clonal variation for BYDV-PAV transmission in the aphid species *Rhopalosiphum padi*. *Plant Pathology* 46: 502-508.

**Schaller CW, Rasmussen DC, Qualset CO** (1963). Sources of resistance to the yellow dwarf virus in barley. *Crop Sci* 4: 544-548.

**Schaller CW, and Chim. CI.** (1969). Registration of Atlas 68 barley. *Crop Sci.* (Madison) 9(4):521 Comment: CV-111

**Scholz, M., Ruge-Wehling, B., Habekuß, A., Schrader, O., Pendinen, G., Fischer K., Wehling P.** (2009). Ryd4 Hb : a novel resistance gene introgressed from *Hordeumbulbosum* into barley and conferring complete and dominant resistance to the barley yellow dwarf virus. *Theoretical and Applied Genetics*, 119 : 837-849.

**Signoret PA and Maroquin C** (1990) The barley yellow dwarf virus situation in western Europe. In: Burnett PA (ed.)

**Suneson CA.** (1955) Breeding for resistance to yellow dwarf virus in barley. *Agron J* 47:283.

**Zhang, W., Cheng, Z., Xu, L., Wu, M., Waterhouse, P., Zhou, G.** (2009). The complete nucleotide sequence of the barley yellow dwarf GPV isolate from China shows that it is a new member of the genus polerovirus. *Arch.Virol.* 154,1125-1128.

# JNOrge : De nouvelles résistances/tolérances contre la jaunisse nanisante chez l'orge : caractérisation et impacts épidémiologiques

Isabelle Abt<sup>1</sup>, Adeline Pinault<sup>1</sup>, Vincent Plat<sup>1</sup>, Marlène Souquet<sup>1</sup>, Amélie Genty<sup>2</sup> et Emmanuel Jacquot<sup>1</sup>

1 - PHIM, INRAE, CIRAD, Institut Agro, Univ Montpellier, Cirad TA A-54/K, Campus international de Baillarguet, 34398, Montpellier, France

2 - Secobra Recherches, Le Bois Henry, 78580 Maule, France

La jaunisse nanisante de l'orge (JNO) est l'une des maladies virales les plus graves sur céréales. En France, la JNO est principalement causée par l'espèce RW du Barley yellow dwarf virus (BYDV-BW, famille Tombusviridae, genre Luteovirus). Ce virus, transmis de manière persistante par pucerons (e.g. *Rhopalosiphum padi* et *Sitobion avenae*), induit des symptômes de jaunissement et de nanisme et entraîne des pertes de rendement pouvant atteindre 80 %. Depuis deux décennies, la principale méthode de lutte contre la JNO est basée sur l'utilisation d'insecticides (traitements de semences et pulvérisations foliaires). Ainsi, près de 30% des surfaces céréalières françaises ont été traitées avec des néonicotinoïdes sur la période 2014-2018. Cependant, avec la récente interdiction par l'Union européenne des néonicotinoïdes, les parcelles de céréales non traitées ne seront pas protégées contre la colonisation des pucerons et l'inoculation virale lors des stades précoces du développement de la plante jusqu'à l'application d'un éventuel traitement foliaire à base de pyréthrinoides. Il est donc important d'identifier des alternatives aux produits chimiques pour tenter de maintenir une faible prévalence de JNO en parcelles de céréales et ainsi maintenir des rendements élevés dans une agriculture progressivement dépourvue de solutions chimiques. Sixty lignées d'orge portent les gènes *Ryd2* et/ou *Ryd3* et ont testées pour leur phénotype de résistance/tolérance au BYDV-BW. Plusieurs paramètres des interactions virus-vecteur, notamment le taux d'infection, la dynamique d'accumulation virale, l'âge de l'orge à l'inoculation et la durée de la période de latence, ont été étudiés à l'aide de procédures basées sur des inoculations contrôlées et la détection sérologique du virus dans les plantes inoculées. Cette étude de l'impact des gènes *Ryd2* et/ou *Ryd3* sur des paramètres clés du processus infectieux permet d'apporter des informations cruciales aux sélectionneurs pour le développement de matériaux innovants dans la lutte contre la jaunisse nanisante de l'orge.



Figure 1 : Représentation schématisée des quatre principaux actions conduites dans le cadre du projet.

16 génotypes d'orge

Nom	<i>Ryd2</i>	<i>Ryd3</i>	<i>Ryd2/Ryd3</i>
Etnoel	SC1601	W1501	SC1603
W1501	SC1602	FD1601	SC1604
Rafaela	FD1601		SC1604
Amor			W1501

BYDV-BW (Chen et al., 2007)

Collecté en 1998 sur orge en Alsace (Alsace, France)

*Rhopalosiphum padi*, clone RysA

Collecté en 2013 dans l'Alsace (Alsace, France)

## 1 Taux d'infection : sensibilité / résistance à l'inoculation

- À l'exception du génotype D14497-7 (*Ryd3*), les génotypes *Ryd2* et *Ryd3* testés sont significativement moins sensibles à l'inoculation par le BYDV-BW que la variété sensible Etnoel.
- L'analyse comparative des taux de transmission montre que les gènes *Ryd2* et *Ryd3* confèrent un niveau de résistance comparable.
- Les génotypes *Ryd2/Ryd3* présentent des taux d'infection de 5 à 20 fois plus faibles que la variété sensible Etnoel et de 3 à 10 fois plus faibles que la variété Amor (*Ryd2*).

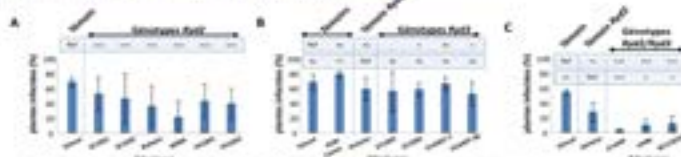
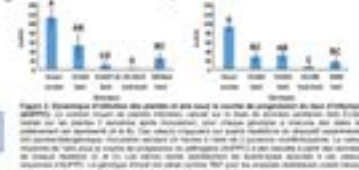
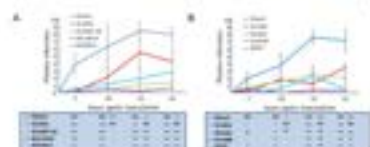


Figure 2 : Taux d'infection des différents génotypes *Ryd2* (SC1601, SC1602 et SC1604), *Ryd3* (W1501) et *Ryd2/Ryd3* (SC1603, SC1604 et W1501) par le virus BYDV-BW. Les données sont exprimées en pourcentage de plantes infectées sur 10 à 20 plantes par variété de virus inoculées. Les lettres indiquent des différences significatives (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Les lettres différentes indiquent des différences significatives (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Les lettres différentes indiquent des différences significatives (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

## 2 Cinétique d'infection et accumulation virale



- Les génotypes *Ryd* (sauf FD1601 à J<sub>1</sub>) présentent un taux d'infection significativement plus faible qu'Etnoel.
- Les AUPPC (taux d'infection) des génotypes *Ryd* (sauf SC1601 (*Ryd2*) et FD1601 (*Ryd2*)) sont significativement plus faibles que celle d'Etnoel.
- Les génotypes *Ryd2/Ryd3* accumulent moins efficacement le virus qu'Etnoel. De plus, W1501 présente une AUPPC significativement plus faible qu'Etnoel (non illustré).

## 3 Impact de l'âge de la plante à l'inoculation

- Les génotypes *Ryd* se comportent de manière équivalente face à l'inoculation virale quel que soit leur âge à l'inoculation.

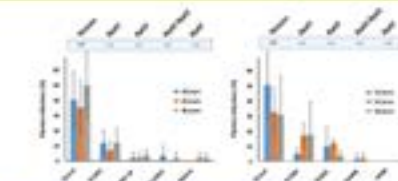


Figure 3 : Taux d'infection des différents génotypes *Ryd2* (SC1601, SC1602 et SC1604), *Ryd3* (W1501) et *Ryd2/Ryd3* (SC1603, SC1604 et W1501) par le virus BYDV-BW. Les données sont exprimées en pourcentage de plantes infectées sur 10 à 20 plantes par variété de virus inoculées. Les lettres indiquent des différences significatives (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Les lettres différentes indiquent des différences significatives (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Les lettres différentes indiquent des différences significatives (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

## 4 Durée de la période de latence : statut infectieux

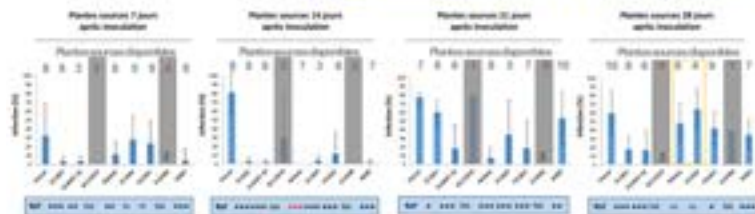


Figure 4 : Latence de BYDV-BW chez l'orge. Pour chaque génotype, 10 plantes ont été inoculées à l'aide d'un virus BYDV-BW. Les données sont exprimées en pourcentage de plantes infectées sur 10 à 20 plantes par variété de virus inoculées. Les lettres indiquent des différences significatives (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Les lettres différentes indiquent des différences significatives (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Les lettres différentes indiquent des différences significatives (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

- Le niveau de résistance élevé des génotypes *Ryd2/Ryd3* (W1501 et D14498) empêche le suivi de la sortie de latence pour ces génotypes.
- Etnoel acquiert le statut infectieux avant le 14<sup>ème</sup> jour de l'infection virale.
- Du 7<sup>ème</sup> au 21<sup>ème</sup> jour de l'infection, les génotypes *Ryd2* et *Ryd3* sont de moins bonnes sources virales qu'Etnoel (sauf SC1604 et FD1601 à J<sub>1</sub>).
- Au 28<sup>ème</sup> jour après inoculation, Rafaela et SC1604 sont des sources de virus de qualité équivalente à Etnoel.

## Conclusions et perspectives

- Les génotypes *Ryd* présentent une résistance partielle à la JNO illustrée par :
  - Une réduction du taux d'infection.
  - Un ralentissement de la dynamique d'infection virale.
  - Une augmentation la durée de latence des plantes infectées.
- Le pyramidage de *Ryd2* et *Ryd3* augmente le niveau de résistance à la JNO.
- Ces nouvelles connaissances des interactions virus-vecteur-orge (*Ryd*) vont permettre d'orienter au mieux les prochaines étapes de sélection visant à produire des orges résistantes à la JNO.
- L'étude de la durabilité des gènes *Ryd* et de leur spectre d'action vis-à-vis d'autres espèces de BYDV doit à présent être envisagée.



# Rouille BDT : Recherche de résistances durables à la rouille jaune chez le blé dur et le triticale

Claude Pope<sup>1</sup>, Marc Leconte<sup>1</sup>, Tiphaine Vidal<sup>1</sup>, Annaig Bouguennec<sup>2</sup>, Michael Cochard<sup>3</sup>, Christophe Jeudi<sup>3</sup>, Valérie Laurent<sup>3</sup>, Carine André<sup>4</sup>, Eric Delaleau<sup>5</sup>, Frédéric Fantin<sup>6</sup>, Jean-Paul Legoff<sup>7</sup>, Thierry Lefèvre<sup>7</sup>, Marion Chapus<sup>7</sup>, Anthony Roullier<sup>7</sup>, Franck Lacoudre<sup>8</sup>, Céline Duque<sup>8</sup>, Simon Lefèvre<sup>9</sup>, Philippe du Cheyron<sup>10</sup>

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

2 - INRAE UMR GDEC, 5 chemin de Beaulieu, 63000 Clermont-Ferrand

3 - SAS Florimond Desprez Veuve et Fils, BP 41, 59242 Cappelle en Pévèle

4 - Syngenta Seed SAS, Ferme de Moyencourt, BP5, 78910 Orgerus

5 - Lemaire-Deffontaines, 180 rue du Rossignol, 59310 Auchy les Orchies

6 - Agri-obtentions URD78, Ferme de Gauvilliers, 78660 Orsonville

7 - RAGT 2n, rue Emile Singla, site de Bourran, 12000 Rodez

8 - Limagrain Europe, 5 rue de l'Egalité, 28130 Chartainvilliers

9 - AgroSolutions, 83 avenue de la Grande Armée, 75782, Paris cedex 16

10 - Arvalis-Institut du Végétal, 3 rue Joseph et Marie Hackin, 75016 Paris

Porteur du projet : GIE blé dur

## Résumé

Suite à la forte épidémie de rouille jaune en 2014, les sélectionneurs de blé dur et de triticale ont cherché à introduire dans les programmes de sélection des géniteurs de résistance à la fois au stade plantule et adulte, alors que ce caractère était pris en compte essentiellement pour le blé tendre jusqu'alors. Cette étude a détecté des résistances au stade plantule et également des QTL de résistance au stade adulte chez les deux espèces. Chez le blé dur, un QTL majeur de résistance issu de Nobilis est localisé sur le chromosome 1B ; deux QTL sont repérés sur le chromosome 1B. Chez le triticale, un QTL majeur de résistance est identifié sur le chromosome 6R issu de Vuka et Maximal. Des résistances totales observées chez le seigle et des triticales primaires offrent des possibilités de diversification chez le triticale. La stabilité des résistances des variétés inscrites a été évaluée au champ en conditions d'inoculation artificielle dans 47 essais chez Arvalis et INRAE et en condition naturelle dans des coopératives de différentes régions. Des variétés sensibles, partiellement résistantes et totalement résistantes ont été repérées chez les deux espèces. Cette étude a été conduite de 2017 à 2019 sous une pression de maladie faible à moyenne selon le calcul du nombre de générations du parasite mensuel, basé sur la durée de la période de latence en fonction de la température moyenne journalière. Le suivi des races de *Puccinia striiformis* montre une différenciation selon les espèces, W(-)/Pst10 domine sur le blé tendre et le blé dur et Tri2015/Pst13 sur le triticale. Ces races diffèrent également pour leur aptitude thermique. Les isolats de Tri2015 issus de triticale ont une période de latence plus courte au chaud que ceux de W(-) issus de blé dur et de blé tendre. Les isolats W(-) ont une meilleure efficacité d'infection que ceux de Tri2015 aux températures moyennes de 10 et 15°C. Les possibilités d'utilisation dans les programmes de sélection des sources de résistance détectée sont étudiées par deux nouveaux projets FSOV.

## Introduction

La rouille jaune, causée par le champignon biotrophe *Puccinia striiformis* (Pst), est l'une des maladies les plus répandues et dévastatrices des céréales (Hovmøller *et al.*, 2011). Une attaque sévère des feuilles supérieures et des glumes pénalise particulièrement les récoltes, réduit le poids de mille grains et provoque des pertes de rendement pouvant atteindre 40 à 80 %. Cette maladie explosive est difficile à enrayer si les traitements fongicides ne sont pas appliqués dès le démarrage de l'épidémie. Une forte épidémie nécessite l'application d'au moins deux traitements fongicides, ce qui est incompatible avec une stratégie de protection intégrée des cultures, économe en intrants, répondant aux exigences du projet Agroécologie adopté par le Ministère de l'Agriculture et des plans Ecophyto ([https:// agriculture.gouv.fr/ecophyto](https://agriculture.gouv.fr/ecophyto)).

La rouille jaune est commune dans les régions au climat frais et humide (Hau et de Vallavieille-Pope, 2006) mais récemment des souches adaptées à haute température ont envahi des régions chaudes (Sud-Est des États-Unis, Ouest de l'Australie) (Milus *et al.*, 2009 ; Wellings, 2011). Leur faible nombre de virulences ne leur a pas permis de s'étendre en France sur le blé tendre, protégé par plusieurs gènes de résistance (de Vallavieille-Pope *et al.*, 2012). Depuis 2011 une souche (Warrior, W) d'origine exotique également, s'est propagée en Europe. Des conditions climatiques très favorables en 2014 (Lefèvre *et al.*, 2015), ont entraîné d'importantes épidémies sur le blé tendre mais également sur des espèces rarement touchées jusqu'alors, le blé dur et le triticale (Audenaert *et al.*, 2014). De plus, une race (triticale agressive) spécifique du triticale a causé de graves dégâts en Scandinavie (Hovmøller *et al.*, 2016) et a été isolée à faible fréquence en France en 2012.

La sélection de variétés résistantes apporte des solutions permettant de réduire l'emploi de produits phytosanitaires. Cependant, la lutte génétique peut s'avérer de courte durée si ces gènes de résistance sont



rapidement contournés par l'agent pathogène. Dès lors, la sélection de variétés présentant des résistances plus durables ainsi que leur évaluation après leur inscription s'imposent. Il est donc nécessaire d'introduire dans les programmes d'amélioration variétale des géniteurs de résistance adulte ayant des résistances partielles considérées comme plus durables que les résistances totales s'exprimant dès le stade jeune plante (Chen, 2005, 2013 ; Rosewarne *et al.*, 2013), d'évaluer le niveau de résistance des variétés inscrites dans les conditions des différentes régions de culture et de suivre l'évolution des races dans la région. Suite aux conditions climatiques favorables et l'émergence de nouvelles races, des épidémies précoces, se sont déclenchées sur les variétés devenues sensibles. Il importe donc également de protéger les cultures dès le jeune stade avec l'emploi combiné de gènes de résistance s'exprimant au stade jeune plante et au stade adulte.

L'observatoire des races de rouille jaune, établi depuis 1984 (de Vallavieille-Pope *et al.*, 2012 ; <http://www.wheatrust.org>), a permis de détecter le caractère durable de la résistance de variétés françaises de blé tendre (Perronne *et al.*, 2021). Nous avons ainsi montré l'intérêt des combinaisons de gènes de résistance s'exprimant au stade plantule et de QTL de résistance s'exprimant au stade adulte (Mallard *et al.*, 2005 ; Dedryver *et al.*, 2009 ; Paillard *et al.*, 2012). Les QTL de résistance adulte isolés dans des géniteurs ayant un niveau de résistance élevé pourront aider la sélection à créer des variétés ayant une résistance durable par l'accumulation de gènes *Yr* exprimés au stade plantule et de QTL de résistance exprimés au stade adulte dans des espèces hôtes pour lesquelles ce caractère de sélection a été négligé, comme le blé dur et le triticale.

Bien que le seigle soit peu cultivé en France actuellement (25 000 ha en 2015), nous l'avons inclus dans notre étude car il est cultivé dans des zones similaires à celles du triticale (Haute-Loire notamment). De plus c'est l'une des espèces parentes du triticale et la diversification génétique nécessaire au triticale utilise le seigle. Des connaissances sur le comportement de cette espèce face à la rouille jaune s'avèrent donc nécessaires pour introduire des résistances du seigle dans le triticale, comme l'ont fait Zhou *et al.* (2012), Yang *et al.* (2014) et Li *et al.* (2015). Le seigle a par le passé fourni le gène de résistance *Yr9* et peut être source de nouvelles résistances aujourd'hui (Yang *et al.*, 2014).

Récemment, en Scandinavie, les variétés de triticale ont été affectées par de nouvelles races de rouille jaune (wheatrust.org). Etant donné la dispersion à longue distance de cet agent pathogène, la sélection de variétés résistantes s'impose. Peu d'information est disponible sur la rouille jaune du blé dur. Une seule variété de blé dur (Produra) est incluse dans la gamme différentielle Nord-Américaine pour déterminer les races de *Pst*. Aux Etats-Unis, le blé dur est cultivé essentiellement dans le Dakota du Nord et la Californie, et les isolats de *Pst* issus de blé dur ne diffèrent pas de ceux de blé tendre (Holtz *et al.*, 2014 ; X. Chen, comm. pers.). La majorité des variétés de blé dur enregistrées pour l'Ouest du Canada portent une résistance à la rouille jaune au moins modérée (Holtz *et al.*, 2014).

Récemment, Xu *et al.* (2013) et Cheng *et al.* (2014) ont identifié trois gènes de résistance à la rouille jaune à partir de lignées de blé dur, *Yr53*, *Yr64* et *Yr65*, efficaces vis à vis des races d'Amérique du Nord. De même, *Yr15* issu de *Triticum dicoccoides* est toujours efficace.

L'objet de notre étude est de rechercher si les races présentes sur blé dur et triticale en France diffèrent de celles présentes sur blé tendre par la caractérisation de leur profil de virulence et de leur profil moléculaire. Par ailleurs, nous testons si l'aptitude thermique des isolats issus de blé dur et triticale pour deux composantes du cycle infectieux (efficacité d'infection, période de latence) sont caractéristiques de ces espèces. Nous caractérisons de nouvelles sources de résistance pour le blé dur et le triticale à la fois au stade plantule par des tests pathologiques en conditions contrôlées et au stade adulte en identifiant des QTL de résistance dans des populations recombinantes issues d'un parent résistant. Des observations récentes montrent que le niveau de résistance des feuilles et des épis diffère significativement pour certaines variétés, et par conséquent les QTL sont recherchés pour ces deux stades phénologiques. Enfin nous comparons le niveau de résistance variétale au champ de variétés nouvellement inscrites inoculées par des races récentes et sous pression d'inoculum naturel. La pression épidémique est estimée chaque année grâce à un modèle calculant un nombre de cycles potentiels du parasite en fonction de la température (Lefèvre *et al.*, 2015).

## 1 Matériels et Méthodes

### ► A. Etude de la population pathogène de *Puccinia striiformis*

#### A.i. Production de spores

Les obtenteurs, les coopératives et INRAE GDEC ont expédié des prélèvements de feuilles sporulantes provenant d'un inoculum naturel. Les spores des échantillons sont multipliées en serre à INRAE Bioger 1 à 2 fois de façon à obtenir 5 mg de spores pour le pathotypage, 2 mg pour l'analyse moléculaire et 5 mg pour la conservation de l'échantillon. Les isolats sont clonés à partir d'une monochlorose après inoculation des feuilles à faible densité. Les spores des isolats sont produites sur des variétés de blé sensibles, le cv-Victo sensible à la majorité des races et le cv-Michigan Amber sensible à la race Tri2015. Les semis sont réalisés dans un terreau tourbeux standard jusqu'au stade deux feuilles (environ 10 jours). Les plantules sont maintenues en serre dans une enceinte à air filtré et en conditions contrôlées (8 h d'obscurité à 15°C et 16 h de lumière naturelle à 20°C). La veille de l'inoculation, l'intensité de la lumière naturelle de la serre est complétée par des lampes à vapeur de sodium (intensité : 150  $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) pour augmenter l'efficacité de l'infection (de Vallavieille-Pope *et al.*, 2012). Quand les plantules atteignent 1 cm de hauteur, une solution d'hydrazide maléique est appliquée à une concentration de 0,25 g / L (20 ml par pot de 4 x 4 x 7 cm) afin de restreindre la croissance des feuilles et d'augmenter leurs rendements en production de spores.

Les spores récoltées sont stockées à -80°C. Avant l'inoculation, les spores subissent un choc thermique à 40°C pendant 10 minutes. Pour l'inoculation des semis, les spores (3 mg) suspendues dans 600 µl de solution de Novec™ 7100 (Sørensen *et al.*, 2016) sont inoculées aux plantules de 10 jours. Après une incubation à 8°C pendant 24 h dans une chambre de rosée, les plantes sont placées dans un compartiment de serre maintenu dans les conditions mentionnées ci-dessus. Pour minimiser la contamination croisée de spores entre pots, les plantules inoculées sont recouvertes de sacs de cellophane transparents. Quatorze à 17 jours après l'inoculation, les spores sont récoltées en secouant doucement les sacs. Les urédiniospores recueillies sont alors séchées dans un dessiccateur à 4°C pendant 3 jours. Afin d'homogénéiser la qualité physiologique des spores pour les expérimentations sur l'aptitude thermique, la production de spores des isolats est répétée 3 fois dans les mêmes conditions. La troisième production est utilisée comme inoculum.

### A.ii. Génotypage

L'ADN de chaque isolat est extrait à partir de 5 mg de spores (Ali *et al.*, 2011). Le génotypage est réalisé à l'aide de 19 microsatellites répartis en deux multiplex. Dans le cas d'échec de la multiplication des spores, l'extraction d'ADN est réalisée directement à partir d'une lésion sporulante d'une feuille de l'échantillon original.

### A.iii. Spectre de virulences des échantillons de *Pst*

Les virulences des isolats sont testées sur des jeunes plantes d'une gamme de 32 hôtes différentiels (de Vallavieille-Pope *et al.*, 2012), cultivées en serre jusqu'au stade 2 feuilles puis inoculées par 5 mg de spores de chacun des isolats, suspendues dans de l'huile Novec™ 7100. Les plantules inoculées sont placées 24 h en chambre de rosée à 8°C, puis mises en chambre climatisée : 16 h à 300 µEm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> à 19°C et 8 h à l'obscurité à 15°C. Les types d'infection (TI) sont notés 15 jours après l'inoculation. Un isolat est classé virulent (v) (TI 7 à 9), avirulent (TI 0 à 4), ou intermédiaire (I) (TI 5 à 6) pour les 24 gènes de résistance *Yr* testés.

### ► B. Aptitude thermique des isolats de *Pst*

Nous avons comparé l'effet de la température pour l'efficacité d'infection et la période de latence de 14 isolats : 4 isolats W(-) issus de blé tendre et 4 issus de blé dur et 4 isolats Tri2015 issus de Triticale, un témoin adapté aux températures fraîches (Nord France) et un témoin adapté aux températures chaudes (Sud France) (de Vallavieille-Pope *et al.*, 2018). Pour les isolats W(-), 2 sont V17 et 2 sont A17, représentant les deux principaux variants.

### B.i. Effet de la température sur l'efficacité de l'infection (EI)

Quatre pots de 10 plantules de blé tendre de la variété Michigan Amber sont inoculés avec 1 mg d'urédiniospores de chaque isolat mis en suspension dans 1 mL de Novec 7100, correspondant à 110 spores/cm<sup>2</sup>. Les plantules sont ensuite placées dans une chambre de rosée à différentes températures (5, 10, 15, 20 et 23°C) pendant 24 h. Ensuite, elles sont transférées à 19°C pendant 16 h à 300 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> et 14°C

pendant 8 h de nuit. Etant donné le développement semi-systémique du parasite qui aboutit à la coalescence des lésions, l'EI est estimée précocement en dénombrant le nombre de chloroses sur une surface donnée au milieu de chaque feuille. L'EI est calculée en divisant le nombre de chloroses par le nombre de spores inoculées.

### B.ii. Effet de la température sur la période de latence (PL)

Quatre pots de 10 plantules de blé tendre (Michigan Amber) sont utilisés pour chaque régime de température, froid (période de jour : 16 h à 15°C et période nuit : 8 h à 10°C) ou chaud (période de jour : 16 h à 25°C et période nuit : 8 h à 16°C). L'inoculum, obtenu en mélangeant 1 mg d'urédiniospores de chaque isolat avec 25 mg de poudre de talc, est appliqué localement sur la face adaxiale. Le nombre de plantules présentant des lésions sporulantes est compté quotidiennement du huitième au vingtième jour suivant l'inoculation. La période de latence est évaluée comme le nombre d'heures post-inoculation (hpi) nécessaires à l'apparition de lésions sporulantes sur la moitié des plantules inoculées (de Vallavieille-Pope *et al.*, 2018).

### ► C. Evaluation des résistances au stade plantule de nouvelles lignées

Nous avons testé au stade plantule des variétés des 3 espèces (39 variétés de blé tendre en 2017, 72 en 2018 et 2019, 17 variétés de blé dur en 2017, 2018 et 2019 et 20 variétés de triticale en 2017 et 32 en 2018 et 2019) fournies par les obtenteurs vis-à-vis de 13 races de *Pst* dans les conditions contrôlées de chambres climatiques à INRAE Bioger.

Les spectres de virulence des races inoculées sont : 6E16 (v2,6,7,8), 43E138 (v1,2,3,7,25,Sd), 106E139 (v2,3,4,7,25,Sd,Su), 45E140 (v1,2,3,6,25,Sd), 108E140 (v2,3,4,6,25,Sd,Su), 169E136V17 (v1,2,3,9,17,25,Sd), 232E137 (v2,3,4,9,25,Sd,Su), 233E169V17 (v1,2,3,4,9,17,25,32,Sd,Su) race Robigus, 237E141A17 (v1,2,3,4,6,9,25,Sd,Su), 237E141V17 (v1,2,3,4,6,9,17,25,Sd,Su) race Ornica, 237E173V17 (v1,2,3,4,6,9,17,25,32,Sd,Su) race Oakley/Solstice, 239E175v17 (v1,2,3,4,6,7,9,17,25,32,Sd,Su,Sp(I)) race Warrior1 ou W1 (de Vallavieille-Pope *et al.*, 2012) ainsi que 239E239V17 (v1,2,3,4,7,9,17,25,32,Su) race Warrior(-) ou W(-) et 70E0v8,9,Su (v2,6,7,8,9,SP(I),SU) race Triticale2015 ou Tri2015.

### ► D. Phénotypage du panel de variétés et des révélateurs

Si les résistances au stade plantule sont efficaces tout au long du cycle de culture, certaines résistances, appelées résistances adultes, ne se mettent en place qu'au courant de la phase de montaison des cultures. Ainsi de nombreuses variétés dites sensibles au stade plantule (observations essentiellement réalisées en conditions contrôlées), se montrent résistantes au stade adulte dans les essais d'évaluation variétale. Afin d'évaluer les niveaux des résistances adultes des variétés, 47 essais ont été réalisés sur des panels de blé dur, de triticale et de blé tendre. Certains ont été inoculés avec des races choisies parmi les races majoritaires actuelles, d'autres sont restés en contamination naturelle.

Variétés	Gène Yr (comportement plantule)
Récital	Yr6, (Sensible W1 et W(-))
Talent	Yr7, (Sensible W1 et W(-))
Toisondor	Yr32, (Sensible W1 et W(-))
Rubisko	Yr17, (Sensible W1 et W(-))
Creek	(Résistant W(-), Sensible W1)
Cameleon	(Résistant W(-) et Sensible W1)
Aigle	(Résistant W(-) et Sensible W1)
Ambition	(Résistant W(-) et Sensible W1)
RGT Cesario	(Sensible W(-) et Résistant W1)

**Tableau 1 :** Liste des variétés témoins révélateurs pour les essais au champ de blé tendre et gènes de résistance Yr postulés au stade plantule.

Des panels de variétés de blé tendre, de triticales, de blé dur et des témoins révélateurs (Tableau 1) ont été implantés dans un réseau de 47 essais avec différentes modalités de contamination à la rouille jaune (naturelle / W(-) / W1 / Tri2015) afin d'évaluer leurs niveaux de résistance (Tableau 2). Les témoins révélateurs ont été choisis pour leur comportement différencié au stade plantule vis-à-vis des 2 principales races de rouille jaune présentes W1 et W(-). Leur niveau d'attaque doit être un indicateur des races majoritaires présentes dans les essais.

Races inoculées	Blé tendre Révélateurs	Blé dur Panel	Triticale Panel
Naturelle	12	12	8
Tri2015	4	1	6
W(-)	13	12	7
W1	13	7	12
W1 et W(-)	3	2	1
<b>Total</b>	<b>45</b>	<b>34</b>	<b>34</b>

**Tableau 2 :** Nombre d'essais au champ du panel de variétés de blé tendre, triticales et blé dur pour les campagnes 2017, 2018 et 2019.

Les symptômes de rouille jaune ont été notés sur les feuilles supérieures et lorsque cela était possible sur les épis, avec une échelle de sévérité de 1 à 9 ou de 0 à 10 suivant les lieux puis transformés de 0 à 10 pour la synthèse. Sur chaque lieu, la notation la plus discriminante, ou la moyenne de plusieurs notations discriminantes, a été retenue pour la synthèse.

## ► E. Phénotypage des populations recombinantes de triticales et géniteurs potentiels

### E.i. Phénotypage des populations de triticales

Le niveau de résistance à la rouille jaune des triticales a été étudié sur des populations de lignées recombinantes Résistante x Sensible issues de Single Seed Descent (SSD) ou d'haplodiploïdes (HD) (Tableau 3).

Population Parent Résistant x Parent Sensible	Méthode
Maximal x S W Talentro	HD
Vuka x Kaulos	SSD
Vuka x RT 10013	SSD
Vuka x Tref	SSD

**Tableau 3 :** Populations de triticales.

Les niveaux de résistance au stade adulte sur feuille et sur épi ont été notés au champ dans des pépinières des sélectionneurs sur 4 sites avec une inoculation de 2 races de *Pst* selon la répartition donnée au Tableau 4. Des plantules de Victo, produites par le GEVES/SNES à partir d'isolats fournis par l'INRAE Bioger, ont été utilisées comme contaminateur. Les populations ont été implantées en 2 lignes x 2 répétitions par génotype. Le phénotypage a été réalisé selon une échelle de notation de 1 à 9, la note 1 correspondant à l'absence de symptômes et la note 9 à des plantes très sensibles.

Site	Zone	Département	Race année 1	Race année 2
Cappelle en Pévèle	Nord	59	W1	W1
Auchy lez Orchies	Nord	59	W1	W1
Druelle	Sud	12	W(-)	Tri2015
Clermont-Ferrand	Sud	63	W1 et W(-)	Tri2015

**Tableau 4 :** Sites d'implantation des populations de triticales et races inoculées.

## E.ii. Phénotypage des triticales primaires et seigles

Six seigles et 18 triticales primaires choisis, dérivant de blés résistants à la rouille jaune (Bermude, Apache, Folklor, Azzerti...), ont été également étudiés en 2017 et 2018 à Clermont-Ferrand en contamination naturelle. En 2019, certains des triticales primaires ont été aussi évalués en inoculation artificielle à Cappelle en Pévèle (race W1) et Druelle (race Tri2015).

## ► F. Phénotypage des populations recombinantes de blé dur

### F.i. Populations blé dur

Les quatre obtenteurs de blé dur ont fourni une population biparentale issue d'un croisement entre une variété sensible à la rouille jaune sur feuille et un parent résistant (Tableau 5). Ces populations ont été construites par la méthode SSD. Chaque obtenteur était responsable du maintien et de la fourniture en semences des individus de la population qu'il a créée.

Lors des dernières années à forte pression rouille jaune, il n'a pas été observé de différences significatives quant à la résistance à la rouille jaune sur épis et sur feuilles pour le blé dur. La présente étude se limitera donc à la caractérisation de la résistance sur feuille.

Les quatre populations ont été caractérisées pour leur comportement vis-à-vis de la rouille jaune pendant deux années (Tableau 5).

Population Parent Résistant x Sensible	Effectif (+ parents)	Année 1	Année 2	Année 3
Nobilis x Fabulis	188	x	x	x
RGT Nomur x Miradoux	230	x	x	-
Pastadou x Miradoux	227	x	x	-
Ovidio x Glucodur	231	-	x	-

**Tableau 5 :** Parents des populations de blé dur et année de phénotypage.



Les populations ont été implantées chez les obtenteurs de blé dur dans quatre sites différents (Tableau 6). Chaque site a été inoculé avec des plantules contaminées par les races W1 et/ou W(-). Chaque population est ainsi présente dans deux sites pour chacune des races utilisées.

Site	Département	Race
Verneuil (LG)	77	W1 et W(-) ; W(-) en année 3)
Montbartier (R2N)	82	W(-)
Grisolles (Syn)	82	W(-)
Lectoure (FD)	32	W1

**Tableau 6 :** Sites d'implantation des populations de blé dur et races inoculées.

La population Ovidio x Glucodur n'a pas pu être fournie dès la première année de projet, c'est pourquoi son phénotypage a été réalisé en deuxième et troisième année. Les trois populations les plus pertinentes au regard des données phénotypiques disponibles ont été génotypées. Le moindre polymorphisme observé dans la population Ovidio x Glucodur a conduit à ne pas la retenir. Compte tenu de la résistance apportée par Nobilis et de la faible pression observée en 2017, la population Nobilis x Fabulis a été phénotypée la troisième année.

Le même dispositif a été mis en place sur chaque site. La variété de blé tendre Victo, très sensible à la rouille jaune, a été utilisée comme contaminateur où des plantules contaminées ont été repiquées. Chaque génotype a été semé en deux répétitions de deux lignes de 1,5 m. Compte tenu de la faible disponibilité en semences pour une troisième année de phénotypage de la population Nobilis x Fabulis, seules deux répétitions d'une seule ligne ont pu être implantées. Sur le site de Verneuil, Limagrain a préféré opter pour une répétition de deux lignes.

L'ensemble des obtenteurs ont utilisé une échelle de notations de 1 à 9, la note 1 correspondant à l'absence de symptômes et la note 9 à des plantes complètement malades (Tableau 7).

Des prélèvements de feuilles ont été réalisés chaque année dans les différents sites d'expérimentation et confiés à l'INRAE pour contrôler la race de *Pst* présente dans le périmètre de contamination artificielle, ainsi que pour identifier les races naturellement présentes sur le site.

Note	% de plantes affectées	% de surface foliaire atteinte
1	Absence de dégâts	-
2	Traces	-
3	25	10
4	50	25
5	100	50
6	100	60
7	100	75
8	100	90
9	100	100

**Tableau 7 :** Echelle de notation de l'intensité de rouille jaune utilisée sur le blé dur.

## 2 Résultats

### ► A. Analyse des populations de *Puccinia striiformis*

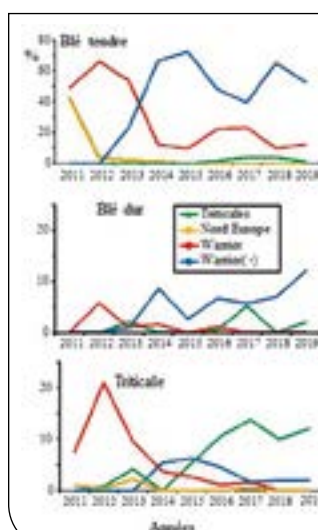
#### A.i. Virulences des isolats de *Pst*

Nous avons caractérisé 149 isolats de *Pst* en 2017 (107 isolats issus de blé tendre, 16 isolats de blé dur et 26 isolats de triticales), 100 isolats en 2018 (80 isolats de blé tendre, 7 isolats de blé dur et 12 isolats de triticales) et 249 isolats en 2019 (178 isolats de blé tendre, 36 isolats de blé dur et 35 isolats de triticales). Sur triticales et blé dur, le nombre d'échantillons collectés est inférieur à ceux sur blé tendre.

Les 7 génotypes (PstSx) détectés permettent de distinguer les races comme décrit dans Ali *et al.* (2017) : races du type Nord européen (PstS0), Kranich (PstS8), Warrior1 (PstS7), Warrior(-) (PstS10), Warrior/Kranich (PstS15) et Triticales (PstS4, PstS13), mais la distinction entre les variants de W(-) nécessite le pathotypage sur une gamme d'hôtes différentiels.

L'évolution des races observées en France depuis 2009 montre la décroissance des anciennes races européennes et l'apparition des races W1 en 2011, W(-) en 2013 qui domine depuis 2014 et des trois races Triticales (Tri2006, Tri2015 et Tri2016). La race Kranich, détectée en Scandinavie à partir de 2011, est restée très minoritaire sur notre territoire. De plus, une race atypique PstS15 a été observée à faible fréquence en 2012. Depuis 2014, les deux races principales sur blé tendre sont W(-) et dans une moindre mesure W1. La fréquence de W1 et W(-) est relativement stable en 2018 et 2019. La race W(-) représente 47 % de la population française en 2017, 74 % en 2018 et 67 % en 2019. La fréquence de W1 diminue depuis 2012, représentant en 2017 environ 25 % de la population nationale, 11 % en 2018 et 12 % en 2019. La race Tri2015 atteint 23 % de la population nationale en 2017, 14 % en 2018 et 15 % en 2019.

La fréquence des races évolue en fonction des espèces cultivées. Sur le blé tendre, W(-) domine (40 % en 2017, 65 % en 2018 et 75 % en 2019 (Figure 1). La fréquence de W1 (23 % environ en 2017) a baissé à 10 % en 2018 et revient à 17 % en 2019. La race Tri2015 est quasiment absente.



**Figure 1 :** Evolution des races de *Puccinia striiformis* en France entre 2011 et 2019 par espèce. Nombre d'échantillons : blé tendre : 124 en 2017, 81 en 2018, 144 en 2019 ; blé dur : 20 en 2017, 7 en 2018, 21 en 2019 ; triticales : 31 en 2017, 12 en 2018, 25 en 2019. Races Triticales = cumul des races Tri2006, Tri2015 et Tri2016.

Sur le blé dur, W(-) domine (83 % des isolats). W1 était présente en 2016 mais n'a plus été détectée depuis. La race Tri2015 qui n'a pas été observée en 2018, est présente en 2019 avec 14 % des isolats.

Pour les cultures de triticales, la race Tri2015 domine en 2017, 2018 et 2019 (86 %). Seuls quelques isolats identifiés W(-) sont détectés les trois années (14 % en 2019), mais W1 n'est plus détectée depuis 2017.

La répartition des races varie également en fonction de la provenance géographique. En 2016, 2017 et 2018, les isolats de races Triticales proviennent majoritairement de la partie Sud du pays, toutefois cette observation est basée sur un faible effectif. En 2019, la tendance s'inverse : 61 % des isolats sont originaires du centre et du Nord de la France. Les isolats des races W1 et W(-) sont surtout originaires du centre et du Nord de la France mais pas exclusivement : 27 % des isolats de W(-) proviennent du Sud de la France en 2019. A l'échelle européenne, la tendance est la même qu'en France, avec la dominance de W(-) devant la race W1. La race Tri2015 est observée davantage dans les pays du Sud, Espagne et Italie, mais est détectée également en Scandinavie.

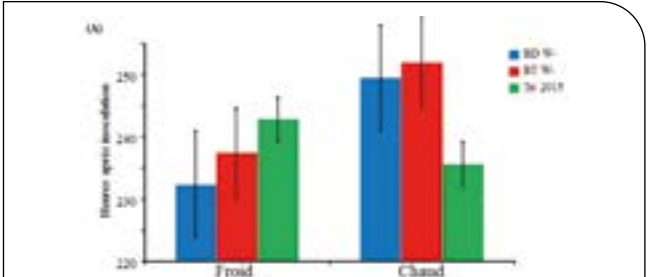
Le spectre de virulences des races détectées entre 2016 et 2019 est donné dans le Tableau 8. W(-) possède moins de virulences que W1 ; W(-) est avirulente sur Ambition et d'autres variétés françaises et se distingue en deux catégories V17 (virulent) et A17 (avirulent) sur le gène de résistance Yr17. La race Kranich, caractérisée par A4 (avirulence sur Yr4) et V8 (virulence sur Yr8), toujours marginale en France, a disparu. Les 3 races Triticales portent moins de virulences que les races Warrior et ont des virulences spécifiques : Tri2006 qui possède V10 et V24 n'est plus détectée ; Tri2015 et Tri2016 se distinguent par V3 et V25 présentes chez Tri2016 et absentes chez Tri2015. En 2018 et 2019 sur les triticales, on n'observe que la race Tri2015, la plus fréquente déjà en 2017.

La distinction des spectres de virulences des races W1, W(-) et Triticales est possible au stade plantule avec certaines variétés. W1 contourne Ambition, Aigle, Caméléon et Creek et n'attaque pas KWS Sterling et RGT Cesario, alors que W(-) contourne RGT Cesario mais n'attaque pas Ambition, Aigle, Caméléon et Creek. De plus, la race W(-)A17 attaque spécifiquement Nemo. Les races Triticales n'attaquent pas Ambition, Aigle, Caméléon, Creek et RGT Cesario (Tableau 8).

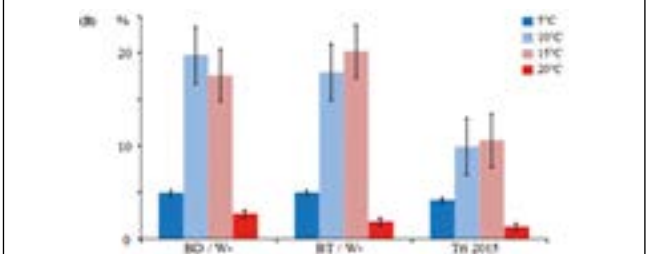
## A.ii. Aptitude thermique d'isolats de Pst

La qualité de l'expérimentation sur les aptitudes thermiques est validée par le comportement des isolats témoins : les isolats Sud-France, adaptés au régime chaud, ont une période de latence longue au froid et courte au chaud et à l'inverse les isolats témoins Nord-France, adaptés aux zones tempérées, ont une période de latence longue sous le régime chaud et courte sous le régime froid. Sous le régime de température chaud, la période de latence des isolats Tri2015 (issus de triticales) est plus courte que celle des isolats W(-), issus de blé dur et de blé tendre (Figure 2A). Sous le régime de température froid, les isolats Tri2015 ont une période de latence plus longue qu'au chaud. La race Tri2015 apparaît plus efficace au chaud que W(-) par sa période de latence plus courte.

Aucune infection n'est observée à 23°C. L'efficacité d'infection de W(-) est égale pour les isolats issus de blé dur et de blé tendre. Les isolats de Tri2015 ont une efficacité d'infection plus faible à 10 et 15°C que les isolats W(-) (Figure 2B). L'avantage des isolats Tri2015 est leur rapidité par une plus courte période de latence au chaud, mais leur efficacité d'infection est moindre que celle de W(-) aux températures moyennes.



**Figure 2A :** Période de latence (hpi) des isolats W(-) et Tri2015, issus de blé dur (BD), blé tendre (BT) et triticales, sous les régimes de température froid (10°/15°C) et chaud (16°/25°C).



**Figure 2B :** Efficacité d'infection (%) des isolats W(-) et Tri2015, issus de blé dur (BD), blé tendre (BT) et triticales à 4 températures.

Races	Virulences																			
	1	2	3	4	6	7	8	9	10	17	24	25	27	32	SD	SP	Su	Amb	Ster	Aig
Warrior 1	1	2	3	4	6	7	-	9	-	17	-	25	-	32	Sd	(Sp)	Su	Amb	-	Aig
Warrior(-) V17	1	2	3	(4)	6	7	-	9	-	17	-	25	-	32	Sd	Sp	Su	-	-	-
Warrior(-) A17	1	2	3	(4)	6	7	-	9	-	-	-	25	-	32	Sd	Sp	Su	-	-	-
Kranich	1	2	3	-	6	7	8	9	-	17	-	25	-	32	SD	-	-	Amb	(Ster)	Aig
W1 / Kranich	1	2	3	-	6	7	-	9	-	17	-	25	-	32	SD	-	-	Amb	-	Aig
Triticale 2006	-	2	-	-	6	7	8	9	10	-	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Triticale 2015	-	2	-	-	6	7	8	9	-	-	-	-	-	-	-	(Sp)	Su	-	-	-
Triticale 2016	-	2	3	-	6	7	(8)	9	-	-	-	25	-	-	-	(Sp)	Su	-	-	-

SD = Strubes Dickkopf, SP = Spaldings Prolific, Su = Suwon 92 x Omar, Amb =Ambition, Ste, Sterling, Aig =Aigle, Cam = Carneleon, Cre = Creek, Ces= RGT Cesario

**Tableau 8 :** Spectre de virulences des races de Pst isolées en 2016-2019 sur blé tendre, blé dur et triticales.

► **B. Niveau de résistance au stade plantule des variétés**

La synthèse des 3 années montre que 44 % des variétés de blé tendre sont résistantes à toutes les anciennes races (PstSO, Nord-européen) et seulement 6 variétés sur 143 sont sensibles à toutes les anciennes races. Peu de variétés de blé tendre sont sensibles à la race Tri2015 (9 %) (Tableau 9). Par contre un grand nombre est sensible à W1 ou W(-), 56 et 57 %, respectivement. Pour le blé dur, beaucoup sont résistantes à toutes les anciennes races (69 %). 38 % sont sensibles à Tri2015, seulement 15 % à W1 mais plus de la moitié sont sensibles à W(-) (52 %). Pour le triticale, pratiquement toutes les variétés sont résistantes à toutes les anciennes races (97 %). 32 % sont sensibles à Tri2015, 23 % à W1 et seulement 16 % à W(-). Une même variété peut être résistante ou sensible à plusieurs races, ce qui explique que le tableau n'apparaisse pas équilibré.

De nouvelles variétés, sensibles ou devenues sensibles au champ, Amboise et Orloge, ne sont attaquées que par le nouveau variant de W(-) (V17 VNemo). Les variétés Filon et Soliflor CS sont plutôt attaquées par des races V17. RGT Lexio et RGT Distingo sont sensibles à toutes ou pratiquement toutes les nouvelles races. Nemo et la variété Danoise Kalmar sont sensibles aux mêmes variants W(-) (A17 ou V17 VNemo) (Tableau 10).

► **C. Phénotypage du panel variétés et des révélateurs**

Des races sont arrivées naturellement sur les essais, malgré de faibles pressions naturelles de rouille jaune en 2017, 2018 et 2019. En raison de ces contaminations externes sur la plupart des essais, l'analyse du comportement des variétés au stade adulte vis-à-vis de chacune des principales races visées dans le projet doit être considérée avec précaution.

**C.i. Témoins révélateurs**

Seules les variétés présentant des comportements contrastés au stade adulte vis-à-vis des différentes races de rouille jaune ont pu être utilisées comme témoins révélateurs de la présence des races. Ambition, et dans une moindre mesure Creek, sont de bons révélateurs permettant de distinguer les races W1 à laquelle ils sont sensibles de W(-) à laquelle ils sont résistants. En revanche, Aigle, Cameleon, et RGT Cesario ne sont pas de bons révélateurs en raison de leurs faibles niveaux de sensibilité au stade adulte. Bien que sensible au stade plantule, Rubisko est assez résistant au stade adulte à W1 et W(-).

Les races Tri2015 et W(-)VNemo étant apparues en France au début du projet, d'autres variétés révélatrices ont dû être utilisées. La variété Nemo, très sensible au stade adulte au variant de la race W(-)VNemo, mais résistante à l'autre variant de W(-), a été utilisée. Des variétés de triticale, et

Espèce	Variété	Effectif	Résistantes aux anciennes races (%)	Sensibles aux nouvelles races (%)					
				Trit 2015	W1	W-			
						A17 ANemo	V17 ANemo	A17 VNemo	V17 VNemo
Blé tendre	Révélateurs	10	10	10	90	60	60	78	78
	Panel	10	50	10	60	40	67	56	86
	Variétés	123	46	9	53	38	53	52	77
Ble dur	Panel	10	80	50	20	67	60	50	67
	Variétés	16	62	31	12	44	50	50	-
Triticale	Panel	12	92	58	25	18	20	20	-
	Variétés	26	100	20	11	8	0	0	-

**Tableau 9 :** Bilan des résistances des variétés de blé tendre, blé dur et triticale testées au stade plantule vis à vis de 13 races de Pst en conditions contrôlées.

Variétés	Races							
	Warrior	Warrior (-)				Triticale 2015	Warrior /Kranich	Kranich
		All ANemo	All VNemo	V17 ANemo	V17 VNemo			
Ambition	S	R	R	R	R	R	S	S
VPM 1	I	R	R	S	S	R	S	I
Aigle	S	R	S	R	S	R	S	S
Némo	R	R	S	R	S	R	R	R
Kalmar	R	R	S	R	S	R	R	R
Amboise	R	R	R	R	S	R	R	R
Orloge	R	R	R	R	I	R	R	R
Soldor CS	S	R	S	I	S	R	I	I
Filon	S	R	R	I	S	R	S	R
RGT Lexio	S	S	S	S	S	S	S	S
RGT Distingo	S	S	S	S	S	R	S	S

**Sensible**    **Intermédiaire**    **Résistant**

**Tableau 10 :** Réaction de résistance (R), sensibilité (S), Intermédiaire (I) au stade plantule des nouvelles variétés différentielles de blé vis-à-vis des races de Pst présentes en France depuis 2011 dont quatre variants de W(-).



en particulier Bienvenu, ont été utilisées pour mettre en évidence la présence de la race Tri2015. Au total, 30 essais triticales et 25 essais blé dur ont été conservés pour leur capacité à discriminer les niveaux de résistance des variétés à la rouille jaune. Ces essais ont été regroupés en fonction des intensités de symptômes observées sur les témoins révélateurs permettant de postuler les principales races présentes.

### C.ii. Le panel triticales

On observe que les variétés de triticales présentent un comportement contrasté entre les essais contaminés par la race Tri2015, à laquelle elles apparaissent plus sensibles, et les essais touchés uniquement par les races W(-) et W1. Triskell et Vuka sont résistantes à toutes les races présentes, y compris à Tri2015. GD13th27 et Anagram présentent également de bons niveaux de résistance. A l'opposé, Kaulos et RT 10013 figurent parmi les variétés les plus sensibles, en particulier vis-à-vis de Tri2015. Parmi les plus touchés en présence de Tri2015, Bienvenu est quasiment indemne de rouille jaune dans les essais contaminés uniquement par les races Warrior.

La plupart des variétés de triticales du panel sont indemnes de rouille jaune dans les essais W1. Cette race pourrait être peu virulente sur triticales au stade adulte. Mais avec seulement 2 essais identifiés comme contaminés avec W1 uniquement, cette observation mériterait d'être confirmée. En revanche, la race W(-) semble également virulente sur la plupart des variétés de triticales, même si les intensités d'attaque sont plus faibles qu'en présence de Tri2015 (Tableau 11).

### C.iii. Panel blé dur

Luminur apparaît comme la variété de blé dur la plus sensible aux races de rouille jaune présentes dans les essais 2017, 2018 et 2019, suivie par Miradoux et Relief (Tableau 12). Casteldoux, Fabulis, Pastadou, RGT Nomur, Glucodur et Anvergur présentent régulièrement des symptômes qui restent modérés dans la plupart des situations. Ces variétés possèdent probablement d'assez bons niveaux de résistance partielle. Nobilis est quasiment indemne de rouille jaune dans tous les essais. Les variétés de blé dur du panel ne semblent pas présenter de différence significative de niveau de résistance au stade adulte vis-à-vis des races Tri2015, Warrior1 et Warrior(-).

	Races postulées nb essais	T15	W-	W1	T15 W1	W1W- VNémo	T15 W-Nemo
		11 essais	6 essais	2 essais	7 essais	3 essais	1 essai
Blé tendre révélateur	VICTO	111	126	153	122	138	115
	RECITAL	67	109	96	106	89	99
	TOISONDOR	52	104	132	89	124	71
	CREEK	0	1	48	50	17	5
	AMBITION	1	4	102	66	60	16
	NEMO	1	9	0	29	91	71
	TALENT	10	53	71	65	42	77
Triti. révé.	SW TALENTRO	157	62	20	83	49	115
	BIENVENU	117	6	0	55	9	99
Panel triticales	KAULOS	97	36	15	66	27	82
	RT 10013	110	42	0	60	19	88
	COSINUS	37	30	0	60	11	55
	KEREON	35	22	13	45	11	55
	MAXIMAL	18	16	0	49	9	77
	TREFL	46	17	0	31	5	55
	ANAGRAM	30	3	0	22	2	38
	GD13th27	14	4		8	2	11
	VUKA	3	1	0	2	0	5
	TRISKELL	0	0	0	3	0	0

**Tableau 11 :** Notes de sévérité de rouille jaune sur le panel triticales, exprimées en % de la moyenne des variétés sensibles (Victo, Réctal, Toisonдор, SW Talentro) et regroupées selon les postulats de races majoritaires sur les essais.

	Races postulées nb essais	T15	W-	W1	T15 W1	W1W- VNémo	T15 W-Nemo
		3 essais	7 essais	5 essais	3 essais	5 essais	2 essais
Blé tendre révélateur	TOISONDOR	82	96	101	105	107	110
	VICTO	120	115	126	131	123	130
	RECITAL	82	100	94	110	89	110
	CREEK	0	2	27	66	18	61
	AMBITION	0	5	69	78	36	90
	NEMO	0	11	2	16	75	32
Panel blé dur	LUMINUR	110	87	64	60	81	50
	RELIEF	69	48	29	20	52	62
	MIRADOUX	36	58	28	35	50	59
	CASTELDOUX	26	32	20	25	19	74
	FABULIS	26	31	12	20	19	77
	RGT NOMUR	23	21	11	24	21	52
	OVIDIO	37	20	11	27	13	42
	PASTADOU	14	11	5	10	15	52
	GLUCODUR	13	8	3	8	14	47
	ANVERGUR	0	10	3	2	12	44
	NOBILIS	1	0	0	0	2	7

**Tableau 12 :** Notes de sévérité de rouille jaune sur le panel blé dur, exprimées en % de la moyenne des variétés sensibles (Victo, Réctal, Toisonдор, Luminur) et regroupées selon les postulats de races majoritaires sur les essais;

#### ► D. Phénotypage des populations de triticales au champ

La matrice de corrélation entre la sévérité de rouille jaune observée sur les sites d'étude (Tableau 13), montre une bonne corrélation entre les sites Nord (FD, Cappelle en Pévèle et LD, Auchy lez Orchies) et le site Sud (RAGT, Druelle), mais indique que le deuxième site Sud (AO, Clermont Ferrand) est peu corrélé aux autres sites.

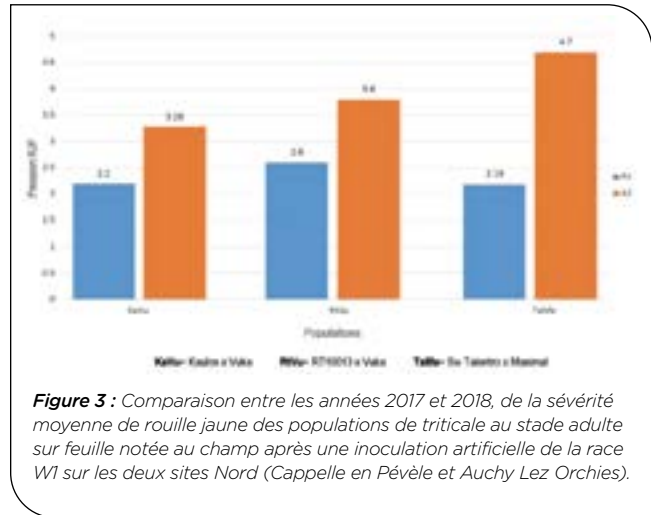
r Population	AO	FD	LD	RAGT
AO	1	-0,053	0,059	-0,100
FD	-0,053	1	<b>0,804</b>	<b>0,760</b>
LD	0,059	0,804	1	<b>0,703</b>
RAGT	-0,100	0,760	0,703	1
Race	Tri2015	W1	W1	Tri2015

**Tableau 13 :** Matrice de corrélation entre la sévérité de rouille observée sur les différents sites d'étude Nord (FD : Cappelle en Pévèle et LD : Auchy Lez Orchies).

On observe des résultats non corrélés entre les sites RAGT et AO de la zone sud alors que la souche inoculée est la même. Sur le site de RAGT, l'inoculation semble pourtant avoir réussi si on regarde les résultats des prélèvements de feuilles. Ces résultats questionnent sur la race qui se serait développée sur le site AO.

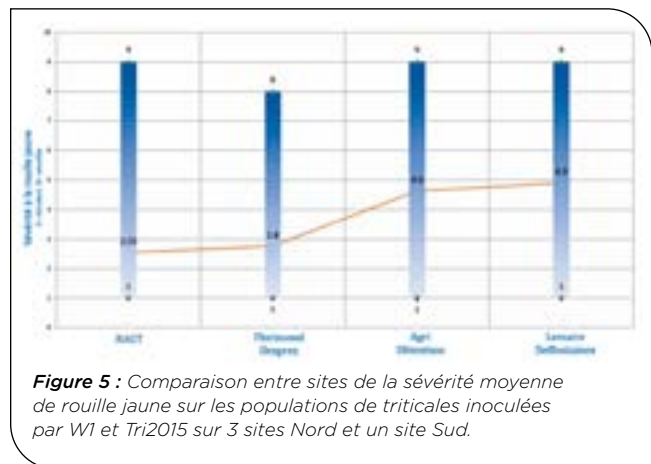
La Figure 3 montre la comparaison de la pression de rouille jaune moyenne sur les deux sites nord entre les phénotypages réalisés en 2017 (A1) et 2018 (A2). La sévérité causée par la race W1 est plus importante en 2018 qu'en 2017. La race Tri2015 n'ayant été utilisée qu'à partir de l'année 2, la comparaison n'a pu être réalisée.

En 2019 (A3), la rouille jaune s'est bien implantée sur les quatre sites d'étude permettant un phénotypage de qualité, aboutissant aux résultats présentés avec la Figure 4. Nous pouvons observer un bon gradient de sensibilité s'étalant de la note 1 (résistant) à la note 7 (sensible).

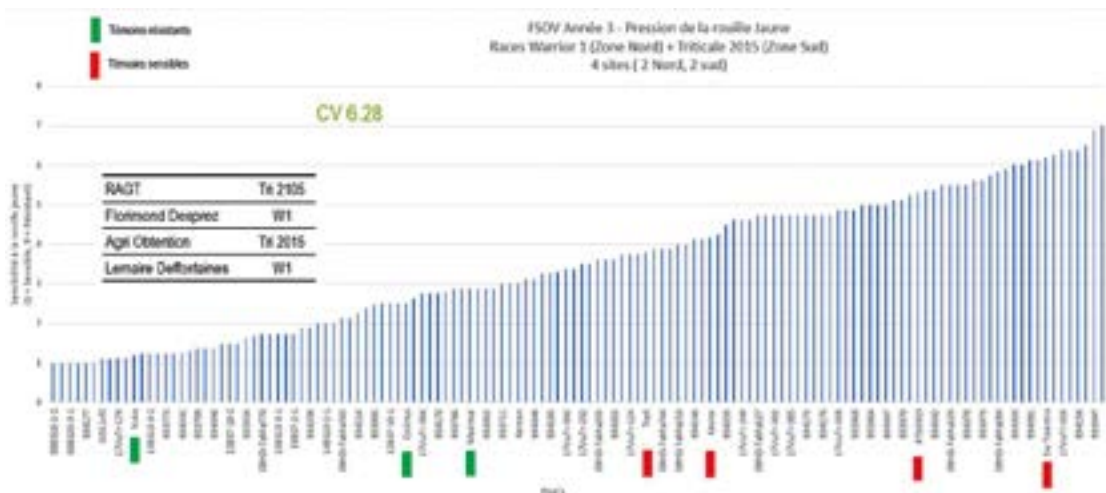


**Figure 3 :** Comparaison entre les années 2017 et 2018, de la sévérité moyenne de rouille jaune des populations de triticales au stade adulte sur feuille notée au champ après une inoculation artificielle de la race W1 sur les deux sites Nord (Cappelle en Pévèle et Auchy Lez Orchies).

Les témoins révélateurs de résistance (Cosinus, Maximal, Vuka) ou de sensibilité (Kaulos, RT10013, SW Talentro et Trefl) montrent des comportements attendus et viennent conforter l'idée d'une bonne représentativité de la sévérité de la rouille jaune l'année. La ségrégation observée montre une résistance quantitative dans les parents.

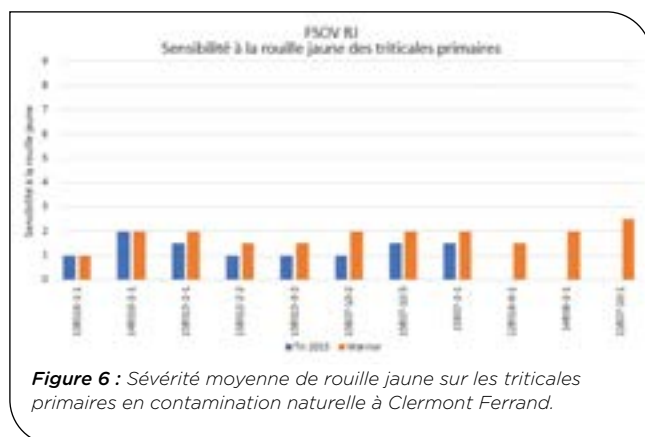


**Figure 5 :** Comparaison entre sites de la sévérité moyenne de rouille jaune sur les populations de triticales inoculées par W1 et Tri2015 sur 3 sites Nord et un site Sud.



**Figure 4 :** Ségrégation de la sévérité de rouille jaune en 2019 dans les quatre populations recombinantes Sensible x Résistant de triticales inoculées par W1 sur 2 sites en zone nord et par Tri 2015 sur 2 sites en zone sud;

Le panel de triticales primaires qui dérivent de blés résistants à la rouille jaune montre une très bonne résistance dans un contexte contaminant (Figure 6).



**Figure 6 :** Sévérité moyenne de rouille jaune sur les triticales primaires en contamination naturelle à Clermont Ferrand.

Ces résultats sont donc satisfaisants. Cependant, le transfert de ces résistances potentielles au niveau hexaploïde n'est pas assuré du fait qu'on ne connaît pas leur localisation : génomes A et B (conservés), génome D (perdu) ou génome R (nouvelles résistances potentielles) ? De plus, l'expression dans un autre contexte génétique peut être modifiée.

#### ► E. Phénotypage des populations de blé dur

Le Tableau 14 résume les niveaux de rouille jaune observés dans les différents sites au cours des trois années du projet. Malgré le recours à des inoculations artificielles, les niveaux de symptômes ont été assez modérés. Ceci est directement en lien avec les conditions météorologiques qui conditionnent le développement de la maladie.

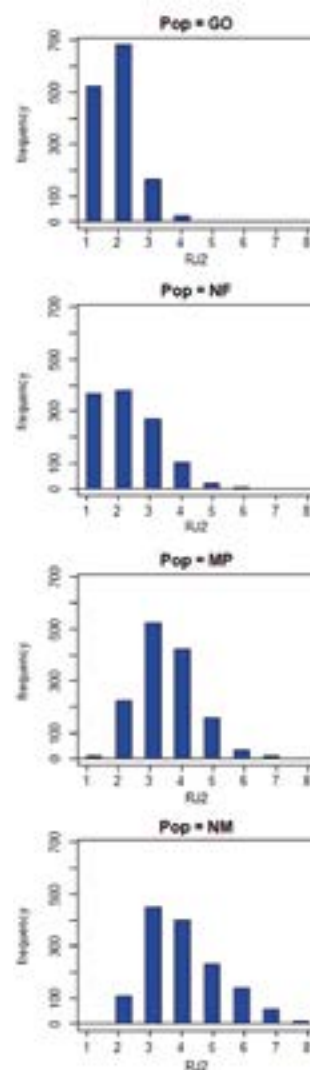
Site	2017	2018	2019
Verneuil (LG-77)	1,7	3	4,7
Montbartier (R2N-82)	2,3	2,5	-
Grisolles (SYN-82)	3,4	-	-
Lectoure (FD-32)	2,5	3,2	2

**Tableau 14 :** Moyennes observées de sévérité de rouille jaune sur les différents sites d'implantation de blé dur (Note de 1 indemne / résistant à 9 très touché/sensible).

Lorsque l'on s'intéresse aux différences entre populations, tous sites confondus, on observe également des niveaux moyens assez variables (Tableau 15 et Figure 7).

Site	Moyenne	ET	Gamme
Nobilis x Fabulis (NF)	2,2	1,1	1 à 6
RGT Nomur x Miradoux (NM)	4	1,3	1 à 8
Miradoux x Pastadou (MP)	3,5	1	1 à 7
Ovidio x Glucodur (GO)	1,8	0,7	1 à 4
<b>Toutes populations</b>	<b>2,9</b>	<b>1,4</b>	

**Tableau 15 :** Moyennes observées de sévérité de rouille jaune pour les différentes populations de blé dur (tous sites confondus) (Note de 1 indemne/ résistant à 9 très touché).



**Figure 7 :** Répartition des notations de sévérité de rouille jaune sur blé dur par population (Note de 1 indemne/ résistant à 9 très touché/sensible).

A l'issue des premières années de phénotypage, il était prévu de sélectionner trois des quatre populations en fonction des données phénotypiques recueillies pour le génotypage et la recherche de QTLs. Les résultats obtenus nous ont amenés à écarter la population Ovidio x Glucodur. Elle a donc été remplacée par la population Nobilis x Fabulis que les partenaires ont jugé utile d'évaluer plus avant en 3<sup>ème</sup> année.

L'ensemble des notations réalisées sur blé dur au cours de ce projet ont été compilées afin d'étudier les corrélations entre années (Tableau 16). Bien qu'il s'agisse de races différentes (W(-) à Verneuil et W1 à Lectoure), on observe une très bonne corrélation entre les phénotypages rouille jaune réalisés en 2019 sur ces deux sites (RJ\_19\_VER et RJ\_19\_LEC).

Ces notations 2019 sont également bien corrélées avec celles réalisées en 2018 à Lectoure, Montbartier et Grisolles. En revanche, le tableau 16 met en évidence le comportement atypique des notations 2018 de Verneuil. Enfin, les corrélations avec l'année 2017 sont peu satisfaisantes. Cela s'explique par la trop faible pression rouille jaune observée en 2017.



	RJ_17_GRI	RJ_17_LEC	RI_17_MBT	RJ_17_VER	RJ_18_LEC	RI_18_MBT	RJ_18_VER	RJ_19_LEC
RJ_17_GRI								
RJ_17_LEC	-0,04883949							
RI_17_MBT	0,27382326	-0,13214577						
RJ_17_VER	0,16328283	-0,19692195	0,45155054					
RJ_18_LEC	0,08515739	0,02542504	0,13154225	0,17049835				
RI_18_MBT	-0,11408602	0,00489119	0,08623566	0,19595185	0,60039654			
RJ_18_VER	0,12831045	-0,00929899	0,20124435	0,09811544	-0,05841145	-0,17271055		
RJ_19_LEC	0,05613077	0,04001036	0,0427121	0,11289393	0,58189902	0,64814242	-0,1427676	
RJ_19_VER	-0,09122443	0,02304389	0,0128059	0,17916149	0,65510385	0,69955972	-0,11636837	0,74548988

**Tableau 16 :** Matrice de corrélations pour les notations rouille jaune pour les 3 années du projet.

Par ailleurs, les corrélations entre répétitions pour un même site sont assez élevées.

Des races différentes de rouille jaune (W1 et W(-)) ont été utilisées dans les sites d'expérimentation blé dur. Aucun comportement spécifique n'a été mis en évidence entre sites concernés par la même race. Cela laisse penser à des mécanismes de résistance communs pour les deux races utilisées.

On retrouve les mêmes lignées identifiées comme étant les plus résistantes dans tous les lieux, et inversement en bas de tableau avec les lignées les plus sensibles. Ces corrélations entre expérimentations et entre année est un prérequis à la recherche de QTLs associés à la résistance à la rouille jaune.

## ► F. Recherche de QTL de résistance chez le blé dur et le triticale

### F.i. Blé dur

Une carte génétique a été réalisée pour la population RIL F6 de blé dur Nomur x Miradoux (214 individus) avec 676 marqueurs polymorphes de la puce AXIOM 35K à l'aide du logiciel Mapdisto. La carte obtenue couvre tous les chromosomes sauf le 7A. Elle présente

une bonne colinéarité avec les 5 cartes obtenues par D Milliot-Stoclin.

Neuf zones de résistance ont été mises en évidence par la recherche de QTL réalisée, avec le package Rqtl, sur les données de phénotypage (4 lieux- 3 années) des 3 populations RIL, Miradoux x Pastadoux, Nobilis x Fabulis et Nomur x Miradoux. Un QTL majeur de résistance à la rouille jaune multi-années (2018-2019) et multi-lieux (Verneuil, Montbardier, Lectoure) a été mis en évidence à la position de 50cM sur le chromosome 1B de la population NF (LOD max 26,1, 48,2 % de l'AUDPC (aire sous la courbe de progression de maladie)). Ce QTL est contigu à un QTL spécifique de l'année 2017 en position 80,5cM sur le même chromosome. Le parent donneur du QTL 1B est Nobilis avec des effets maximums de respectivement -7,7 points pour l'AUDPC de Verneuil 2018 et -15 points pour l'AUDPC de Lectoure 2019.

Le QTL 1B est confirmé par génétique d'association. Une analyse de génétique d'association réalisée avec 2689 marqueurs SNP polymorphes entre les 3 populations (657 individus) à l'aide du package R GAPIT a mis en évidence plusieurs MTA (associations de marqueur et caractère) dont certains colocalisent avec les QTL 1B au seuil de Bonferroni de  $1,86 \cdot 10^{-5}$ .

	QTL	pops	Lieux	Années	% AUDPC max	Effet max AUDPC	Donneur
<b>meta QTL 1B</b>	<b>11</b>	<b>NF</b>	<b>MVL</b>	<b>17, 18, 19</b>	<b>48,20%</b>	<b>-15</b>	<b>Nobilis</b>
meta QTL 7B	11	PM et NM	M, V, L	17 et 18	11,90 %	-3,97	Miradou
meta QTL 5B	7	PM et NM	M, V	17 et 18	11,10 %	-4,1	Pastadou et Nomur
meta QTL 2B	7	PM	MVL	17, 18	9,80 %	-4,27	Miradou
meta QTL 4A	8	NM et NF	CVML	17 ; 18	8,20 %	-3,5	Nomur et Nobilis
meta QTL 6B	6	NM et NF	GMV	17, 18	7,80 %	-3,4	Nomur et Nobilis
	QTL 7A	NF	Monbartier	2019	8,40 %	-4,4	Nobilis
	QTL 2A	PM	Verneuil	2017	6,92 %	-0,39	Pastadoux

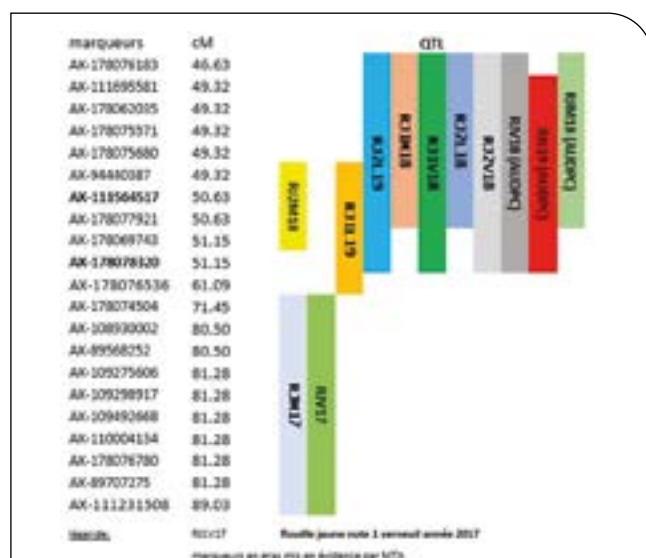
**Tableau 17 :** Recherche de QTL dans trois populations recombinantes de blé dur.

MTA	Chrom.	Position blé tendre	Lieux	Années	Effet max AUDPC	Donneur	
<b>AX-111564517</b>	<b>1B</b>	<b>327237899</b>	<b>M et V</b>	<b>2018</b>	<b>-4,12</b>	<b>Nomur, Nobilis</b>	<b>metaQTL1B</b>
<b>AX-178078320</b>	<b>1B</b>	<b>328640622</b>	<b>M et V</b>	<b>2018</b>	<b>-4,37</b>	<b>Nomur, Nobilis</b>	<b>metaQTL1B</b>
AX-109137864	1B	329206791	Montbartier	2018	-4,45	Fabulis, Miradoux, Pastadou	
AX-110084527	1B	330501128	Montbartier	2018	-3,35	Nomur, Nobilis	
AX-178077559	1B	331919953	Montbartier	2018	-3,95	Nomur, Nobilis	
AX-110597457	1B	332081835	Montbartier	2018	-4,14	Fabulis, Miradoux, Pastadou	
AX-108961898	1B	332163124	M et V	2018	-4,59	Fabulis, Miradoux, Pastadou	
AX-178059396	1B	332568012	Montbartier	2018	-3,84	Nomur, Nobilis	
AX-178064351	1B	333208165	Montbartier	2018	-2,88	Miradoux	
AX-109011717	1B	333324135	Montbartier	2018	-4,05	Fabulis, Miradoux, Pastadou	
AX-95191356	1B	333602597	Montbartier	2018	-3,88	Fabulis, Miradoux, Pastadou	
AX-89616102	1B	334122822	Montbartier	2018	-3,59	Nomur, Nobilis	
AX-178066010	1B	334477063	Montbartier	2018	-4,02	Nomur, Nobilis	
AX-111518011	1B	334890166	Montbartier	2018	-3,81	Fabulis, Miradoux, Pastadou	
AX-109977850	1B	336210260	Montbartier	2018	-3,35	Nomur, Nobilis	
AX-86163964	1A	298565408	Montbartier	2018	-3,65	Fabulis, Miradoux, Pastadou	
AX-112288900	3B	537420837	Lectoure	17, 18	-0,45	Fabulis, Nobilis, Miradoux, Pastadou	
AX-178071014	4D	19784345	Lectoure	2017	-0,43	Nomur	
AX-178064643	4D	74415690	Lectoure	2017	-0,37	Nomur	
AX-178073942	6A	0	Lectoure	17, 18	-0,92	Nomur	
AX-178075287	6D	26598001	Lectoure	17, 18	-0,83	Fabulis, Nobilis, Miradoux, Pastadou	
AX-178057447	7A	611468750	Lectoure	17, 18	-0,84	Fabulis, Nobilis, Miradoux, Pastadou	

**Tableau 18 :** Recherche de QTL dans trois populations recombinantes de blé dur.

Le déséquilibre de liaison des marqueurs blé dur d'une part et triticales de l'autre a été calculé à l'aide du package R LDcorSV. Les mesures du LD ont permis de confirmer l'existence de 2 QTL sur le chromosome 1B du blé dur au lieu d'un seul.

De même, la projection des marqueurs pic du QTL 1B sur la carte physique de référence du blé tendre confirme l'existence de 2 QTL distincts pour la résistance à la rouille jaune des années 2018 et 2019 d'une part et 2017 d'autre part (Figure 8).



**Figure 8 :** Colocalisation MTA (associations de marqueur et caractère) pour le QTL 1B, QTL majeur de résistance à la rouille jaune chez le blé dur.

## F.ii. Triticale

Pour les 3 populations RILs, Vuka x Trefl, Vuka x Kaulo et Vuka x RT10013, les marqueurs DArT SNP présentant une ségrégation attendue ont été utilisés pour réaliser une cartographie avec le logiciel Mapdisto. Tous les chromosomes sont couverts et les cartes des 4 populations sont concordantes entre elles au niveau des marqueurs communs.

Une recherche de QTL a été réalisée, avec le package Rqtl, à partir des 4 cartes génétiques et des données des 2 années de phénotypage de la résistance à la rouille jaune. Un QTL unique, majeur, est identifié sur les 4 populations et dans les 4 lieux et 2 années sur le chromosome 6R. Ce QTL explique jusqu'à 52,7 % de la résistance au niveau des feuilles (LOD 35) et 57 % de la résistance à la rouille jaune au niveau de l'épi. Les parents donneurs du QTL sont Vuka et Maximal avec des effets maximums de respectivement -3,9 et -2,32 pour la note de résistance des feuilles et de respectivement -4,2 et -1,63 pour la note de résistance de l'épi.

Le QTL majeur 6R est confirmé par génétique d'association. Une analyse de génétique d'association réalisée avec 36649 marqueurs DArT SNP polymorphes entre les 4 populations a mis en évidence plusieurs MTA dont certains colocalisent avec les QTL 6R au seuil de Bonferroni de  $3,7 \cdot 10^{-6}$ .

## ► G. Estimation de l'intensité épidémique annuelle par le nombre de cycles infectieux calculé en fonction de la température

Nous avons calculé le nombre théorique de générations mensuelles du parasite sur plus de 200 sites, ensuite

regroupés en zones géographiques en se basant sur le modèle de Zadoks (1971), revu par Rapilly (1976) qui exprime la durée de la période de latence en fonction de la température journalière. Les données de températures journalières sont fournies par Météo-France. Le nombre de générations a été calculé à l'échelle mensuelle pour 13 années de données (d'août 2000 à juillet 2013) incluant des années de pressions de maladie différentes. La Figure 9 montre le nombre de générations mensuelles pour ces 13 années de référence (moyenne, minimum et maximum), ainsi que les courbes de 4 années particulières : 2013 (faible épidémie), 2014 (forte épidémie), 2018 et 2019 (années du projet). Les conditions particulièrement favorables de 2014 ont été très propices au développement de la maladie, avec une apparition précoce et une nuisibilité importante ce qui est cohérent avec les sorties du modèle et l'émergence de la race adaptée au triticales en particulier. La campagne 2018 a été marquée, jusqu'à fin janvier/mi-février, par un climat propice par rapport aux autres années, avec un mois de janvier exceptionnellement propice. Cependant, le mois de février et de mars dans une moindre mesure, ont défavorisé le développement du champignon assurant une rupture qui a limité tout développement précoce de la maladie et en cohérence avec les retours du terrain par les coopératives, firmes phytopharmaceutiques, réseaux d'observations et suivi des agriculteurs. Finalement, après un retour de conditions favorables, des foyers ont pu être signalés mi-avril en bordure maritime notamment (Poitou-Charentes, bordure Manche). Les chaleurs de fin de cycle ainsi que les interventions fongicides ont toutefois limité le développement épidémique. Remarquons que certaines variétés dites résistantes ont été déclassées en 2018 (par exemple Nemo).

La campagne 2019 a été marquée par un climat défavorable en janvier par endroits puis en avril/mai ce qui a limité l'impact de la rouille jaune. La fraîcheur de fin janvier a limité le développement de la maladie, notamment pour l'est de la France. Si le climat de février et mars a été plutôt favorable et a conduit au développement de la maladie sur une grande moitié

ouest, le retour à des températures fraîches en mai, combinées aux traitements fongicides, a limité l'impact de la maladie. Malgré un niveau de résistance variétale des variétés semées qui progresse, certains comportements variétaux continuent d'étonner sur le terrain.

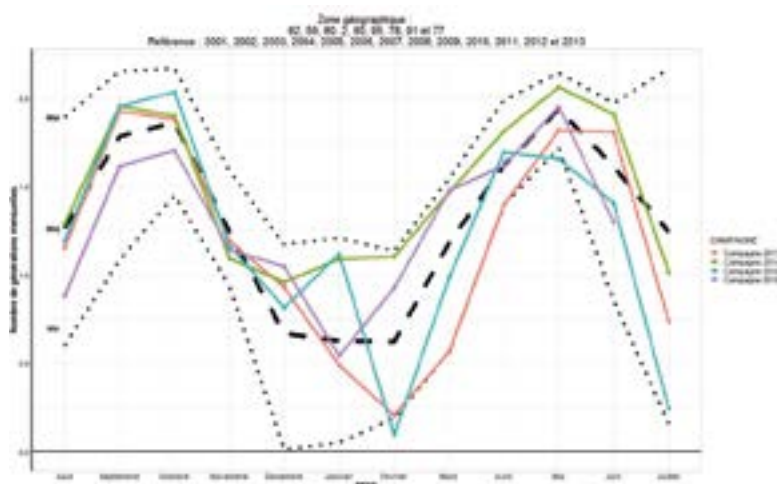
Lors de ce projet, un développement informatique a été effectué afin de disposer de l'information à l'échelle départementale.

### 3 Conclusion-Perspectives

Cette période épidémique de 3 années (2017-2019), caractérisée par le nombre de générations moyennes du parasite en fonction de la température moyenne, montre qu'il s'agit d'années épidémiques où la pression de maladie était faible à moyenne, du fait de la discontinuité des périodes favorables à l'infection. Le modèle estime l'intensité épidémique par la durée de la période de latence en fonction de la température journalière. Il conviendrait de confirmer que les courbes de réponse à la température utilisées dans le modèle sont pertinentes compte tenu de la réponse à la température des races actuelles. Malgré la simplicité du modèle, avec la prise en compte d'un seul facteur climatique facilement accessible, les résultats obtenus sont cohérents avec les observations de terrain.

Suite à la forte épidémie de rouille jaune en 2014, le GIE blé dur et le GIE triticales ont vu la nécessité de rechercher des sources de résistance variétale à la fois au stade plantule et au stade adulte chez ces deux espèces. Ce projet a répondu à l'attente de la sélection et des coopératives en repérant des résistances exprimées au stade plantule et adulte chez les deux espèces vis-à-vis des races inféodées à chacune d'elles. Le génotypage des populations parasites de *Pst* observées entre 2016 et 2019 a permis de distinguer trois races principales W1, W(-) et Tri2015). Des variants de W(-), virulents et avirulents sur *Yr17*, sont distingués par pathotypage. La race dominante sur blé dur est W(-) avec deux variants A17 et V17 comme pour le blé tendre et quelques rares

En 2013, les conditions printanières défavorables ont limité le nombre de générations mensuelles théoriques pour les campagnes culturales en 2013, 2014, 2018 et 2019.



**Figure 9 :** Nombre de générations mensuelles théoriques de *Pst* pour les campagnes culturales 2013 (faible épidémie en rouge), 2014 (forte épidémie en vert), 2018 (en bleu), 2019 (en violet) dans les régions Haut-de-France et Ile de France (--- moyenne .... maximal et minimal de la période de référence 2000 -2013).



isolats de Tri2015. Nous retrouvons les résultats décrits aux Etats-Unis, les isolats de *Pst* issus de blé dur ne diffèrent pas de ceux de blé tendre (Holtz *et al.*, 2014 ; X. Chen, comm. pers.). Cette structure de population diffère de celle observée pour la rouille brune en France où les races de rouille brune (*Puccinia triticina*) sur blé tendre et sur blé dur sont différentes ; la majorité des races détectées sur le blé dur ne sont pas ou peu retrouvées sur le blé tendre (Goyeau *et al.*, 2006).

Le triticales se caractérise par la sélection de la race Tri2015 qui ne se développe pas sur le blé tendre étant donné son nombre limité de virulences. Tri2015, présente sur le territoire depuis 2012, se caractérise par une agressivité élevée dans les conditions chaudes par une plus courte période de latence que la race W(-). Les isolats W(-), issus de blé tendre et de blé dur, ont quant à eux une meilleure efficacité d'infection que les isolats Tri2015 aux températures moyennes de 10 et 15°C.

Les tests de résistance au stade plantule ont révélé des sources de résistance chez les trois espèces et en particulier chez le triticales. Les tests variétaux conduits au champ sur un panel de variétés des trois espèces et des variétés récentes en conditions d'inoculation artificielle chez les sélectionneurs et en conditions naturelles chez les coopératives et INRAE, ont montré la stabilité de la résistance de la majorité des variétés et quelques contournements comme pour les variétés de blé tendre Nemo et Amboise. La variété triticales Bienvenu semble être un bon révélateur de la présence de la race Tri2015. La plupart des variétés du panel Triticales sont indemnes vis-à-vis de W1 mais peuvent être attaquées par W(-) avec une intensité moindre que par Tri2015. Les variétés ou lignées Triskell, Vuka, GD13th27 et Anagram sont résistantes. La variété de blé dur Nobilis est quasiment indemne. Casteldoux, Fabulis, Pastadou, RGT Nomur, Glucodur et Anvergur ont de bons niveaux de résistance partielle. Les triticales primaires, source potentielle de nouvelles résistances venant du seigle, se sont révélés en général très résistants aux 3 races. Certains triticales primaires ont déjà été utilisés en croisements avec des triticales élites et seront suivis dans les années à venir.

L'analyse du niveau de résistance au champ d'environ 200 descendants de 4 populations de blé dur et de 4 populations de triticales, inoculées par la race W1,

W(-) ou Tri2015 sur 2 lieux par race durant 2 années a montré la ségrégation de gènes de résistance de type quantitative.

Le phénotypage du niveau de résistance au stade adulte sur feuilles et sur épis de populations de blé dur et de triticales après inoculation artificielle a permis la recherche de QTL de résistance à la rouille jaune. Les quatre populations de triticales ont été phénotypées après inoculation avec deux races, dans les sites Nord avec la race W1 et les sites Centre-Sud avec la race Tri2015. Les 4 populations de triticales ont été génotypées grâce à la technologie DArTSeq. Afin de permettre un lien éventuel entre les populations de triticales et de blé dur, une partie de la population de triticales SW Talentro x Maximal a été génotypée avec la puce 35K Axiom. Les cartes génétiques individuelles et une carte consensus ont été réalisées. Un même QTL majeur est identifié sur le chromosome 6R pour la résistance au niveau des feuilles et de l'épi. Les parents donneurs du QTL de résistance sont Vuka et Maximal avec des effets pour la résistance des feuilles et de l'épi.

Les quatre populations de blé dur ont été phénotypées après inoculation par les races W1 et W(-) sur 4 sites. Le génotypage de la population de blé dur RGT Nomur x Miradoux a été réalisé à l'aide de la puce Axiom 35K développée par Breedwheat. Un QTL majeur de résistance issu de Nobilis sur le chromosome 1B a été mis en évidence et l'existence de 2 QTL sur le chromosome 1B du blé dur a été confirmée. La détection de QTL de résistance à la rouille jaune menée par population et en combinant les différentes populations par espèce a montré l'existence pour les 2 espèces de QTL majeurs de résistance, sur le chromosome 6R du triticales et sur le chromosome 1B du blé dur.

Les études sont poursuivies par deux projets FSOV. Le GIE Triticales conduit le projet TritiRJ, *Identification et exploitation de sources de résistance à la rouille jaune chez le triticales*. L'objectif est de cumuler des nouvelles sources de résistance dans des géniteurs triticales en affinant la localisation du QTL 6R et en recherchant de nouvelles sources de résistances au CIMMYT (Mexique). Le projet Durable, *Spécificité des résistances du blé dur aux maladies foliaires du blé : cartes, marqueurs et gènes*, conduit une analyse plus fine du QTL majeur de résistance du blé dur (1B).

## Références bibliographiques

**Ali S., Gautier A., Leconte M., Enjalbert J., de Vallavieille-Pope C.,** 2011. A rapid genotyping method for an obligate fungal pathogen, *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*, based on DNA extraction from infected leaf and Multiplex PCR genotyping. *BMC Research Notes* 1-5. <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/240>.

**Ali S., Rodriguez-Algaba J., Thach T., Sørensen C., Hansen J.G., Lassen P., Hodson D., Nazari, K., Justesen A.F., Hovmøller M.S.,** 2017. Yellow rust epidemics worldwide were caused by pathogen races from divergent genetic lineages. *Frontiers in Plant Science* 8, 1057.

**Audenaert K., Troch V., Landschoot S., Haesaert G.,** 2014. Biotic stresses in the anthropogenic hybrid triticales (x\* *Triticosecale* Wittmack): current knowledge and breeding challenges. *European Journal of Plant Pathology* 140, 615-630.

**Chen X. M.,** 2005. Epidemiology and control of stripe rust [*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*] on wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27, 314-337.

**Chen X. M.,** 2013. High-temperature adult-plant resistance, key for sustainable control of stripe rust. *American Journal of Plant Sciences* 4, 608-627.

**Cheng P., Xu L. S., Wang M. N., See D. R., Chen X. M.,** 2014. Molecular mapping of genes *Yr64* and *Yr65* for stripe rust resistance in hexaploid derivatives of durum wheat accessions PI331260 and PI 480016, *Theoretical and Applied Genetics* 127, 2267-2277.

**Dedryver F., Paillard S., Mallard S., Robert O., Trottet M., Nègre S., Verplancke G., Jahier J.,** 2009. Characterization of genetic components involved in durable resistance to stripe rust in the bread wheat 'Renan'. *Phytopathology* 99, 968-973.

**Goyeau H., Park R., Schaeffer B., Lannou C.,** 2006. Distribution of pathotypes with regard to host cultivars in French wheat leaf rust populations. *Phytopathology*, 96(3), 264-273.

**Hau B., de Vallavieille-Pope C.,** 2006. Wind-dispersed diseases. In: *The Epidemiology of Plant Diseases*. p. 387-416, Eds B. M. Cooke, D. Gareth Jones and B. Kaye, Second Edition, Springer, Dordrecht, The Netherlands.

**Holtz M. D., Kumar K., Zantinge J. L., Xi K.,** 2014. Genetic diversity of *Puccinia striiformis* from cereals in Alberta, Canada. *Plant Pathology* 63, 415-424

**Hovmøller M. S., Walter S., Bayles R., Hubbard A., Flath K., Sommerfeldt N., Leconte M., Czembor P., Rodriguez-Algaba J., Thach T., Hansen J. G., Lassen P., Justesen A. F., Ali S., de Vallavieille-Pope C.,** 2016. Replacement of the European wheat yellow rust population by new races from centre of diversity in the near-Himalayan region. *Plant Pathology* 65, 402411.

**Hovmøller M. S., Sørensen C. K., Walter S., Justesen A. F.,** 2011. Diversity of *Puccinia striiformis* on cereals and grasses. *Annual Review of Phytopathology* 49, 197-217.

**Lefèvre S., Leconte M., de Vallavieille-Pope C.,** 2015. Rouille jaune du blé en France trois facteurs interagissent. *Phytoma* 683, 11-14.

**Li H., Guo X. X., Wang C. Y., Ji W. Q.,** 2015. Spontaneous and divergent hexaploid triticales derived from common wheat \* rye by complete elimination of D-genome chromosomes. *PLoS ONE* 10 (3) Pages: e0120421, DOI: 10.1371/journal.pone.0120421

**Mallard S., Gaudet D., Aldeia A., Abelard C., Besnard A. L., Sourdille P., Dedryver F.,** 2005. Genetic analysis of durable resistance to yellow rust in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 110, 1401-1409.

**Milus E. A., Kristensen K., Hovmøller M. S.,** 2009. Evidence for increased aggressiveness in a recent widespread strain of *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* causing stripe rust of wheat. *Phytopathology* 99, 89-94.

**Paillard S., Trotoux-Verplancke G., Perretant M. R., Mohamadi F., Leconte M., Coedel S., de Vallavieille-Pope C., Dedryver F.,** 2012. Durable resistance to stripe rust is due to three specific resistance genes in French bread wheat cultivar Apache. *Theoretical and Applied Genetics* 125(5), 955-965.

**Perronne R., Dubs F., de Vallavieille-Pope C., Leconte M., du Cheyron P., Cadot V., Vidal T., Enjalbert J.,** 2021. Spatiotemporal changes in varietal resistance to wheat yellow rust in France reveal an increase in field resistance level during the period 1985-2018. *Phytopathology* 111, 1602-1612.

**Rapilly F.,** 1976. Essai d'explication de l'épidémie de rouille jaune sur blé, en 1975. *Le Sélectionneur Français* 22, 47-52.

**Rosewarne G. M., HerreraFoessel S. A., Singh R. P., HuertaEspino J., Lan C. X., He Z. H.,** 2013. Quantitative trait loci of stripe rust resistance in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 126, 2427-2449.

**Sørensen, C. K., Thach, T., Hovmøller, M. S.** 2016. Evaluation of spray and point inoculation methods for the phenotyping of *Puccinia striiformis* on wheat. *Plant Disease* 100:1064-1070.

**de Vallavieille-Pope C., Ali S., Leconte M., Enjalbert J., Delos M., Rouzet J.,** 2012. Virulence dynamics and regional structuring of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in France between 1984 and 2009, *Plant Disease* 96,131-140.

**de Vallavieille-Pope C., Leconte M., du Cheyron P., Maumené C.,** 2012. Rouille jaune : une nouvelle race envahit l'Europe. *Perspectives Agricoles* 394 -Novembre 2012, 54.

**de Vallavieille-Pope C., Bahri B., Leconte M., Zurfluh O., Belaid Y., Maghrebi E., Huber L., Launay M., Bancal M.O.,** 2018. Thermal generalist behavior of invasive *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* strains under current and future climate conditions. *Plant Pathology* 67, 1307-1320.

**Wellings C. R.,** 2011. Global status of stripe rust: a review of historical and current threats. *Euphytica* 179, 129-41.

**Xu L. S., Wang M. N., Cheng P., Kang Z. S., Hulbert S. H., Chen X. M.,** 2013. Molecular mapping of *Yr53*, a new gene for stripe rust resistance in durum wheat accession PI 480148 and its transfer to common wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 126, 523-533.

**Yang M. Y., Ren T. H., Yan, B. J., Li, Z., Ren Z. L.,** 2014. Diversity resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in rye chromosome arm 1RS expressed in wheat. *Genetics and Molecular Research* 13(4)8783-8793, DOI: 10.4238/2014. October.27.20

**Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak C.F.,** 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14, 415-421.

**Zhou J. P., Zhang H.Y., Yang Z. J. et al.,** 2012. Characterization of new T2DS.2DL-R translocation triticales ZH-1 with multiple resistances to diseases. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59,1161-1168.

C. Pope<sup>1</sup>, M. Leconte<sup>1</sup>, T. Vidal<sup>1</sup>, A. Bouguennec<sup>2</sup>, M. Cochard<sup>3</sup>, C. Jeudi<sup>3</sup>, V. Laurent<sup>3</sup>, C. André<sup>4</sup>, E. Delaleau<sup>5</sup>, F. Fantin<sup>6</sup>, J-P. Legoff<sup>7</sup>, T. Lefèvre<sup>7</sup>, M. Chapus<sup>7</sup>, A. Roullier<sup>7</sup>, F. Lacoudre<sup>8</sup>, C. Duque<sup>9</sup>, S. Lefèvre<sup>9</sup>, P. du Cheyron<sup>10</sup>

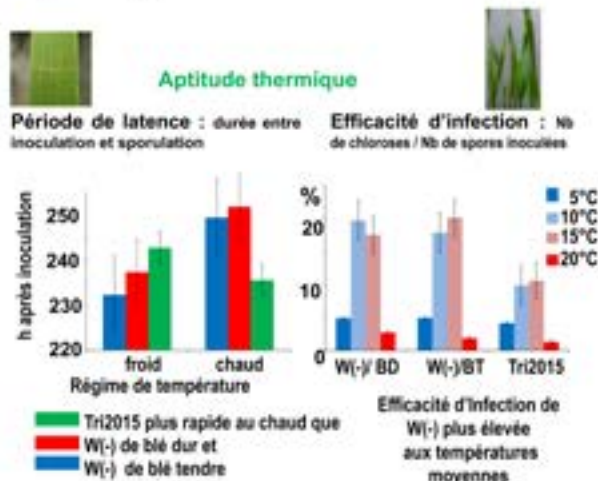
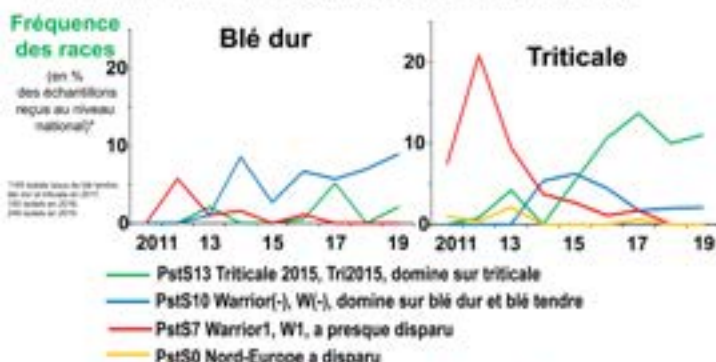
1 - INRAE UR BIOGER, 78850 Thiverval Grignon ; 2 - INRAE-UCA UMR GDEC, 63000 Clermont-Ferrand ; 3 - SAS Florimond Desprez Veuve et Fils, 59242 Cappelle en Pevèle ; 4 - Syngenta Seed SAS, 78910 Orgerus ; 5 - Lemaire-Deffontaines, 59310 Auchy les Orchies ; 6 - Agri-obtentions URD78, 78660 Orsonville ; 7 - RAGT 2n, 12000 Rodez ; 8 - Limagrain Europe, 28130 Chartainvilliers ; 9 - AgroSolutions, 75782 Paris cedex 16 ; 10 - Arvalis-Institut du Végétal, 75016 Paris

## Contexte et objectifs

La rouille jaune du blé est l'une des maladies du blé les plus dévastatrices ; la sélection de variétés résistantes apporte des solutions efficaces permettant de réduire l'emploi de produits phytosanitaires. Le niveau de résistance du blé tendre a été beaucoup amélioré au cours des dernières décennies mais ce caractère n'était pas prioritaire dans les programmes de sélection du blé dur et du triticale. La forte épidémie de 2014 a encouragé à rechercher des sources de résistance chez ces deux espèces. Nous avons comparé les populations de *Puccinia striiformis* issues de blé dur, de triticale et de blé tendre. Nous avons évalué le niveau de résistance de variétés de blé dur et de triticale ainsi que de seigle vis-à-vis de plusieurs races et recherché des QTL de résistance à partir de populations recombinantes issues d'un parent sensible et d'un parent résistant.

## Analyse des populations de rouille jaune

Echantillons de feuilles sporulantes d'épidémie naturelle : pathotypage sur 32 variétés différentielles et génotypage avec 19 marqueurs SSR.

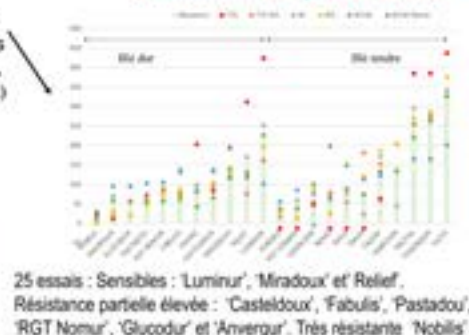


## Evaluation des résistances disponibles

### Classement du panel triticale



### Classement du panel blé dur



## Recherche de source de résistance

### Phénotypage

Ségrégation de résistance quantitative au champ :

- 4 populations Single Seed Descent (SSD) de blé dur : Pastadoux x Miradoux, Nobilis x Fabulis, Normur x Miradoux, Ovidio x Glucodur
- 4 populations SSD ou HaploDiploïde de triticale : Maximal x SW Talentro, Vuka x Kaulos, Vuka x RT 10013, Vuka x Trefl
- Environ 200 descendants par population inoculés par 2 races (W1, W(-) ou Tri2015), 1 race par essai, 4 lieux par population, 2 années



### Génotypage

- 3 populations de blé dur à l'aide de la puce Axiom 35K développée par Breedwheat : **Détection d'un QTL majeur de résistance issu de Nobilis sur le chromosome 1B. 2 QTL sur le chromosome 1B**
- 4 populations de triticales par la technologie DARTSeq : **Détection d'un QTL majeur de résistance issu de Vuka et de Maximal sur le chromosome 6R**

## Conclusion-Discussion

Des variétés résistantes de triticale, de seigle, de triticales primaires et de blé dur ont été repérées malgré le développement de deux races de rouille jaune, l'une spécifique du triticale et l'autre inféodée au blé tendre et au blé dur. Nous avons identifié dans des lignées issues de populations recombinantes des QTL de résistance majeurs. L'exploitation de ces résultats doit conduire à la création de futurs géniteurs et / ou de variétés ayant ces résistances par une approche de SAM à gérer en fonction de l'évolution des races. Un nouveau contrat FSOV TriBtRJ étudie le QTL mis en évidence sur le chromosome 6R chez le triticale et le contrat FSOV Durable étudie le QTL 1B sur le blé dur.

### Publications

- de la Vallée-Péque C., de S., Leconte M., Enjalbal J., Dore M., Roulet J., 2012. Varieties dynamics and regional structuring of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in France between 1980 and 2010. *Plant Disease* 96:131-140.
- Pellerin S., Vigneron S., Pellerin M., Bouquet F., Leconte M., Cabot V., de la Vallée-Péque C., Dupeyron F., 2012. Durability resistance to stripe rust is due to three specific resistance genes in French wheat wheat varieties. *Theor Appl Genet* 125: 955-965.
- Pellerin S., Dore M., de la Vallée-Péque C., Leconte M., de la Vallée-Péque C., Dupeyron F., 2012. Spatiotemporal changes in wheat yellow rust in France linked to increase in field resistance level during the period 1980-2010. *Phytopathology* 102: 1480-1485.
- Lefèvre T., Leconte M., de la Vallée-Péque C., 2015. Rouille jaune du blé et France : une histoire d'adaptation. *Phytoprotection* 90: 1-14.
- Pellerin S., Dore M., de la Vallée-Péque C., Leconte M., du Cheyron P., Cabot V., Pellerin M., Enjalbal J., 2021. Spatiotemporal changes in wheat resistance to wheat yellow rust in France linked to increase in field resistance level during the period 1980-2010. *Phytopathology* 112: 1800-1812.



## Synthèse des programmes de recherche 2016



*Fonds de soutien à l'Obtention Végétale*

Retrouvez l'ensemble des informations  
sur les programmes de recherche sur le site :

**[www.fsov.org](http://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@semae.fr](mailto:fsov@semae.fr)

[www.fsov.org](http://www.fsov.org)

ISBN : 978-2-36397-152-4



9 782363 971524

Mai 2022 - D1591