

HELMO : Identification des pathogènes fongiques, du risque maladie et des facteurs génétiques de résistance pour une gestion intégrée et durable de l'helminthosporiose de l'orge

Romain VALADE^{1*}, Agathe JUNG¹, Cindy VITRY¹, Stéphanie LE PRIEUR¹, Eloïse METEIER¹, Faharidine MOHAMADI¹, Julie RAMIREZ², Thierry BOUTHILLIER³, Emmanuelle DYRSZKA⁴, Amélie GENTY⁵, Ellen GOUDÉMAN-DUGUE⁶, Guillaume ROULLET⁷, Mathieu TISON⁸, Clara SIMON⁹, Eric GILLARD¹⁰, Anne-Charlotte LOMBART¹⁰, Jean-François HERBOMMEZ¹¹, Doriane HAMERNIG¹, Matthieu BOGARD¹², Pierre GLADIEUX¹²

1 - ARVALIS, Institut du végétal, Station expérimentale, 91720 Boigneville, FRANCE

2 - Plant Health Institute Montpellier, INRAE, CIRAD, Institut Agro, IRD, Université de Montpellier, FRANCE

3 - ASUR PlantBreeding, 163 ter Avenue de Flandre, 60190 Estrées Saint Denis

4 - SYNGENTA, 1228 chemin de l'Hobit, 31790 Saint-Sauveur

5 - SECOBRA Recherches, Centre de bois-Henry, 78580 Maule

6 - FLORIMOND DESPREZ, 3 rue Florimond Desprez, 59242 Cappelle-en-Pévèle

7 - UNISIGMA, 2 rue du petit Sorri, 60480 Froissy

8 - RAGT2n, 615 rue Lavoisier, 59112 Annoeullin

9 - LIMAGRAIN Europe, Biopôle Clermont-Limagne, 63360 Saint-Beauzire

10 - LEMAIRE DEFFONTAINES, 180 rue du rossignol, 59310 Auchy les Orchies

11 - KWS MOMONT Recherche, 7 rue du Martinval, 59246 Mons-en-Pévèle

12 - Arvalis Institut du végétal, 110 chemin de la côté vieille, 31450 Baziège, FRANCE

± responsables d'action

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

INTRODUCTION

L'orge est la seconde céréale à paille cultivée en France avec une surface d'environ 1.8 millions d'hectares et une production moyenne de 12 millions de tonnes. Cette céréale, aux nombreux débouchés et économiquement importante pour l'agriculture française, est soumise à différents stress abiotiques et biotiques qui limitent la production. Les maladies cryptogamiques sont nombreuses, souvent spécifiques à l'orge et difficiles à identifier (et donc quantifier) du fait de la ressemblance des symptômes causés par différents pathogènes. En France, la maladie fongique la plus fréquente et nuisible est l'helminthosporiose, notamment sur orge d'hiver. La nuisibilité moyenne est estimée à environ 15q/ha selon l'année et la sensibilité variétale (Arvalis, Perspectives Agricoles, 2024).

L'helminthosporiose est causée par un complexe d'espèces du genre *Pyrenophora* et *Cochliobolus*. Parmi le genre *Pyrenophora*, trois taxa sont responsables de l'helminthosporiose (au sens vernaculaire) : *P. teres* f. *teres* (*Ptt*) responsable de la forme « réseaux » (Net form of Net Blotch : NFNB), *P. teres* f. *maculata* (*Ptm*) responsable de la forme « taches » (Spot form of Net Blotch : SFNB), *P. graminea* responsable des « stries de l'orge ». Une quatrième espèce *C. sativus* est également décrite comme agent causal. Les symptômes causés par *Ptt*, *Ptm* et *C. sativus* sont assez similaires et confondables au champ.

Sur le plan épidémiologique et biologique, *P. teres* survit sur les résidus de culture, infecte par ses ascospores, se propage de manière asexuée, et colonise les tissus sénescents. *Ptt* agit comme nécrotrophe intercellulaire, tandis que *Ptm* et *P. graminea* sont hémibiotrophes et produisent des structures intracellulaires (haustories). *P. graminea* vit sous forme de mycélium dans le grain et infecte systématiquement la plantule via le coléorhize.

Historiquement, *Ptt* prédominait mondialement jusqu'aux années 1970, avant l'émergence de *Ptm* en Australie et Amérique du Nord (McLean *et al.*, 2010) et en France dans les années 90 (Arabi *et al.* 1992). Généralement, une seule forme domine dans une région donnée, et l'introduction de variétés résistantes à une forme peut favoriser l'autre (Louw *et al.*, 1996). En France, *Ptt* est maintenant considérée comme prédominante, mais peu d'études récentes existent sur l'occurrence des espèces, la diversité génétique et les ressources génétiques associées. Des cas d'hybrides viables entre *Ptt* et *Ptm* ont été observés (Liu *et al.*, 2011), tandis que la co-occurrence avec *P. graminea* n'est pas documentée, bien que leur proximité phylogénétique et leur capacité de croisement en laboratoire aient été démontrées (Ariyawansa *et al.*, 2014).

De nombreuses études ont caractérisé les spectres de virulence des formes de *Pyrenophora* à l'aide de lignées différentielles (Afanassenko *et al.*, 2009), révélant un grand nombre de pathotypes (Liu *et al.*, 2011). Des interactions gène-pour-gène sont supposées, bien qu'aucun gène de résistance ni d'avirulence n'ait encore été cloné. D'autres facteurs de virulence, comme des toxines nécrotrophes, interagiraient avec des gènes de sensibilité inconnus.

Les génomes des trois formes de *Pyrenophora* sont aujourd'hui bien séquencés et assemblés (Ellwood *et al.* 2010, Wyatt *et al.* 2018, Syme *et al.* 2018, Wyatt *et al.* 2018, Wyatt *et al.* 2021). En revanche, la connaissance de la diversité pathotypique de *C. sativus* reste plus limitée. Les travaux disponibles indiquent une possible base monogénique de la virulence ou de la résistance (Valjavec-Gratian & Steffenson, 1997; Zhong & Steffenson, 2001; Arabi & Jawhar, 2003), avec une diversité pathotypique semble-t-il inférieure à celle de *Ptt* et *Ptm* (Arabi & Jawhar, 2003).

De nombreuses études ont recherché le déterminisme génétique de la résistance à *P. teres*, d'abord via des populations bi-parentales, puis via des panels de variétés (Koladia *et al.*, 2017; Wonneberger *et al.*, 2017a,b; Richards *et al.*, 2017; Vatter *et al.*, 2017; Rozanova *et al.*, 2019; Tamang *et al.*, 2019; Novakazi *et al.*, 2019). Ces travaux ont majoritairement porté sur l'orge de printemps et sur l'espèce *Ptt*. Les analyses par génétique d'association sur de larges panels de diversité révèlent que la résistance aux deux formes de *P. teres* est polygénique, impliquant de nombreux QTL à effets faibles et des interactions QTL × environnement. Toutefois, plusieurs régions génomiques récurrentes, identifiées dans différents panels et conditions, indiquent l'existence de QTL d'intérêt, certains communs aux deux formes de *P. teres*. À ce jour, aucune étude n'a encore utilisé les approches de prédiction génomique pour modéliser cette résistance. À l'inverse, le déterminisme génétique de la résistance de l'orge à *C. sativus* reste moins documenté et semble principalement gouverné par des traits quantitatifs (Kumar *et al.*, 2002). Dans l'Upper Midwest (USA), un cultivar résistant (Dixon) issu de l'accession NDB12 a été déployé dès 1964 (Wilcoxson, 1990). Bien qu'efficace pendant plusieurs décennies, des cas de virulence ont compromis cette résistance (Roy *et al.*, 2010). Fetch *et al.* (2008) ont montré qu'environ 5,8 % des accessions d'orge de printemps testées aux États-Unis étaient résistantes à *C. sativus*. À ce jour, aucune donnée n'existe concernant la résistance des variétés françaises d'orge d'hiver vis-à-vis de cet agent pathogène.

La lutte contre l'helminthosporiose de l'orge passe principalement par la lutte génétique et par la lutte fongicide. Une première intervention précoce en végétation (T1) est souvent réalisée pour réduire l'inoculum primaire, puis une seconde intervention a fréquemment lieu autour des stades DFE/sortie des barbes (T2) dans l'objectif de protéger les deux dernières feuilles qui contribuent fortement au rendement final et au calibrage de l'orge.

La variabilité interannuelle de la nuisibilité dépend également du niveau de résistance variétale de l'orge cultivé. Il convient donc de proposer aux producteurs des outils d'aide à la décision s'appuyant sur des modèles prévisionnels de risque maladie afin de pouvoir les accompagner dans la gestion des interventions fongicides. Les effets de certaines variables climatiques sur le développement de *Pyrenophora teres* sur orge ont déjà été étudiés. Cependant, aucun modèle mécaniste décrivant la dynamique épidémiologique du pathogène au niveau de la plante n'a pour autant été publié. Néanmoins, un premier modèle de régression logistique intégrant des co-variables climatiques et agronomiques a été mis en place par Arvalis en 2017 (Gourdain *et al.*, 2018) à partir de données d'épidémiosurveillance pour prédire l'apparition précoce de la rhynchosporiose et de l'helminthosporiose. Le recours à des modèles de type statistique s'est déjà révélé assez performant pour des problématiques de prévision de risque maladie à condition de disposer de jeux de données suffisamment conséquents et représentatifs des situations observées en pratique (Gourdain *et al.*, 2009 ; Pierre *et al.*, 2015). Cependant, ce type de modèle ne permet souvent de ne répondre qu'à un seul objectif précis et le modèle développé par Arvalis en 2017 se limite ainsi à la

prévision du risque précoce autour du stade 2 nœuds de l'orge. Il n'existe pas à notre connaissance de modèle pour prédire le niveau de risque d'helminthosporiose au moment du T2.

Ainsi, le projet HELMO a pour objectifs de (i) caractériser la diversité des populations pathogènes impliquées dans l'helminthosporiose en France (ii) identifier des régions du génome associées à la résistance par des essais au champ et en conditions contrôlées (iii) et développer un modèle de prédiction du risque.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Caractérisation du complexe d'espèces et de la structure génétique des populations.

Échantillonnage et isolement des souches de *Pyrenophora* et *Cochliobolus*

La collecte des souches responsables des symptômes d'Helminthosporiose a été réalisée à partir de feuilles d'orge symptomatiques prélevées entre 2018 et 2023. Au total, 110 échantillons ont été collectés dans 40 lieux différents correspondant à 24 départements sur 42 variétés (37 orges d'hiver, 5 orges de printemps). Après l'échantillonnage, le tissu symptomatique a été soit traité immédiatement pour l'isolement monospore, soit conservé à 4 °C jusqu'au traitement. Des cultures monospores ont été obtenues en trois étapes à partir d'une sélection des échantillons reçus en 2018, 2020 et 2021 : (i) une colonie a été obtenue par inoculation d'une boîte de Petri contenant du milieu PDA avec une conidie prélevée sur le tissu symptomatique après incubation en chambre humide. A ce stade, un premier diagnostic basé sur les phénotypes des spores et des cultures sur PDA a été réalisé pour éliminer les souches ne correspondant ni à au genre *Pyrenophora* ni à *Cochliobolus* ; (ii) une extraction rapide d'ADN a été réalisée à l'aide de Chelex 100 (Bio-Rad), et cet ADN a été utilisé pour effectuer une PCR avec les amorces et les conditions mises au point par Leisova *et al.* (2006) afin de confirmer la présence de *Pyrenophora*, (iii) pour les colonies où la présence du pathogène a été confirmée ou si il y avait une suspicion de *Cochliobolus*, une seule conidie a été prélevée pour produire de nouvelles colonies utilisées pour la suite de l'étude. Par ailleurs, certaines souches ne produisant plus de conidies après leur prélèvement sur la feuille, l'isolement a été réalisé par sectionnement et transfert de l'extrémité d'un hyphes. Au total, 207 isolats monospore de *P. teres* ont été mis en collection. Aucune souche de *Cochliobolus* n'a été isolée par cette méthode à partir des échantillons de feuilles symptomatiques.

Développement de ressources génomiques et analyses de génomique comparative

Souches séquencées, données génomiques publiques et assemblages

Les espèces de *Pyrenophora* d'importance économique, telles que *P. teres* (formes *Ptt* et *Ptm*), *P. graminea*, *P. tritici repentis* (*Ptr*), et *P. bromi*, ont été incluses, ainsi que sept espèces phylogénétiquement proches et deux espèces plus éloignées utilisées comme groupes externes (Tableau 1). Au total, 13 espèces ont été incluses, représentées par 117 isolats dont 20 isolats

issus de la collection française (2.1.1). Les autres isolats provenaient de collections publiques ou d'autres groupes de recherche, afin de maximiser le nombre de localisations géographiques représentées pour chaque espèce. Pour *P. tr*, seules les données génomiques issues de bases de données publiques ont été utilisées. Notre jeu de données comprenait également les assemblages de génomes disponibles publiquement pour *P. tr* et *P. tr*. L'ADN a été extrait selon une modification de la méthodologie décrite par Carlsen *et al.* (2017). Pour chaque isolat, cinq disques de culture ont été inoculés dans un erlenmeyer de 250 mL contenant 60 mL de milieu de Fries modifié, puis incubés à 27 °C et à 120 tr/min pendant sept jours. Le contenu de l'erlenmeyer a été homogénéisé, puis mélangé à 60 mL supplémentaires de milieu de Fries. Le mélange a été incubé pendant deux jours supplémentaires dans les mêmes conditions. Après incubation, le mycélium a été lavé à l'eau distillée stérile et recueilli à l'aide d'un voile de filtration (pores < 0,3 mm). L'excédent de liquide a été éliminé par pressage du mycélium à travers le voile à l'aide de papier absorbant. Le mycélium a été congelé à -20 °C et lyophilisé pendant 24 à 36 heures, selon sa teneur en eau. Le tissu lyophilisé a été transféré dans un tube à microcentrifugation de 2 mL et broyé à l'azote liquide à l'aide d'une perceuse équipée de pilons à billes bleues en plastique (Sigma-Aldrich). Un volume suffisant pour atteindre le repère de 200 µL dans le tube a été utilisé pour l'extraction, selon la méthode décrite par Carlsen *et al.* (2017), avec un traitement supplémentaire à la RNase. La qualité

de l'ADN extrait a été évaluée par spectrophotométrie (Nanodrop) et par électrophorèse sur gel d'agarose, tandis que sa quantité a été déterminée à l'aide du kit Qubit® dsDNA haute sensibilité. Les échantillons d'ADN ont ensuite été conservés à -20 °C jusqu'à leur utilisation. Le séquençage de l'ADN a été réalisé chez Montpellier Genomix (MGX) à l'aide de la technologie Illumina. Une banque d'ADN a été construite avec une taille d'insert de 550 pb à l'aide du kit TruSeq Nano DNA Library Preparation (Illumina). Les banques d'ADN ont été séquençées à l'aide d'un séquenceur Illumina NovaSeq 6000.

Les séquences obtenues ont été inspectées et les adaptateurs éliminés avec FASTQC 0.11.9 et MULTIQC 1.11 (Andrews. 2010, Ewels *et al.* 2016) et TRIMMOMATIC 0.39 (Bolger *et al.* 2014), respectivement. Les séquences de tous les isolats nouvellement séquençés, ainsi que les séquences publiques de trois isolats de *P. graminea*, ont été assemblées avec ABYSS (Simpson *et al.* 2009), en utilisant des tailles de k-mer comprises entre 20 et 90. La taille de k-mer maximisant les valeurs N50 et L50 a été sélectionnée. Les séquences répétées ont été recherchées dans les assemblages à l'aide de REPEATMODELER 2.0.3 (Flynn *et al.* ; 2020), puis masquées à l'aide de REPEATMASKER v4 (Smit *et al.*, 2015). La complétude des assemblages a été évaluée en calculant le pourcentage d'orthologues universels à copie unique présents, estimé à l'aide de BUSCO 5.4.3 (Manni *et al.* 2021) et de la base de données pleosporales_odb10.

Taxon	Hôte principal	Nombre d'isolats			
		Isolat obtenu à partir d'une collection biologique publique	Assemblage récupéré à partir d'une base de données publique	Nombre total d'isolats	Origine géographique des isolats
<i>Pyrenophora teres f. teres</i>	Orge (<i>Hordeum vulgare</i>)	22	8	30	Australie, Canada, Danemark, France, Hongrie, Maroc, USA
<i>P. teres f. maculata</i>	Orge (<i>Hordeum vulgare</i>)	9	4	13	Australie, Canada, Danemark, France, Hongrie, Nouvelle Zélande, USA
<i>P. graminea</i>	Orge (<i>Hordeum vulgare</i>)	1	4	5	Chine, Japon, Tunisie
<i>P. tritici-repentis</i>	Bla (<i>Triticum aestivum</i>)	0	10	10	Algérie, Australie, Azerbaïdjan, Brésil, Canada, Allemagne, Syrie, Tunisie, USA
<i>P. bromi</i>	Brome inerme (<i>Bromus inermis</i>)	6	0	6	Canada, Allemagne, Hongrie, Japon
<i>P. chaetomioides</i>	Avoine (<i>Avena sativa</i>)	5	0	5	Canada, Japon
<i>P. cynosuri</i>	Crételle des près (<i>Cynosurus cristatus</i>)	1	0	1	Nouvelle Zélande,
<i>P. dictyoides</i>	Multiple graminées	7	0	7	Canada, Allemagne, Japon
<i>P. grahamii</i>	Fléole des près (<i>Phleum pratense</i>)	5	0	5	Canada, Allemagne, Japon
<i>P. lolii</i>	Multiple graminées	10	0	10	Belgique, Allemagne, Japon, Pays-Bas
<i>P. poae</i>	Pâturin des près (<i>Poa pratensis</i>)	8	0	8	Belgique, Canada, Allemagne, Japon, Pays-Bas, USA
<i>P. trichostoma</i>	Multiple graminées	4	0	4	Suisse, USA
<i>P. fugax</i> ^a	Multiple graminées	4	0	4	Koweït, Hongrie
<i>P. nobleae</i> ^a	Multiple graminées	9	0	9	Allemagne, Japon
	Total	91	26	117	

^a : espèces utilisées comme groupes externes, c'est à dire espèces qui sont phylogénétiquement distantes des autres d'après Ariyawansa *et al.*, (2014) and Marin-Felix *et al.*, (2019)

Tableau 1 : Isolats de *Pyrenophora* inclus dans les analyses de génomique comparative

Analyse phylogénétique et inférence de l'arbre phylogénétique

Les orthologues à copie unique identifiés avec BUSCO ont servi à inférer les relations phylogénétiques. Les orthologues à copie unique présents dans tous les génomes ont été alignés à l'aide de TRANSLATORX (Manni *et al.* 2021) afin de préserver le cadre de lecture. L'attribution taxonomique des isolats a été réalisée en concaténant toutes les séquences alignées, puis en construisant un réseau à l'aide de la distance de Hamming à l'aide de SPLITSTREE 4.17.2 (Dress *et al.* 1996).

Les généalogies ont été inférées pour chaque orthologue unique présent dans tous les génomes, à l'aide de la méthode du maximum de vraisemblance avec RAXML-NG 0.9.0 (Kozlov *et al.* 2019), en utilisant le modèle GTR+R, avec 1 000 répliquats bootstrap. Toutes les généalogies ont été utilisées pour inférer un arbre phylogénétique à l'aide d'ASTRAL-III 5.7.5 (Zhang *et al.* 2018), avec les paramètres par défaut. Les longueurs des branches de l'arbre phylogénétique ont été calculées à l'aide de RAXML (options --evaluate --brlen scaled --opt-model on --opt-branches on).

Prédiction des gènes

Les séquences protéiques et les données RNAseq ont été utilisées pour guider la prédiction des gènes à partir des génomes. Pour *Ptt*, *Ptm* et *Ptr*, nous avons utilisé les lectures RNAseq brutes et les séquences protéiques disponibles publiquement (numéros d'accès RNAseq : SRR9875074 et CMM1ATCACGL005, et numéros d'accès protéomique : UP000249757 et UP000001067, respectivement). Pour les autres espèces, l'extraction et le séquençage de l'ARN ont été réalisés, comme décrit ci-après.

Un isolat par espèce a été cultivé sur un milieu PDA et un milieu de Fries enrichi en pénicilline à 25 °C pendant sept jours. Quatre-vingts milligrammes de mycélium ont été récoltés et placés dans un tube à centrifugation, immédiatement immergé dans l'azote liquide. Le mycélium a ensuite été broyé à froid dans des mortiers refroidis à l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Le mycélium broyé a été remis dans le tube à centrifugation (maintenu au froid), puis 1 mL de réactif TRIzol a été ajouté. Le tube a été vortexé trois fois pendant 30 secondes, puis placé sur glace pendant 5 minutes. Après incubation sur glace, 200 µL de chloroforme ont été ajoutés, la solution a été vortexée pendant 15 secondes, puis laissée sur glace pendant 10 minutes avant centrifugation à 4 °C à 12 000 g pendant 15 minutes. La phase supérieure contenant l'ARN a été transférée dans un nouveau tube, puis 250 µL d'isopropanol froid, 125 µL de citrate de sodium 0,8 M et 125 µL de chlorure de sodium 1,2 M ont été ajoutés. Le tube a été mélangé par retournement 16 fois, puis laissé sur glace pendant 10 minutes avant centrifugation à 4 °C à 12 000 g pendant 8 minutes. Le surnageant a été éliminé et le culot d'ARN a été lavé deux fois avec 1 mL d'éthanol à 75 %, puis centrifugé à 4 °C à 12 000 g pendant 5 minutes. Après le dernier lavage, le culot a été séché à l'air pendant 5 minutes, puis remis en suspension dans de l'eau sans RNase. La suspension a été incubée à 4 °C pendant 2 heures. Un traitement à la DNase a été réalisé à l'aide du kit DNase I, sans RNase, HC de Thermo Scientific.

L'ARN extrait a été évalué en termes de qualité et de quantité à l'aide d'un analyseur de fragments. L'ARN obtenu après culture des isolats sur les milieux PDA et Fries a été comparé, et l'échantillon de meilleure qualité a été sélectionné pour le séquençage. Des banques d'ADNc ont été construites avec une taille d'insert de 550 pb à l'aide du kit TruSeq Nano de préparation de banques d'ADN (Illumina). Le séquençage des banques a été effectué sur un séquenceur Illumina NovaSeq 6000 au centre Montpellier Genomix (MGX). Les séquences de lecture ont été inspectées et les adaptateurs éliminés à l'aide de FASTQC 0.11.9 et de MULTIQ 1.11 (Andrews, 2010, Ewels *et al.* 2016), et de TRIMMOMATIC 0.39 (Bolger *et al.* 2014), respectivement. L'assemblage des séquences a été réalisé avec TRINITY 2.13.2 (Grabherr *et al.* 2011) avec les paramètres par défaut.

Les modèles de gènes ont été prédits avec MAKER 3.31 (Cantarel *et al.* 2018) à partir des génomes masqués des séquences répétées, des transcriptomes assemblés et du protéome de *Ptt* pour tous les isolats, à l'exception de *Ptr* et *P. bromi*, pour lesquels le protéome de *Ptr* a été utilisé. Les paramètres par défaut ont été conservés, à l'exception de la valeur de split_hit, fixée à 5000 pour correspondre aux caractéristiques des génomes fongiques (Min *et al.* 2017). Une seconde prédiction de gènes a été réalisée à l'aide de MAKER afin d'affiner les résultats. Pour cette seconde étape, l'entraînement de SNAP a été effectué avec les paramètres obtenus lors de la première prédiction, en ne retenant que les modèles de gènes présentant un score ADE inférieur à 0,25 et codant des polypeptides de plus de 50 acides aminés.

Analyses d'orthologie, de pangénome et de variation moléculaire

Différentes approches ont été utilisées pour identifier les orthologues aux niveaux interspécifique et intraspécifique. Au niveau interspécifique, les relations d'orthologie ont été analysées à l'aide d'OrthoFinder (Emms *et al.* 2015), en sélectionnant un isolat par espèce en fonction de la qualité de l'assemblage et du nombre de gènes prédits.

Au niveau intraspécifique, les protéomes prédits ont servi à effectuer une recherche blastp exhaustive pour chaque espèce. L'algorithme SILIX (Miele *et al.* 2011) a été utilisé pour inférer les relations d'homologie à partir des résultats blast, avec un paramètre de chevauchement (-r) fixé à 0,50. La structure et la taille du pangénome ont été déterminées à l'aide d'analyses de raréfaction.

Les séquences codantes des orthologues à copie unique ont été alignées à l'aide de TRANSLATORX afin de préserver le cadre de lecture. Des statistiques descriptives de la variation nucléotidique ont été calculées pour les espèces, à l'exception de *Pyrenophora dictyoides*2 (car n = 3 est trop petit pour le D de Tajima), ainsi que pour tous les orthologues à copie unique avec un échantillon de plus de trois séquences, à l'aide d'EGGLIB V3.3.0 (Siol *et al.* 2022). Les alignements comportant plus de 20 % de sites présentant des insertions/délétions (indels) ont été exclus, et, dans les alignements restants, les codons contenant des indels ont été filtrés. Après ce filtrage, seuls les alignements de plus de 1 000 pb ont été conservés.

Diversité génétique et structure des populations de *Pyrenophora*

Extraction ADN

L'ADN des 207 isolats de la collection a été extrait selon la méthodologie décrite dans le 2.1.2. (Carlsen *et al.* 2017).

Des banques de génotypage par séquençage (GBS) ont été construites à partir de 100 ng d'ADN par isolat. L'ADN a été digéré par l'enzyme ApeKI pendant 2 h à 75 °C. Un code-barres spécifique a été ajouté à chaque échantillon par ligation (ADN ligase T4 ; 30 min à 22 °C). Les échantillons barcodés (5 µl chacun) ont été regroupés, puis l'ADN a été amplifié. La purification a été réalisée pour éliminer les adaptateurs et les dimères d'amorces à l'aide du kit Wizard Genomic DNA (Promega), et la qualité a été vérifiée au bioanalyseur en mesurant la quantité et la longueur (150–300 pb) des fragments. Les banques ont été séquencées à l'aide de la technologie Illumina NovaSeq 6000. Les séquences obtenues (150 pb) ont été démultiplexées à l'aide de GBSx 1.3 (Herten *et al.* 2015) et ont été analysées selon les méthodes décrites précédemment.

Identification des espèces et estimation de la divergence nucléotidique

Pour l'affiliation taxonomique, les séquences GBS ont été alignées sur le génome de référence de chacune des deux formes de *P. teres* (Wyatt *et al.* 2018, Wyatt *et al.* 2021) à l'aide de Bowtie 2.5 (Langmead *et al.* 2012) avec les paramètres par défaut. L'identification et le filtrage des SNP ont été réalisés à l'aide de Bcftools 1.16 (Li, 2011). Après représentation graphique, pour chaque individu, des distributions de la qualité d'alignement (MQ) et de la profondeur de séquençage sous forme d'histogrammes, les seuils de filtrage ont été fixés à MQ ≥ 40 et à une profondeur de séquençage par individu ≥ 3 . Les sites présentant plus de 50 % de données manquantes ont été supprimés à l'aide de Vcftools 0.1.16 (Danecek *et al.* 2011). Les fichiers d'identification des variants (VCF ; un fichier avec *Ptt* comme référence et un fichier avec *Ptm*) ont été convertis en pseudo-alignements au format FASTA. Des réseaux phylogénétiques de type « neighbour-net » ont été construits à l'aide de Splitstree 4.17.2 (Dress *et al.* 1996) à partir de fichiers de pseudo-alignement FASTA. Ces réseaux ont été construits sur la base de la distance *p* (également appelée distance de Hamming), qui correspond au nombre de positions où deux vecteurs diffèrent, calculée par Splitstree. Les isolats ont été assignés au génome de référence auquel ils étaient les plus proches selon cette métrique.

La divergence entre les deux formes a été quantifiée en calculant la divergence nette :

$$Da = d_{XY} - ((\pi_{Ptt} + \pi_{Ptm})/2)$$

où d_{XY} représente la divergence nucléotidique et π la diversité nucléotidique. L'alignement de courtes séquences de *Ptt* sur une référence *Ptm*, et inversement, a mis en évidence une divergence significative.

Quantification moléculaire des formes *Ptt* et *Ptm* dans des échantillons foliaires

Dans l'objectif de diagnostiquer rapidement la présence des deux formes de *P. teres* à partir d'échantillons foliaires sans passer par des isolements monospores,

une méthode qPCR a été internalisée et validée dans nos conditions de laboratoire. Cette méthode a été adaptée des amorces et sondes développées par Mair *et al.* (2023) et Knight *et al.* (2024). La sensibilité, la spécificité des amorces, les limites de détection, la reproductibilité, la répétabilité ont été étudiées selon les critères du laboratoire d'ARVALIS (données non présentées). La méthode développée en duplex (quantification simultanée des deux formes en une seule réaction) a été validée pour l'étude malgré une amplification croisée des deux systèmes d'amorces avec *P. graminea* (données non présentées).

Les 110 échantillons foliaires ont été analysés par qPCR. Dix demi-feuilles par échantillon ont été broyées avec le vibro-broyeur Restch (MM400). L'extraction ADN a été réalisée à partir de 50mg de farine, avec le kit NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel) selon le protocole du fournisseur adapté par le laboratoire. Le temps d'incubation a été prolongé à 90min et 10µL de protéinase K (20mg/mL) ont été ajoutés. Les acides nucléiques ont été dilués à 30ng/µL. La quantification qPCR en duplex a été réalisée en duplicat avec l'instrument BIORAD CFX96.

Caractérisation de la diversité pathotypique

L'objectif de cette action était de développer une méthodologie fiable et reproductible pour évaluer la résistance variétale à *Pyrenophora teres* à partir d'une collection d'isolats issus de France.

Matériel végétal

Seize variétés d'orge ont été testées : onze variétés d'hiver issues d'une sélection de variétés françaises et cinq variétés de printemps issues d'un ensemble différentiel international proposé par Afanassenko *et al.* Neuf des variétés françaises ont été sélectionnées lors d'une étude antérieure menée par ARVALIS en France, car elles étaient représentatives des différents groupes génétiques porteurs de différents allèles QTL liés à la résistance à l'helminthosporiose. Ces variétés étaient : California, Manolia, Memento, Murena, Etincel, Perroella, Majestic, Sy Scoop et Trapeze, les quatre premières étant des variétés à deux rangs et les cinq dernières des variétés à six rangs. De plus, deux variétés françaises supplémentaires (Ketos et Touareg, orge d'hiver à six rangs) ont été incluses comme témoins positifs car elles ont montré une forte sensibilité à l'helminthosporiose au champ (Communication personnelle, Matthieu Bogard, 2022). Les cinq variétés de printemps (à deux rangs) de la série Afanassenko sont, de la plus résistante à la plus sensible : CI9825, Prior, Harbin, Skiff et Harrington. Le matériel d'orge pour l'inoculation a été obtenu en semant huit à quatorze graines, selon le taux de germination de chaque variété, dans des pots de 7 × 7 × 9 cm contenant du substrat N2 humin (Neuhaus®) et en les maintenant en serre à une température de 21 ± 3 °C, avec 14 h/jour de lumière naturelle ou artificielle (280 W/m²). Après deux semaines, les plantes présentaient deux feuilles complètement développées.

Matériel fongique

Nous avons utilisé la collection de 207 isolats de *P. teres* prélevés entre 2018 et 2021 dans différentes localités en France (Ramirez Martinez *et al.* 2024, cf. 2.1.1).

L'absence de production de conidies a été observée

pour de très nombreuses souches après l'isolement initial sur boîtes de Petri. Par conséquent, l'induction de la formation de conidies a été tentée selon de nombreuses approches afin d'obtenir un nombre suffisant de spores pour réaliser des infections en conditions contrôlées (données non montrées). L'approche ayant permis de maximiser la production de conidies sur boîte de Petri est une méthodologie adaptée de Jacques *et al.* (2021). Les colonies ont été cultivées sur gélose V8-PDA pendant une semaine. Seize disques de 6 mm ont été positionnés le long du bord de la gélose V8-PDA fraîche dans les boîtes de Petri, la face mycélienne orientée vers le haut. Ces boîtes de Petri, couvercles retirés, ont été placées dans des boîtes de conservation propres et translucides, puis exposées à la lumière UV proche (UV-P) pendant 24 heures. Elles ont ensuite été scellées et incubées dans l'obscurité à 15 °C pendant 18 heures. Après incubation, l'excédent d'agar, non en contact avec les disques de culture, a été éliminé. L'observation des conidies a conduit à un rinçage délicat des disques avec 5 mL d'une solution de Tween 80 à 0,02 %, et le détachement des conidies du mycélium a été réalisé à l'aide d'un pinceau. La concentration en conidies a été déterminée à l'aide d'une cellule de comptage de Malassez.

Production et inoculation de l'inoculum

Différentes méthodes d'inoculation ont été testées afin d'identifier une méthode standard adaptée à l'évaluation de la résistance à l'helminthosporiose chez les variétés d'orge. L'inoculation a été réalisée et évaluée sur des plantes entières et des feuilles détachées. Deux types d'inoculum, à savoir des conidies et du mycélium, ont été testés sur les plantes entières, tandis que seules les conidies ont été utilisées sur les feuilles détachées. Comme de nombreux isolats ne produisaient pas de conidies, ou pas suffisamment pour obtenir une suspension concentrée adaptée à l'inoculation, notre première approche a consisté à inoculer des plantes avec des suspensions de conidies pour les isolats conidiogènes et, parallèlement, à inoculer des plantes avec du mycélium, en adaptant les méthodologies utilisées dans d'autres études (Arabi *et al.* 1992, Karakaya *et al.* 2006, Oğuz *et al.* 2017, Oğuz *et al.* 2019) pour tous les isolats (conidiogènes et aconidiogènes). Notre objectif était d'élaborer une méthodologie permettant de tester les variétés indépendamment de leur capacité à produire des conidies.

Inoculation de plantes entières à l'aide de suspensions de conidies

Les conidies obtenues selon la méthode modifiée de Jacques *et al.* (2021) ont été mises en suspension dans l'eau et ajustées à une concentration de 2×10^5 conidies/mL pour sept isolats produisant suffisamment de conidies (*Ptt* : $n = 6$, *Ptm* : $n = 1$). 1 mL de cette suspension a ensuite été mélangé à 1 mL d'une solution cryoprotectrice dans un flacon de 2 mL et conservé à -80 °C jusqu'à l'inoculation. La survie des conidies après cryoconservation a été confirmée préalablement. Le jour de l'inoculation, les flacons ont été décongelés à 4 °C, puis mélangés à une solution de gélatine à 0,5 % pour obtenir un volume final de 20 mL, soit une concentration de 5 000 conidies/mL. La concentration et la quantité de suspension de conidies ont été préalablement

standardisées à l'aide des isolats FRA0005 et FRA0055 et des variétés Etincel et Trapeze. Les plantes ont été obtenues selon la méthode décrite précédemment. Pour chaque isolat, un plateau contenant un pot de huit plantes par variété a été préparé, les pots étant disposés aléatoirement. Le plateau a été uniformément pulvérisé avec 20 mL de suspension de conidies. Les plantes inoculées ont été placées pendant 24 h dans une chambre de brumisation obscure à 28 °C et à 100 % d'humidité relative, puis dans une pièce à 19 °C, sous une photopériode de 12 h/12 h et un éclairage de 165 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Après une semaine, les symptômes ont été évalués. Six feuilles par pot ont été collées sur du papier blanc, puis scannées pour obtenir des images à haute résolution, analysées ultérieurement avec le logiciel LeAftool (<https://github.com/sravel/LeAftool>) intégré à IPSDK Explorer 3.2. Ce logiciel utilise une approche d'apprentissage automatique pour construire des modèles capables de reconnaître et de mesurer la surface des lésions foliaires. Deux modèles ont été construits et entraînés pour reconnaître la nécrose et la chlorose, symptômes de la tache réticulée. Le premier modèle était adapté à l'analyse de la quasi-totalité des feuilles symptomatiques, tandis que le second a été entraîné à analyser uniquement les feuilles fortement desséchées après l'infection et l'incubation, cas où le premier modèle ne parvenait pas à identifier la feuille, celle-ci étant entièrement chlorotique. Les deux modèles ont permis de détecter la maladie quelle que soit la forme de *P. teres*.

Inoculation de plantes entières à l'aide d'une suspension de mycélium

Trente-deux isolats conidiogènes et aconidiogènes, représentatifs des différents groupes génétiques de *P. teres* identifiés dans Ramírez Martínez *et al.* (2024) ont été sélectionnés et répartis en six lots. Chaque isolat a été cultivé sur 10 boîtes de Petri contenant du milieu PDA pendant 10 jours à 25 °C dans l'obscurité, les boîtes étant scellées avec du ruban adhésif afin d'éviter toute formation de conidies. Après 10 jours, 2 g de mycélium ont été prélevés par grattage des colonies à l'aide de scalpels propres, mis en suspension dans du Tween 80 à 0,02 %, soniqués (50 Hz pendant 30 s), puis filtrés sur une gaze de nylon en conservant le mycélium retenu. Le filtrat, susceptible de contenir des conidies, a été éliminé. Le mycélium a ensuite été mis en suspension dans 20 mL de gélatine à 1 %, homogénéisé, puis soniqué à nouveau jusqu'à obtention d'un mélange homogène.

La suspension mycélienne a été utilisée pour pulvériser les plantes d'un plateau préalablement préparé, contenant les 16 variétés d'orge disposées aléatoirement. Les plateaux ont ensuite été traités comme lors d'une pulvérisation de conidies : placés en chambre de brumisation pendant 24 h, puis à 19 °C pendant une semaine.

L'inoculation de mycélium mélangé à de la gélatine n'a produit que de faibles symptômes, voire aucun (résultats non présentés). L'observation des feuilles n'a révélé aucune trace de gélatine, ce qui indique que l'inoculum avait été lessivé dans la chambre de brumisation. Par conséquent, la méthode a été modifiée pour le lot suivant d'isolats, en remplaçant la gélatine par du Tween 20 à 0,2 % pour préparer la suspension mycélienne.

Avec cette suspension, l'inoculum n'a pas été lessivé et des symptômes typiques de l'helminthosporiose ont été observés, bien que les lésions soient plus petites que celles obtenues avec les conidies. Afin d'accroître l'étendue des symptômes, la durée d'exposition en chambre humide a été portée à 48 h, ce délai étant considéré comme optimal pour induire l'infection par les conidies (Oğuz *et al.* 2017). Cependant, après 48 h d'obscurité, les plantes présentaient un état défavorable, avec des feuilles pâles et chlorotiques. D'autres conditions d'éclairage et méthodes ont donc été testées : par exemple, les plantes inoculées ont été placées dans des sacs en plastique plutôt que dans une chambre humide, ou exposées à la lumière (artificielle ou naturelle) pendant un certain temps avant d'être replacées dans une chambre humide. Pour chaque traitement expérimental, les symptômes ont été évalués sept jours après l'inoculation, selon la même méthode d'analyse d'images que pour le test aux conidies. Un test de corrélation de Spearman a été réalisé avec R (<https://www.r-project.org/>) afin d'évaluer la relation potentielle entre la surface d'infection obtenue par conidies et celle obtenue par mycélium.

Inoculation de feuilles détachées à l'aide d'une suspension de conidies

Parallèlement aux expériences réalisées sur le mycélium, nous avons entrepris d'évaluer la pathogénicité en utilisant uniquement les sept isolats ayant sporulé suffisamment pour procéder au test de pathogénicité, et en utilisant des feuilles détachées plutôt que des plantes entières, sachant que les résultats peuvent être corrélés à ceux obtenus avec des plantes entières (El-Mor *et al.* 2018). Les conidies ont été produites et collectées selon la méthodologie adaptée de Jacques *et al.* [38], décrite précédemment. La concentration des suspensions de conidies a été ajustée à 18 750 conidies/mL avant leur mélange à la solution cryoprotectrice, puis leur conservation à -80 °C. Cette concentration avait été préalablement standardisée lors d'une expérience préliminaire menée avec quatre isolats (FRA0005, FRA0018, FRA0042 et FRA0064) et trois variétés (Etincel, Touareg et Trapèze) (résultats non présentés). Le protocole d'inoculation foliaire a été adapté de la méthodologie décrite par El-Mor *et al.*

Pour chaque variété, six secondes-feuilles ont été prélevées sur des plants âgés de deux semaines et placées dans une chambre humide constituée d'une boîte de Petri carrée de 245 mm contenant 0,8 % d'agar. Les six feuilles ont été fixées à la face interne du couvercle de la boîte de Petri à l'aide de deux bandes de ruban adhésif translucide, leur face inoculée orientée vers l'agar. Les boîtes de Petri ont été fermées en évitant tout contact direct des feuilles avec l'agar. Pour chaque isolat, le stock de conidies congelées préalablement préparé a été décongelé, puis conservé à 4 °C et mélangé à une solution de gélatine à 0,5 % pour obtenir une concentration finale de 1875 conidies/mL. Les feuilles contenues dans chaque boîte de Petri (une boîte par variété) ont été inoculées avec 1 mL de suspension conidienne par pulvérisation uniforme sur leur surface. Les boîtes inoculées ont été maintenues à 25 °C, sous une photopériode de 12 h/12 h, pendant sept jours avant la mesure des symptômes à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images, comme décrit

précédemment. Trois répétitions techniques ont été réalisées, soit trois boîtes de Petri inoculées pour chaque isolat et chaque variété. Des témoins négatifs ont été obtenus par pulvérisation d'une suspension de gélatine sans conidies. L'expérience a été répétée deux fois, portant le total à trois réplicats biologiques.

Le pourcentage de surface lésée (surface de la lésion divisée par la surface de la feuille) a été calculé, puis analysé statistiquement à l'aide de R. La reproductibilité de la méthode a été évaluée en examinant les corrélations entre les réplicats au moyen du test de Spearman. Le pourcentage de surface lésée a été estimé pour chaque réplicat technique de chaque combinaison variété-isolat, puis moyenné sur l'ensemble des réplicats biologiques. Pour déterminer l'effet du facteur variété sur cette proportion, un modèle linéaire a été utilisé. Ce modèle a également pris en compte les effets potentiels des réplicats, ainsi que l'interaction entre les facteurs isolat et variété. La fonction `drop1` a été utilisée pour évaluer le poids de chaque facteur du modèle. Les variétés et les isolats ont été comparés par paires à l'aide du test de Tukey. Un autre modèle linéaire a ensuite été analysé afin d'explorer les interactions potentielles entre l'origine des isolats de *Ptt* et le type d'orge. Pour ce faire, les isolats ont été classés selon le type d'orge d'origine (orge de printemps ou d'hiver), tandis que les variétés d'orge ont également été séparées selon leurs exigences de vernalisation (orge de printemps ou d'hiver). Les résidus des modèles ont été examinés à l'aide de graphiques quantile-quantile (qq-plots).

► **Déterminisme génétique et modélisation basée sur des marqueurs génétiques de la résistance à l'helminthosporiose chez l'orge d'hiver**

Matériel végétal

Un panel de 289 accessions d'orge a été testé dans le projet. Ce panel comprend un sous-ensemble de la collection nationale d'orge d'hiver établie précédemment dans le cadre des projets CASDAR COLNATOR et CASDAR RHYNO (200 accessions), 80 variétés d'orge d'hiver inscrites en France et 9 variétés d'orge de printemps. Ce panel comprend des variétés inscrites en France entre 1934 et 2020 mais aussi des lignées de sélection non inscrites. Il est composé pour moitié d'orges 2 rangs et pour moitié d'orges 6 rangs.

Phénotypage en conditions agronomiques

Le panel a été testé pour la sensibilité à l'helminthosporiose dans 9 essais en conditions agronomiques réalisés dans le cadre du projet FSOV HELMO. Par ailleurs, des notations de sensibilité à l'helminthosporiose étaient disponibles dans des essais réalisés antérieurement sur les 200 accessions de la collection nationale d'orges d'hiver et pour les 280 accessions hiver du panel dans les projets CASDAR COLNATOR et CASAR RHYNO. Au total, vingt essais en conditions agronomiques ont été réalisés dans différents lieux en France (Tableau 2). Ceux-ci correspondaient généralement à des dispositifs en deux blocs randomisés constitués de parcelles d'observation de deux à trois lignes de 1m pour chaque variété. Dans chaque essai, des notations visuelles de la sensibilité à l'helminthosporiose ont été réalisées à différentes dates dans chaque essai et la notation la plus discriminante a été retenue. Par ailleurs, la date d'épiaison et la hauteur

Projet	Partenaire	Année	Essai	Lieu	Latitude	Longitude	Date semis	Hauteur plante	Date d'épiaison	d1.helm	d2.helm	d3.helm
COLNATOR	SECOBRA	2017	SEC17	MAULE	48.92	1.82	05/10/2016	X	X	16/05/2017		
COLNATOR	LIMAGRAIN	2017	LIM17	VERNEUIL-L-ETANG	48.65	2.84	05/10/2016		X	unknown		
COLNATOR	UNISIGMA	2017	UNI17	FROISSY	49.57	2.22	30/09/2016	X	X	19/05/2017		
COLNATOR	KWS-MOMONT	2017	KWS17	MONS-EN-PEVELLE	50.48	3.10	02/10/2016	X	X	25/04/2017	30/05/2017	
COLNATOR	ASUR PLANT BREEDING	2018	ASU18	ESTREES-SAINT-DENIS	49.25	2.44	04/10/2017	X	X	unknown		
COLNATOR	LEMAIRE-DEFFONTAINES	2018	LEM18	AUCHY-LEZ-ORCHIES	50.47	3.23	04/10/2017	X	X	25/04/2018	23/05/2018	
COLNATOR	SYNGENTA	2018	SYN18	BERCHERES-LES-PIERRES	48.32	1.57	18/10/2017	X	X	23/05/2018		
COLNATOR	RAGT	2018	RAG18	PREMESQUES	50.66	2.95	29/09/2017	X	X	17/05/2018		
RHYNO	FLORIMOND-DEPREZ	2021	FLO21	HOUVILLE-LA-BRANCHE	48.44	1.64	18/10/2020	X	X	03/05/2021	04/06/2021	
RHYNO	ARVALIS	2022	ARV22	VILLIERS-LE-BACLE	48.73	2.11	14/10/2021	X	X	27/04/2022	13/05/2022	
RHYNO	UNISIGMA	2022	UNI22	ESSUILES	49.48	2.27	13/10/2021	X	X	18/05/2022		
HELMO	FLORIMOND-DEPREZ	2022	FLO22	HOUVILLE-LA-BRANCHE	48.44	1.64	16/10/2021	X	X	13/04/2022	01/05/2022	27/05/2022
HELMO	SECOBRA	2022	SEC22	MAULE	48.92	1.82	18/10/2021			07/05/2022		
HELMO	LEMAIRE-DEFFONTAINES	2023	LEM23	AUCHY-LES-ORCHIES	50.49	3.19	11/10/2022		X	15/05/2023		
HELMO	UNISIGMA	2023	UNI23	REUIL-SUR-BRECHE	49.51	2.23	05/10/2022		X	22/05/2023		
HELMO	RAGT	2023	RAG23	HANTAY	50.54	2.88	12/10/2022		X	11/05/2023	24/05/2023	
HELMO	ASUR	2023	ASU23	ESTREES-SAINT-DENIS	49.25	2.44	05/10/2022	X	X	18/04/2023	23/05/2023	
HELMO	FLORIMOND-DEPREZ	2023	FLO23	HOUVILLE-LA-BRANCHE	48.44	1.64	16/10/2022	X	X	07/04/2023	24/04/2023	22/05/2023
HELMO	LIMAGRAIN	2023	LIM23	VERNEUIL-L'ETANG	48.65	2.96	11/10/2022	X	X	25/04/2023	11/05/2023	
HELMO	SECOBRA	2023	SEC23	MAULE	48.92	1.82	19/10/2022			26/04/2023	17/05/2023	

Tableau 2 : Descriptif des essais utilisés pour rechercher des facteurs de résistance à l'helminthosporiose de l'orge par génétique d'association. Les essais ont été réalisés dans le cadre de différents projets (CASDAR COLNATOR, CASDAR RHYNO et FSOV HELMO) et par différents partenaires entre 2017 et 2023. L'acronyme de chaque essai est indiqué ainsi que le lieu, les coordonnées, la date de semis, si des mesures de hauteur ou de date d'épiaison ont été réalisés et les dates de notation de la sensibilité à l'helminthosporiose (1 à trois notations ont été réalisées selon les essais).

Code isolats	Plante hôte	Variété	Département	Laboratoire
FRA0018	Orge Hiver	Ketos	77	ARVALIS
FRA0055	Orge Printemps	KWS Jessie	28	ARVALIS
FRA0042	Orge Hiver	Etincel	28	INRAE
FRA0064	Orge Printemps	RGT Planet	91	INRAE

Tableau 3 : Caractéristiques des isolats de *Pyrenophora teres f. teres* utilisés pour évaluer la sensibilité variétale du panel en conditions contrôlées par les laboratoires d'INRAE PHIM et ARVALIS.

des plantes ont été mesurées dans la plupart des essais. Les notes visuelles de sensibilité à l'helminthosporiose ont été corrigées des effets de la date d'épiaison et de la hauteur selon la méthode proposée par (Beuningen and Kohli, 1990) : d'abord, les notes ont été normalisées par le calcul du coefficient relatif d'infection (RCI)

$$RCI_{ij} = S_{ij} / \max(S_j) \times 100$$

Avec RCI_{ij} le coefficient relatif d'infection pour le génotype i dans l'essai j , S_{ij} la note de sensibilité du génotype i dans l'essai j et $\max(S_j)$ la sensibilité maximale observée dans l'essai j . Ensuite, les résidus de la régression linéaire multiple expliquant RCI_{ij} par la hauteur et la date d'épiaison ont été calculés pour chaque génotype dans chaque essai :

$$RCI_{ij} = HD_{ij} + PH_{ij} + \epsilon_{ij}$$

Avec RCI_{ij} le coefficient relatif d'infection pour le génotype i dans l'essai j , HD_{ij} la date d'épiaison du génotype i dans l'essai j , PH_{ij} la hauteur du génotype i dans l'essai j et ϵ_{ij} les résidus de la régression nommés DRIHH (« deviation from the regression of infection on heading and height »).

Phénotypage en conditions contrôlées

La sensibilité du panel a été évaluée pour 4 souches de la collection française dont 2 isolées à partir d'orge d'hiver et 2 isolées à partir d'orge de printemps (Tableau 3). Deux souches ont été testées dans les conditions expérimentales mises au point à INRAE et deux autres dans celles d'Arvalis avec des protocoles légèrement différents en ce qui concerne le dispositif, l'inoculation et la notation des symptômes. La mise au

point et la comparaison des protocoles ont été réalisées dans le cadre du projet mais ne sont pas détaillées dans cet article pour conserver la clarté du texte.

Protocole INRAE

Les souches FRA0042 (isolée à partir d'un échantillon d'orge d'hiver) et FRA0064 (issue d'un échantillon d'orge de printemps) ont été testées par INRAE pour 276 variétés du panel. Neuf expérimentations indépendantes par souche ont été réalisées pour pouvoir phénotyper l'ensemble du panel. La variété ETINCEL était présente dans tous les essais et les autres variétés étaient présentes dans deux essais pour chaque souche (2 répétitions biologiques). Des pots contenant 6 plantes ont été produits en chambre de culture. L'inoculation a été réalisée sur feuilles détachées selon le protocole décrit précédemment (cf. 2.1.5). La deuxième feuille de chaque plante a été prélevée et l'ensemble des feuilles a été étalé sur une boîte contenant un milieu gélosé. L'inoculation de chaque boîte a été réalisée par spray de 1mL d'une solution à 1875 spores.mL⁻¹ et les boîtes ont été maintenues à 25°C pendant 7 jours pour favoriser le développement des spores. Des scans des feuilles ont été réalisés et le pourcentage de surface nécrosée à 7 jours post-inoculation a été déterminé par analyse d'image.

Protocole Arvalis

Les souches FRA0018 (issue d'un échantillon d'orge d'hiver) et FRA0055 (issue d'un échantillon d'orge de printemps) ont été testées par ARVALIS pour 275 variétés du panel. Les variétés ont été réparties dans cinq expérimentations indépendantes par souche. Huit variétés témoins (Etincel, RGT Planet, Ketos, Memento, Majestic, Sy Scoop, Solen et Laser) étaient présentes dans tous les essais ainsi que deux témoins négatifs non inoculés (Etincel et RGT Planet). En dehors des témoins, chaque variété était présente dans deux essais pour chaque souche (répétitions biologiques). Des pots contenant 5 plantes ont été produits en chambre de culture. Les pots ont été arrosés et maintenus en chambre de culture avec une température diurne de 22°C, nocturne de 18°C, une photopériode de 16h et une humidité relative de 80% le jour et 100% la nuit. L'inoculation a été réalisée à semis +12 jours sur 5 feuilles (répétitions techniques) à l'aide d'une solution de spores (3750 spores.mL⁻¹) étalée au pinceau sur une zone délimitée de 7cm par feuille (trois allers-retours). Les pots ont été ensachés durant 72h afin de favoriser l'infection. Des notations visuelles du pourcentage de surface nécrosée ont été réalisées 7 et 10 jours après inoculation. Les notations à 10 jours post-inoculation, plus discriminantes, ont été retenues pour les analyses. Pour chaque variété, une moyenne du pourcentage de surface nécrosée a été calculée pour chaque souche en tenant compte d'un effet aléatoire « essais » et d'un effet « variété » fixe à l'aide d'un modèle mixte.

Génétique d'association et prédiction génomique

Les 280 variétés d'orge d'hiver du panel ont été génotypées à l'aide de la puce Illumina Infinium iSelect 50K (Bayer *et al.* 2017). Les données manquantes ont été imputées à l'aide de Beagle (Browning, 2008) et les marqueurs ont été cartographiés sur la version 2 du génome de Morex (Monat *et al.* 2019). La structure de la population a été évaluée à l'aide de STRUCTURE

(Pritchard *et al.* 2000) et le nombre de sous-populations a été déterminé à l'aide de la méthode proposée par (Evanno *et al.* 2005). Une GWAS a été réalisée pour le DRIHH dans chaque essai au champ et pour le pourcentage de nécroses pour chaque souche testée en conditions contrôlées à l'aide du modèle mixte suivant :

$$Y_{ij} = \mu_j + \beta_{mj}X_{im} + PC_{ik} + G_i + \varepsilon_i$$

Avec Y_{ij} le phénotype de l'individu i dans l'essai ou pour la souche j , μ la moyenne dans l'essai ou pour la souche j , β_{mj} l'effet fixe du marqueur m dans l'essai ou pour la souche j , X_{im} le génotype de l'individu i au marqueur m , PC_{ik} les coordonnées de l'individu i sur la composante principale k (deux composantes ont été retenues), G_i l'effet aléatoire du génotype i avec une covariance dérivée de la matrice d'apparentement calculée avec rrBLUP et ε_{ij} un résidu.

Ce modèle a été ajusté pour chaque marqueur à l'aide du package MM4LMM (Laporte *et al.* 2022). Un seuil de significativité de $-\log_{10}(p)=5,09$ a été calculé à l'aide de la méthode proposée par (Gao *et al.* 2010). Une méta-analyse des résultats de GWAS par essai ou souche a été réalisée séparément à l'aide du package metaGE (Walsche *et al.* 2025). Un modèle à effets aléatoires a été ajusté, tenant ainsi compte de l'hétérogénéité possible des effets des QTL entre les essais/souches. La procédure de Benjamini-Hochberg a été appliquée pour identifier des marqueurs significativement associés avec des valeurs $p \leq 0,05$.

Les limites des QTL ont été définies en fonction du déséquilibre de liaison (DL) (Cormier *et al.* 2014). Le DL a été calculé en tenant compte de la structure de la population et de l'apparentement à l'aide du package LDcorSV (Mangin *et al.* 2012). Tout d'abord, un seuil (« DL critique ») correspondant au 95^{ème} percentile du DL calculé pour 1 000 000 de paires de marqueurs non liés (cartographiés sur différents chromosomes) a été calculé. Ensuite, le DL entre SNP significativement associés et cartographiés sur un même chromosome a été calculé et ils ont été regroupés en fonction de la distance moyenne à l'aide d'un seuil de 1 - « DL critique ». Pour chaque cluster de SNP, le DL a été calculé pour chaque paire de marqueurs dans une région située entre le marqueur proximal du cluster de SNP -5% de la longueur totale du chromosome et le marqueur distal du cluster de SNP +5% de la longueur totale du chromosome. La décroissance du DL a ensuite été modélisée à l'aide d'un spline et la distance physique correspondant à un DL égal à 0,2 a été calculée. Cette valeur a été utilisée pour étendre les limites des QTL (Alqudah *et al.* 2020). Les QTL ont été nommés en concaténant le nom du chromosome et la position du marqueur le plus significatif (en Mbp). Les gènes ayant des fonctions prédites liées à la résistance à la maladie (« disease resistance protein », « leucine rich-repeat », « receptor-kinase ») ont été identifiés et leur différentiel d'expression a été examiné à partir de la base de données accessible sur <http://barleyexp.com/> (Li *et al.* 2023). Les résultats de GWAS ont été confrontés aux résultats publiés dans la littérature sur la sensibilité à *P. Ptt* et *Ptm* (Tamang *et al.* 2015; Burlakoti *et al.* 2016; Koladia *et al.* 2017; Wonneberger *et al.* 2017a, b; Richards *et al.* 2017; Vatter *et al.* 2017; Amezrou *et al.* 2018; Rozanova *et al.* 2019; Novakazi *et al.* 2019).

La sensibilité moyenne à l'helminthosporiose de chaque individu a été calculée à l'aide d'un modèle linéaire mixte avec le génotype en effet fixe et l'essai en effet aléatoire. Un modèle GBLUP a été calibré à l'aide du package BGLR (Pérez and de los Campos, 2013). Une validation croisée de type k-fold (k=10) a été réalisée afin d'évaluer la capacité du modèle à prédire la sensibilité à l'helminthosporiose pour des génotypes non testés : pour chaque fold, 10% des variétés ont été écartées du jeu de données de calibration, le modèle a été calibré sur les 90% de variétés restantes et la corrélation entre valeurs prédites et observées pour les 10% restantes a été calculée. Ce processus a été répété 10 fois et la moyenne des corrélations entre valeurs prédites et valeurs observées obtenues pour chaque fold a été calculée.

► Prédiction du risque Helminthosporiose

Dans le cadre du projet FSOV HELMO, nous avons étudié les facteurs agronomiques et climatiques associés au développement de l'helminthosporiose afin de construire des outils de prévision du risque et d'optimiser les interventions fongicides en T1 et en T2. Les analyses ont finalement porté sur la prévision du risque avant et après DFE afin de couvrir l'ensemble des situations décisionnelles et de vérifier la cohérence des prévisions sur le cycle cultural. Des méthodes statistiques ont été mobilisées afin d'atteindre cet objectif en exploitant de larges bases de données. L'enjeu final est de mieux anticiper les niveaux de risque, de limiter les applications inutiles et d'ajuster les traitements en fonction de leur impact potentiel sur la nuisibilité.

Jeu de données mobilisés

Afin de construire des modèles prédictifs du risque lié à l'helminthosporiose de l'orge, deux bases de données ont été construites en compilant des données issues de différentes sources.

Une première base de données (BDD1) a été constituée à partir d'observations réalisées en France entre 2004 et 2024 sur 2 390 parcelles non traitées issues des réseaux d'épidémiosurveillance Vigicultures/Végéobs. Pour chaque parcelle, 20 plantes ont été échantillonnées et les trois dernières feuilles déployées (F1, F2, F3) notées pour l'incidence d'helminthosporiose (0-20) selon Simonneau *et al.* (2011b). La base intègre également des informations agronomiques. L'analyse s'est limitée aux observations précoces, entre les stades 1N et DFP, afin de garantir l'utilisation exclusive de parcelles non traitées et d'identifier les variables associées au développement précoce de la maladie. Deux variables cibles à prédire ont été définies : (i) la date de franchissement du seuil de 20 % d'incidence moyenne, et (ii) l'incidence moyenne observée sur F1-F3 entre 1N et DFP.

Une seconde base de données (BDD2) a été constituée à partir de notations de sévérité en fin de cycle, réalisées sur témoins non traités entre les stades Zadoks 71 (début remplissage du grain) et 75 (grain laitux). Les données proviennent d'essais conduits par Arvalis et d'essais conduits dans le projet HELMO, incluant plusieurs observations par essai selon la variété, le stade de développement et les étages foliaires notés. Afin d'intégrer cette

variabilité et d'obtenir une valeur unique par site-année, des moyennes ajustées selon niveau de sensibilité variétal, le stade et l'étage foliaire ont été calculées à l'aide du package R *emmeans*. Cette démarche a permis d'analyser spécifiquement l'effet de la note de sensibilité variétale sur la sévérité finale et de constituer un jeu de données de sévérité finale de l'helminthosporiose couvrant 162 sites-années. Ce jeu de données a été utilisé pour développer des modèles prédictifs du risque climatique lié à la sévérité d'helminthosporiose en fin de cycle.

Pour l'analyse des deux bases de données, les variables d'incidence moyenne d'helminthosporiose précoce (BDD1) et de sévérité finale (BDD2), exprimées en pourcentage ont été préalablement transformées afin de stabiliser la variance et d'améliorer la normalité des résidus (Ahrens *et al.* 1990).

Analyse préliminaire des effets des facteurs agronomiques

Une analyse de variance (ANOVA) a été réalisée afin d'évaluer les effets des facteurs agronomiques sur l'incidence moyenne précoce d'helminthosporiose dans la BDD1. Le modèle incluait la note de résistance variétale à l'helminthosporiose, la précocité de semis (précoce/moyen/tardif), le précédent cultural (orge vs autre), le travail du sol (labour vs non-labour) et les interactions (note de résistance x précocité de semis et travail du sol x précédent) comme effets fixes. Des effets aléatoires pour année, secteur géographique et leur interaction ont été inclus pour prendre en compte la structure hiérarchique du jeu de données. Les hypothèses d'homoscédasticité et la normalité des résidus ont été vérifiées graphiquement.

Variables climatiques étudiées

Dans les différentes bases de données, des variables climatiques ont été calculées à partir de plusieurs paramètres météorologiques : température, précipitations, évapotranspiration et rayonnement. Les données, disponibles à une résolution journalière, proviennent d'un réseau étendu de stations Arvalis et Météo-France. Ces variables ont été ensuite interpolées et attribuées aux coordonnées géographiques de chaque parcelle (Deudon *et al.*, 2017).

Une quinzaine de variables climatiques potentiellement influentes sur le risque de développement de l'helminthosporiose ont été définies à partir de la littérature et d'avis d'experts. Parmi ces variables figurent par exemple la pluviométrie cumulée, le nombre de jours pluvieux, le nombre de séquences de trois jours consécutifs de pluie, le nombre de jours avec une température maximale supérieure à 15 °C, la somme des températures minimales, ... Des indices cumulatifs intégrant simultanément les conditions journalières de température et de précipitations favorables à la sporulation d'après la littérature, ont également été explorés. Les variables climatiques ont été calculées pour la campagne en cours, la précédente et l'interculture, afin d'intégrer l'effet potentiel de l'inoculum résiduel.

Deux types de fenêtres temporelles ont été explorées pour le calcul des variables climatiques : (i) des intervalles définis par des stades phénologiques de l'orge, estimés à l'aide d'un modèle phénologique décrit par Gouache *et al.* (2012), et (ii) des périodes

calendaires, d'abord basées sur les saisons, puis optimisées via une approche calendaire glissante (« window pane » Gouache *et al.*, 2015) afin d'identifier au mieux les périodes calendaires les plus déterminantes. Cette approche consiste à faire varier simultanément la date de début et la durée de la fenêtre de calcul de chaque variable, ce qui a permis de générer plus de 4 000 variables climatiques distinctes.

Sélection préalable des variables climatiques

Pour construire les modèles prédictifs, une réduction de dimensionnalité s'est avérée nécessaire en raison du grand nombre de variables par rapport aux observations et pour limiter le risque de multicolinéarité lié aux fortes corrélations entre variables climatiques susceptibles de biaiser les estimations des modèles. Une présélection des variables explicatives a ainsi été réalisée en trois étapes : (i) suppression des variables fortement corrélées ($r^2 > 0.8$), (ii) élimination des variables à faible variabilité ($CV < 0.05$), (iii) sélection de variables par régression pénalisée LASSO (Tibshirani, 1996).

Méthodes de modélisation

Afin d'identifier les variables agro-climatiques les plus prédictives du risque de développement de l'helminthosporiose de l'orge et de mettre en place des modèles prédictifs, différentes méthodes statistiques ont été mobilisées. Pour la prévision de l'incidence précoce et de la sévérité en fin de cycle, les performances de modèles de régression linéaire ont été comparées à celles de modèles d'apprentissage automatique via des forêts aléatoires (Breiman, 2001) qui permettent d'explorer des relations non linéaires. La prévision du franchissement du seuil de 20 % d'incidence a été réalisée à l'aide de modèles de survie de Cox à risques proportionnels, permettant de modéliser le temps jusqu'à l'événement tout en intégrant les observations censurées et d'estimer l'effet des facteurs explicatifs via des rapports de risque (Cox, 1972). Pour chaque méthode, les variables du modèle final ont été sélectionnées parmi l'ensemble des variables testées selon une procédure adaptée : une sélection stepwise basée sur l'AIC pour les régressions linéaires et les modèles de Cox, et une élimination itérative de la variable la moins importante pour les forêts aléatoires jusqu'à atteindre la RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction) minimale. L'ensemble des analyses ont été réalisées sous R (version 4.4.1).

Évaluation des modèles

Les modèles ont été évalués par validation croisée, stratifiée par année, afin de tenir compte de la variabilité interannuelle et de limiter les biais liés à la structure temporelle des données. Les métriques utilisées pour évaluer et comparer les niveaux de performance obtenus entre les régressions linéaires et les forêts aléatoires sont le RMSEP, qui mesure la précision des prédictions, et l'efficacité globale, définie comme la proportion de variance expliquée par le modèle. La performance des modèles de survie de Cox a été évaluée à l'aide de l'indice de concordance (C-index), qui quantifie la concordance entre les prédictions et l'ordre réel du dépassement du seuil de 20% d'incidence d'helminthosporiose.

La pertinence des variables explicatives retenues dans les modèles finaux a été examinée par expertise agronomique, et leur cohérence comparée entre les différentes approches de modélisation.

RÉSULTATS

► Caractérisation du complexe d'espèces et de la structure génétique des populations

Développement de ressources génomiques et analyses de génomique comparative

Nous avons assemblé et analysé les génomes de 117 isolats, représentant 13 espèces morphologiques de *Pyrenophora*, afin de mieux comprendre leur histoire évolutive et leurs déterminants de virulence.

Nous avons utilisé BUSCO pour évaluer la qualité de l'assemblage et inférer les relations phylogénétiques. Pour tous les isolats, des scores BUSCO élevés ($> 90\%$) ont été obtenus, avec une valeur moyenne de 93,5 % (écart-type = 3,8). Un réseau phylogénétique Neighbor-Net, construit à partir de l'alignement et de la concaténation de 1983 gènes BUSCO à copie unique présents dans tous les isolats, a révélé que certains d'entre eux avaient été mal classés (Figure 1). Trois isolats (CBS 115149, CBS 396.51 et CBS 397.51), initialement identifiés comme *P. trichostoma* et *P. fugax*, présentaient une distance génétique significative par rapport aux autres isolats, ce qui suggère qu'ils pourraient appartenir à un autre genre. Ces isolats ont été désignés comme « espèces non identifiées 1 et 2 » (Figure 1) et exclus des analyses ultérieures. Deux isolats, bien qu'étroitement apparentés à *P. poae*, n'ont pu être rattachés avec certitude à aucune espèce connue de *Pyrenophora* ; ils ont été désignés comme *Pyrenophora* sp.1. Six isolats se sont révélés être des erreurs de classification et ont pu être réattribués à une espèce différente. Parmi ces six isolats, trois initialement classés comme *P. trichostoma* ont été reclassés comme *P. tr.* (CBS_391.54, CBS_328.53, CBS_392.54), un isolat précédemment désigné comme *P. poae* a été reclassé comme *P. dictyoides* (CBS 317.69), un isolat initialement catégorisé comme *P. bromi* a été reclassé comme *P. chaetomioides* (IMI 319767), et un isolat désigné comme *P. grahamii* a été reclassé comme *P. lolli* (NARO 306620).

Après l'assignation phylogénétique basée sur le réseau Neighbor-Net, 114 isolats de *Pyrenophora* ont été conservés dans l'ensemble de données. Un total de 5156 gènes BUSCO monocopies ont été identifiés dans les 114 assemblages génomiques, et une généalogie génique a été inférée pour chacun d'eux. Les généalogies géniques individuelles ont été combinées à l'aide d'ASTRAL, et l'arbre phylogénétique résultant illustre les relations entre les espèces et les isolats étudiés. La plupart des nœuds de l'arbre phylogénétique sont étayés par des valeurs de bootstrap élevées (Figure 1).

L'arbre phylogénétique a révélé que certaines espèces morphologiques correspondaient à des complexes d'espèces, c'est-à-dire des groupes composites englobant plusieurs espèces phylogénétiques cryptiques. *Pyrenophora dictyoides* a pu être divisée en deux groupes divergents, désignés *P. dictyoides* 1 (le plus grand) et *P. dictyoides* 2 (le plus petit). Un isolat divergent (DAOMC 225797) a également été identifié au sein de *P. chaetomioides*, considéré comme une espèce distincte et inconnue. Cet isolat avait initialement

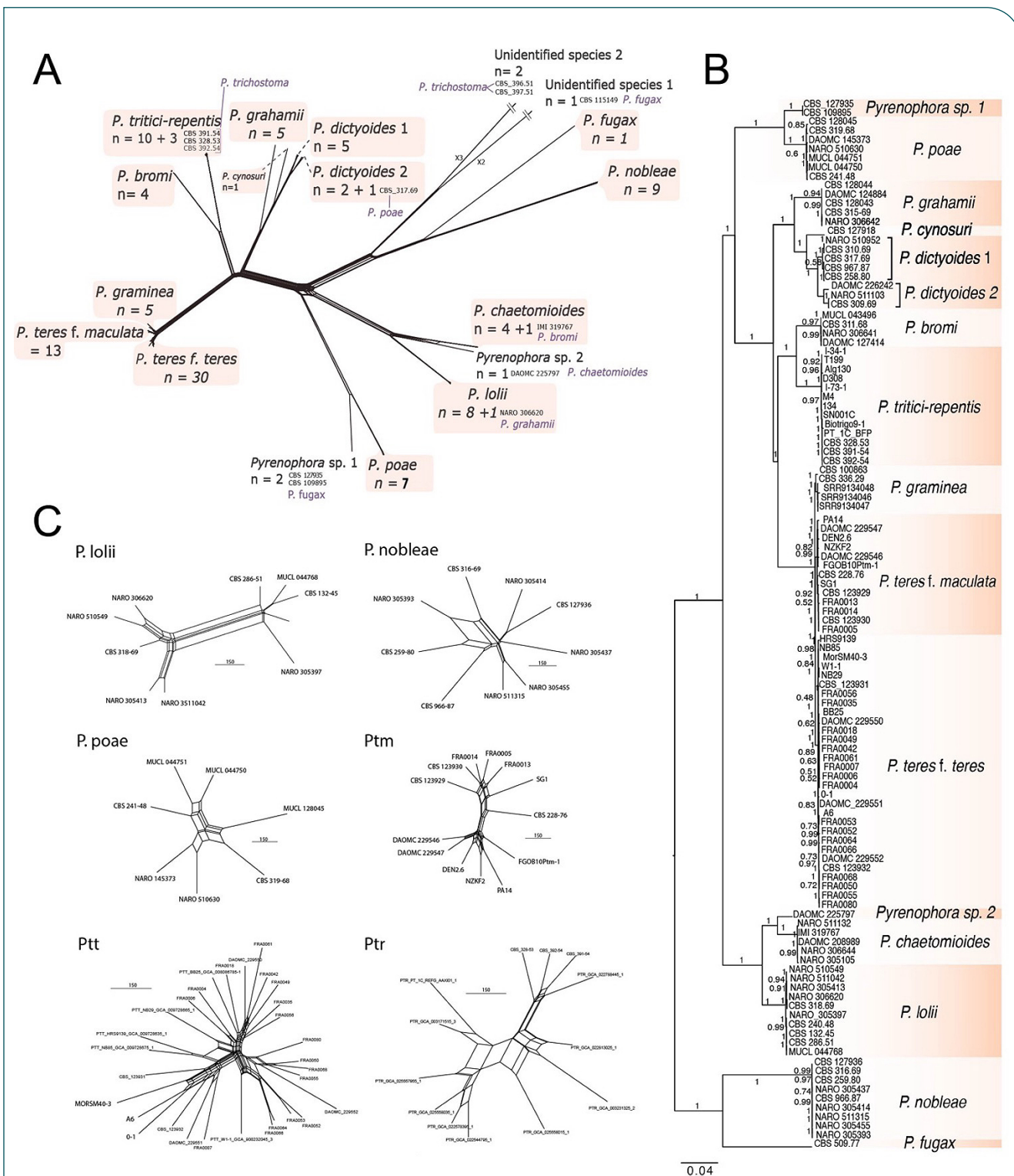


Figure 1 : Relations phylogénétiques entre 114 isolats de *Pyrenophora*. (A) Réseau phylogénétique montrant les relations entre 114 isolats de *Pyrenophora* et trois isolats non-*Pyrenophora*. Ces trois derniers, initialement considérés comme appartenant au genre *Pyrenophora*, s'avéraient en réalité d'autres espèces inconnues. Le réseau a été construit à partir de l'alignement concaténé de 1983 séquences BUSCO à copie unique présentes dans tous les isolats. Les espèces représentées dans l'ensemble de données sont indiquées à l'extrémité des branches, ainsi que la taille de l'échantillon. Les isolats dont l'attribution précédente était erronée et qui ont été attribués à de nouvelles espèces sont listés, et les espèces auxquelles ils étaient précédemment attribués sont indiquées en violet. Les espèces nommées morphologiquement sont mises en évidence par des rectangles colorés. Le réseau a été construit à partir d'une matrice de distances *p* entre les alignements (distance de Hamming). (B) Arbre phylogénétique des espèces inféré à l'aide d'ASTRAL-III. La topologie inférée résulte de la réconciliation de 5156 arbres génétiques individuels. Les longueurs des branches ont été estimées dans RAXML-NG à partir de l'arbre de l'espèce comme arbre utilisateur ; elles sont exprimées en substitutions de nucléotides par site. Les proportions de support bootstrap supérieures à 0,7 sont indiquées à côté des nœuds. L'arbre a été enraciné à l'aide de *P. fugax* et *P. nobleae* comme groupes externes. (C) Réseaux phylogénétiques montrant la structure génétique de six espèces de *Pyrenophora* pour lesquelles la taille de l'échantillon était supérieure à six.

été classé comme « *P. chaetomioides (avenae)* » dans la collection d'où il provenait. La taxonomie de *P. chaetomioides* est complexe, car *P. chaetomioides* et *P. avenae* sont à la fois des noms valides et des synonymes (Index Fugorum). Nous avons conclu qu'il était plus précis de classer DAOMC 225797 comme une nouvelle espèce, *Pyrenophora* sp. 2. Nous émettons l'hypothèse que cet isolat pourrait appartenir à l'espèce *P. avenae*, mais des analyses complémentaires, telles que l'intégration d'isolats de référence de cette espèce et la construction d'un arbre phylogénétique, sont nécessaires pour confirmer cette classification.

Les niveaux de variation moléculaire étaient remarquablement similaires entre les espèces. La diversité nucléotidique synonyme (π_s) variait de 0,0022/pb chez *Ptt* à 0,008/pb chez *P. graminea*, et le ratio π_N/π_s variait de 0,219 chez *P. graminea* à 0,318 chez *Ptt* (Tableau 4). Les tests de Kruskal-Wallis ont révélé des différences significatives entre les espèces (π_s : $H = 3209,2$, $p = 0,0$; π_N/π_s : $H = 525,9$, $p = 1,3 \times 10^{-106}$), mais les tests post hoc de Mann-Whitney (non présentés) n'ont pas permis de distinguer les espèces selon leur caractère invasif. Les valeurs de π_s observées se situaient dans la plage attendue pour un ascomycète phytopathogène (c.-à-d. inférieures à 1 %) et étaient compatibles avec des tailles de population effectives N_e de l'ordre de 10^4 (en supposant une valeur médiane de π_s de 0,0027/pb, un taux de mutation $\mu = 2 \times 10^{-8}$ /pb [21] et $N_e = \pi_s/2\mu$). Les estimations de π_N/π_s , nettement inférieures à $\pi_N/\pi_s = 1$, indiquent que la sélection négative agit relativement efficacement pour éliminer les mutations délétères. Pour *Ptt*, *Ptr* et *Ptm*, les valeurs de π_s et π_N/π_s étaient supérieures à celles attendues pour des espèces invasives, étant donné que l'histoire démographique de l'invasion peut s'accompagner de goulets d'étranglement entraînant une réduction de la diversité nucléotidique et un

enrichissement en mutations faiblement délétères (ce qui augmente le ratio π_N/π_s). Contrairement aux niveaux de variation moléculaire, la statistique de neutralité de Tajima (D) différait significativement entre les espèces (test de Kruskal-Wallis : $H = 3206,1$, $p = 0,0$), allant de valeurs médianes de $D = -0,82$ chez *P. graminea* et *P. chaetomioides* à $D = 1,46$ chez *P. grahamii*. Chez les organismes présentant une alternance de cycles sexués et asexués, comme les champignons phytopathogènes, les estimations de D de Tajima sont mieux interprétées dans le cadre de modèles de coalescence à fusions multiples (Ariyawansa et al, 2014). Les arbres de coalescence obtenus avec ces modèles présentent des généalogies plus étoilées et un excès de variants de faible fréquence (par exemple, des variants uniques) et de haute fréquence, ce qui se traduit par une valeur de D de Tajima plus négative que dans le modèle de Kingman à taille de population constante. Le D de Tajima était légèrement négatif chez *P. bromi*, *P. chaetomioides*, *P. graminea*, *P. poae* et *Ptt* (Tableau 4), ce qui est cohérent avec une taille de population relativement stable ou une croissance démographique modérée, et une structure de population peu profonde. Chez *P. dictyoides*, *P. grahamii*, *P. lolii*, *P. nobleae*, *Ptm* et *Ptr*, au contraire, le coefficient D de Tajima était positif, ce qui est cohérent avec une subdivision de la population. La structure plus profonde de *P. lolii*, *Ptm* et *Ptr* peut être visualisée dans les réseaux phylogénétiques (Figure 1).

Diversité génétique et structure des populations de *Pyrenophora*

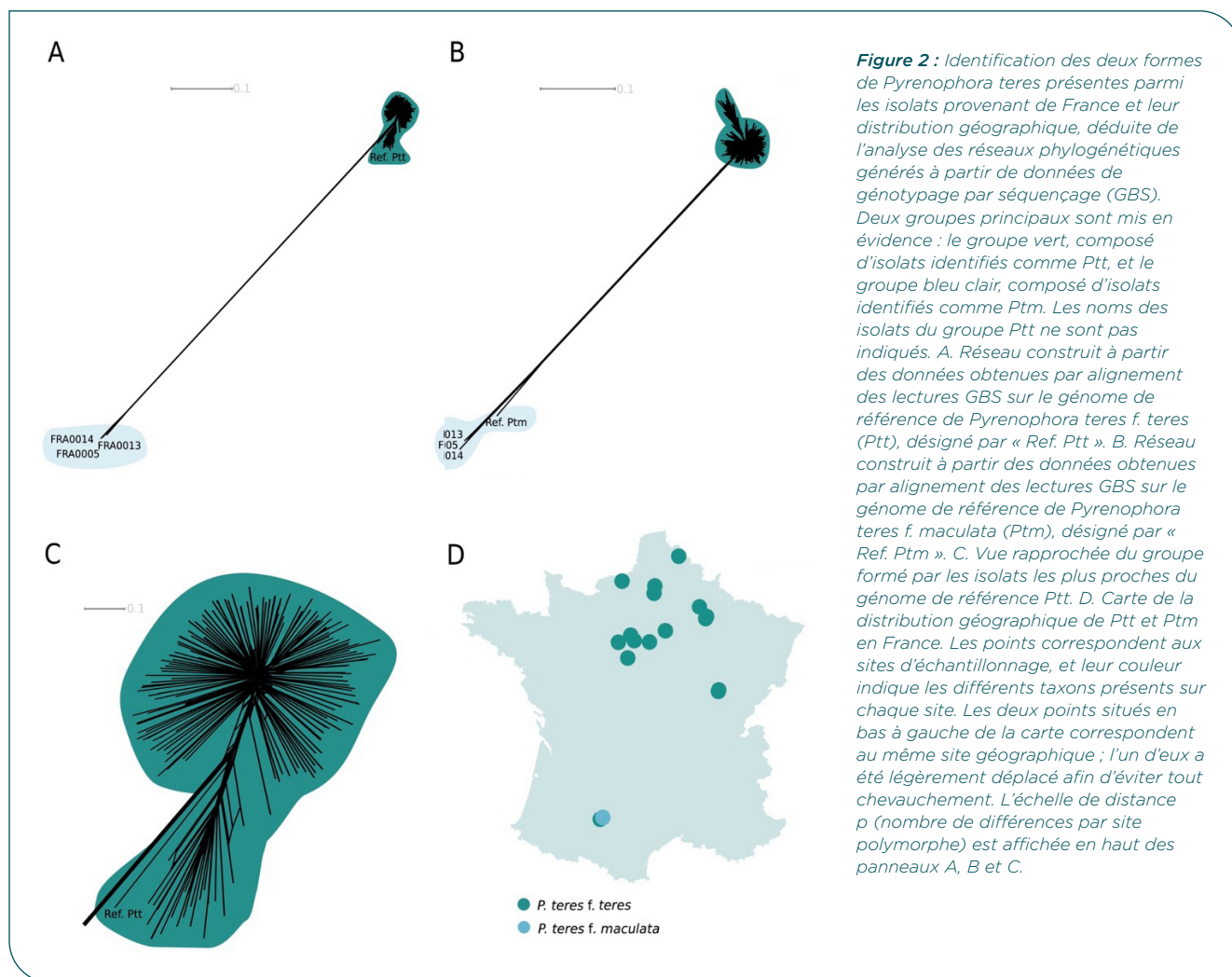
Ptt est plus fréquent que *Ptm* comme agent pathogène de l'orge en France

Au total, 207 isolats de *Pyrenophora teres* ont été obtenus lors de quatre campagnes de collecte réalisées en 2018 ($n=39$), 2019 ($n=11$), 2020 ($n=94$) et 2021 ($n=63$). Ces isolats provenaient de 16 localités réparties dans

Espèce	N	lseff	nseff	S	π_s	D	π_N/π_s
<i>P. bromi</i>	3373	1113 (1083.2)	4 (0.3)	1 (22)	0.0026 (0.0145)	-0.61 (1.19)	0.3177 (0.3051)
<i>P. chaetomioides</i>	4897	813 (981.1)	4 (0.7)	1 (19.7)	0.0028 (0.0179)	-0.78 (1.01)	0.3132 (0.3472)
<i>P. dictyoides 1</i>	4120	1149 (1049)	5 (0.6)	4 (26.8)	0.0044 (0.015)	1 (1.05)	0.3001 (0.384)
<i>P. grahamii</i>	4945	1065 (1046.9)	5 (0.9)	0 (21.9)	0.0029 (0.0151)	1.46 (1.03)	0.3124 (0.2718)
<i>P. graminea</i>	5712	861 (928.9)	4 (0.8)	3 (21.8)	0.0079 (0.0105)	-0.82 (0.89)	0.2189 (0.3146)
<i>P. lolii</i>	5274	711 (971.2)	6 (2.9)	1 (20)	0.0037 (0.0131)	1.3 (1.16)	0.3109 (0.3487)
<i>P. nobleae</i>	7786	627 (958.8)	5 (2.5)	0 (15.5)	0.0025 (0.0121)	0.36 (1.34)	0.3115 (0.3108)
<i>P. poae</i>	2799	612 (939.9)	4 (1.7)	1 (19.4)	0.008 (0.0137)	-0.2 (1.28)	0.2203 (0.3291)
<i>Ptm</i>	5998	567 (857.6)	7 (3.6)	2 (21.6)	0.0062 (0.0144)	0.43 (1.33)	0.2245 (0.3835)
<i>Ptt</i>	4513	519 (818.4)	9 (3.7)	0 (17.4)	0.0022 (0.0145)	0.32 (1.35)	0.318 (0.4107)
<i>Ptr</i>	6403	507 (785.7)	15 (9.3)	1 (23.5)	0.0024 (0.0114)	-0.14 (1.47)	0.3091 (0.8659)

Pour toutes les statistiques, à l'exception de N, les médianes sont présentées, avec l'écart type entre parenthèses. *Ptm* = *Pyrenophora teres* f. *maculata* ; *Ptt* = *P. teres* f. *teres* ; *Ptr* = *P. tritici-repentis* ; N = nombre d'orthologues à copie unique inclus dans les calculs ; lseff = nombre effectif de sites inclus dans les calculs ; nseff = nombre moyen de chromosomes inclus dans les calculs par site ; S = nombre de sites en ségrégation ; π_s = diversité nucléotidique aux sites synonymes ; D = statistique de neutralité de Tajima ; π_N et π_s = diversité nucléotidique aux sites non synonymes et synonymes, respectivement.

Tableau 4 : Statistiques descriptives de la variation nucléotidique chez onze espèces de *Pyrenophora*.



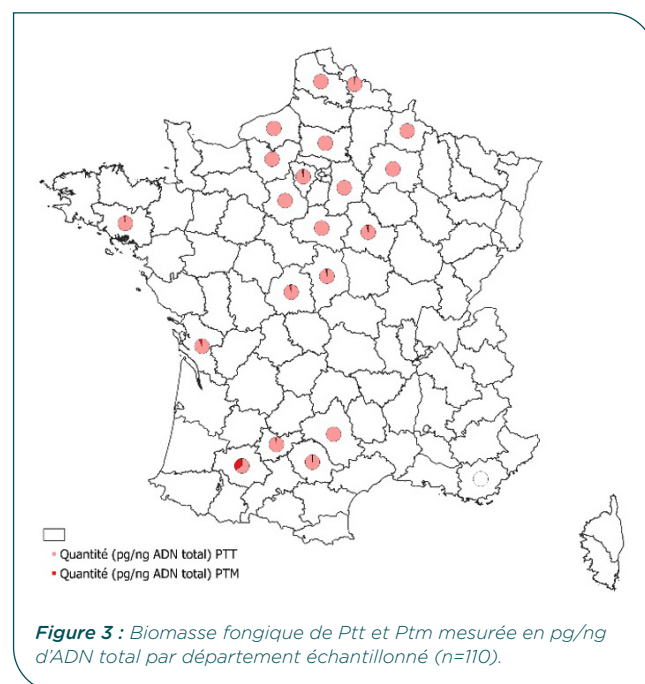
12 départements français, avec un nombre d'isolats par localité variant de 3 à 48 selon la disponibilité de tissus symptomatiques. Plus de 15 variétés d'orge ont été échantillonnées, dont l'orge de printemps à deux rangs ($n=26$) et l'orge d'hiver ($n=181$). Les besoins en vernalisation étaient connus pour l'ensemble des 207 isolats, tandis que le nom de la variété et le nombre de rangs étaient connus pour 204 d'entre eux (données non montrées).

Les séquences GBS couvraient respectivement 30 % et 32 % des génomes de référence de *Ptt* et *Ptm*. L'analyse des SNP a identifié $1,1 \times 10^5$ SNP pour le jeu de données *Ptt* et $8,4 \times 10^4$ SNP pour le jeu de données *Ptm*. Les réseaux phylogénétiques ont montré que la plupart des isolats ($n = 204$) étaient étroitement apparentés au génome de référence *Ptt* (distance p moyenne de 0,08 différence/site polymorphe ; Figure 2), tandis que seuls trois isolats étaient étroitement apparentés au génome de référence *Ptm* (distance p moyenne de 0,2 différence/site polymorphe ; Figure 2). La divergence nette (Da) entre *Ptt* et *Ptm* était de 0,006/pb (écart-type : 0,016), ce qui suggère une divergence il y a environ 0,128 million d'années. Aucune réticulation n'a été observée entre les branches *Ptt* et *Ptm*, ce qui indique l'absence d'hybrides dans le jeu de données.

Ptt a été isolé dans toutes les zones échantillonnées, tandis que *Ptm* n'a été isolé que dans le sud-ouest de la France, coexistant avec *Ptt* dans le même champ.

Caractérisation de la distribution des espèces de *P. teres* à l'échelle de la France par méthode moléculaire

L'analyse des 110 échantillons par qPCR ont confirmé les résultats obtenus par la méthode d'isolement.



Ptt est la forme prédominante en France sur tout le territoire. *Ptt* a été détecté (valeur qPCR supérieure à la limite de détection de la méthode) dans 90% des échantillons contre 20% pour *Ptm*. *Ptt* représente 98.65% de la biomasse fongique totale et est largement majoritaire dans l'ensemble des départements échantillonnés (Figure 3). *Ptm* a été détecté dans 10 des 24 départements échantillonnés avec une cooccurrence des deux formes dans 20 échantillons. En proportion par rapport à *Ptt*, *Ptm* a été quantifié un peu plus abondamment dans le Sud-Ouest ce qui explique les résultats issus des isollements (Figure 3). Les concentrations de *Ptt*, exprimées varient significativement selon l'année (modèle mixte linéaire : $F_{3,78} = 9,81$; $p < 0,001$). L'année 2022 présente des niveaux significativement plus faibles que 2020, 2021 et 2023 (comparaisons post-hoc ajustées, $p < 0,01$), tandis que 2020 et 2021 ne différaient pas significativement. Une augmentation des concentrations est observée en 2023 par rapport à 2020 ($p = 0,041$). Pour chaque année, malgré des pressions différentes, la proportion de *Ptm* par rapport à *Ptt* est assez stable (de 0.2% pour 2020 et 2021 à 2.3% pour 2023).

Pyrenophora teres f. teres est subdivisé en deux groupes principaux en France

Les analyses de structure de population ont porté sur les 204 isolats de *Ptt*, en utilisant comme génome de référence celui de l'isolat français FRA0042 (assemblage : $6,8 \times 10^4$ contigs > 1 Mb, N50 = 328 kb, L50 = 30, score BUSCO = 94,4 %). En moyenne, 43 %

du génome de référence de 32 Mb a été couvert, et l'ensemble de données filtré contenait $6,3 \times 10^4$ SNP.

Les analyses de subdivision par sNMF et DAPC ont mis en évidence deux groupes nettement différenciés au sein de *Ptt*. Avec sNMF, seul K=2 a produit deux groupes clairement séparés, tandis que la DAPC suggérait K=3 selon le Bayesian Information Criterion, mais seul K=2 a montré une subdivision nette (Figure 4). L'AMOVA a indiqué que 45 % de la variation était distribuée entre les clusters, avec une divergence nette $D_a = 0,0014/\text{pb}$. L'admixture était limitée, avec 0,5 % des isolats présentant une ascendance mélangée.

Les deux clusters ont montré une diversité génétique similaire (cluster 1 : $\pi = 0,00434/\text{pb}$; cluster 2 : $\pi = 0,00433/\text{pb}$) mais des valeurs du D de Tajima contrastées (cluster 1 : $D = 1,47$; cluster 2 : $D = -0,72$). La décroissance du déséquilibre de liaison suggère l'existence de recombinaison au sein des populations, et les analyses ont montré que plus de 90 % de la variation génétique se distribuait au sein des localités ou des variétés, contre moins de 10% seulement entre les localités ou variétés.

L'analyse en composantes principales (ACP) a révélé que l'appartenance aux clusters était fortement associée au type d'orge : le cluster 1 provenait principalement d'orge de printemps à deux rangs, et le cluster 2 d'orge d'hiver à six rangs (Figure 4). Seule la Côte d'Or (Bourgogne) présentait les deux clusters au même site, sans différence significative dans les proportions d'ascendance par rapport aux autres régions (test de Wilcoxon, $p = 0,562$ et $0,067$).

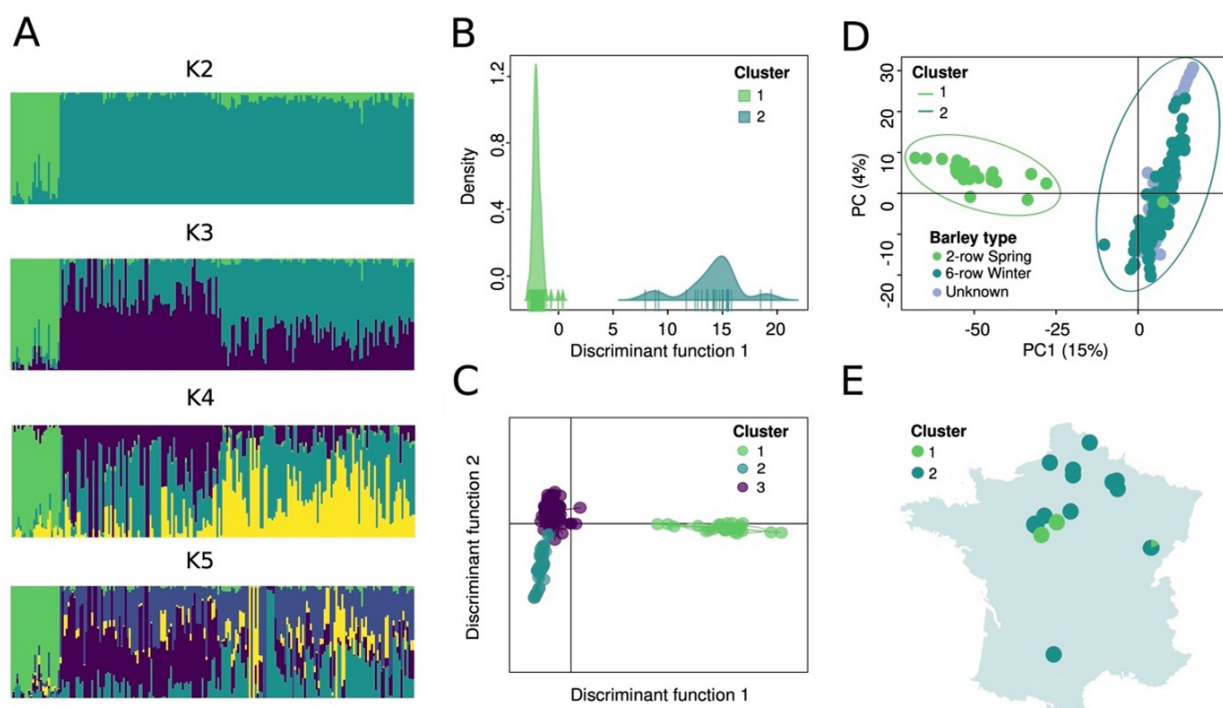


Figure 4 : Subdivision de la population de *Pyrenophora teres f. teres* en France, estimée à partir de données de génotypage par séquençage de 204 isolats issus de 16 sites d'échantillonnage. A. Proportions d'ascendance dans K groupes, estimées par sNMF, chaque isolat étant représenté par un segment subdivisé en K intervalles. B. Analyse discriminante en composantes principales (ADCP) à deux groupes, basée sur 20 composantes principales. C. DAPC à trois groupes, basée sur 25 composantes principales. D. Analyse en composantes principales des données de génotypage, chaque isolat étant représenté par un point coloré selon son type d'orge d'origine, et les ellipses indiquant les groupes d'isolats identifiés par DAPC et sNMF. E. Distribution géographique des deux principaux groupes de *Pyrenophora teres f. teres* en France, avec des diagrammes circulaires représentant la proportion d'isolats de chaque groupe par site d'échantillonnage.

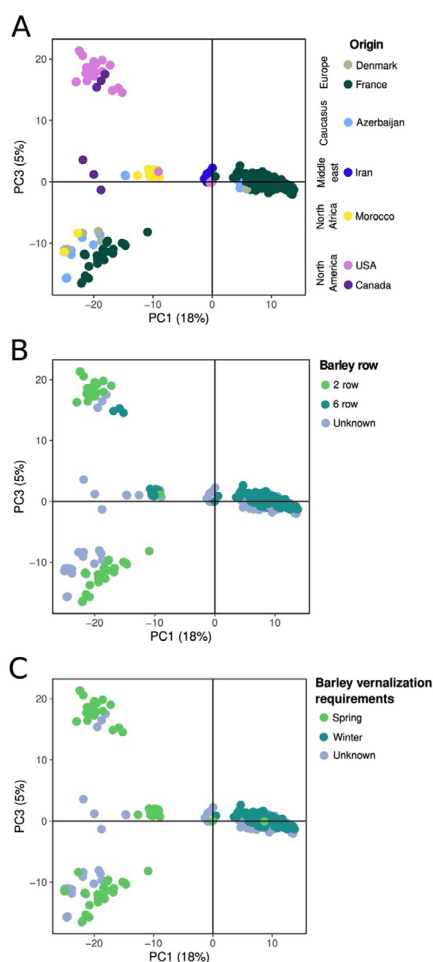


Figure 5 : Association entre la structure de la population des isolats de *Pyrenophora teres f. teres* collectés dans le monde entier et les besoins en vernalisation de l'orge, visualisée à l'aide d'une analyse en composantes principales basée sur les SNP. Chaque point représente un isolat. A. Isolats colorés par pays d'origine. B. Isolats colorés en fonction du nombre de rangs de la variété d'orge à partir de laquelle ils ont été obtenus. C. Isolats colorés en fonction des besoins de vernalisation de la variété d'orge à partir de laquelle ils ont été obtenus.

Structure globale de *Ptt* et association avec les exigences de vernalisation

La combinaison d'isolats français de *Ptt* avec des données génomiques mondiales et de nouveaux échantillons nord-américains de *Ptt* a permis d'obtenir 133 609 SNP sans données manquantes. L'ACP a révélé que les composantes principales 1, 2 et 3 expliquaient respectivement 18 %, 8 % et 5 % de la variation totale. Les composantes principales 1 et 3 ont permis de mettre en évidence la différenciation géographique, tandis que la composante principale 1 a également permis de séparer les isolats en fonction des exigences de vernalisation de l'orge (hiver vs printemps ; Figure 5).

Le regroupement par sNMF a confirmé ces résultats : K = 2 a séparé les isolats en groupes d'orge de printemps et d'orge d'hiver, et l'augmentation de K a subdivisé le groupe d'orge de printemps en sous-groupes nord-africain, européen/moyen-oriental et nord-américain (Figure 5). Ces résultats suggèrent que l'adaptation au type d'orge, notamment les exigences de vernalisation, est fortement corrélée à la structure de la population, en plus de la géographie.

Caractérisation de la diversité pathotypique

Parmi les 207 isolats, seulement 9 % ont produit des conidies et seulement cinq ont montré une production abondante, facilement observable au microscope. La méthode adaptée de Jacques *et al.* (2021) a permis d'améliorer la production d'inoculum en soumettant les champignons à un stress (blessure, exposition à la lumière N-UV, aération), puis à des conditions sombres et fraîches. Des isolats initialement non conidiogènes ont produit des conidies, et la sporulation des isolats déjà producteurs a été augmentée. Un inoculum approprié a été obtenu à partir de sept isolats : un *Ptm* (FRA0005) et six *Ptt* (FRA0018, FRA0024, FRA0042, FRA0055, FRA0061 et FRA0064).

Au fil des cultures, certaines souches initialement prolifiques (ex. FRA0055) ont montré un déclin de la production de conidies, déclin pouvant être restauré grâce à des conditions expérimentales adaptées. Ces résultats suggèrent que le manque de conidies est lié à la régulation de l'expression génique plutôt qu'à des mutations génomiques.

Inoculation de plantes entières

Nous avons testé l'inoculation complète de plantes à l'aide de 32 isolats, en utilisant du mycélium et des conidies. La pulvérisation du mycélium a produit des symptômes faibles, et l'augmentation de la quantité de mycélium a posé problème pour obtenir une suspension homogène. L'utilisation de Tween 20 a amélioré la suspension par rapport à la gélatine, mais aucune corrélation n'a été observée entre les zones de lésions obtenues par mycélium et celles obtenues par conidies. Cette méthode s'est révélée peu fiable pour évaluer la résistance variétale.

Inoculation de feuilles détachées

Nous avons testé sept isolats producteurs de conidies sur des feuilles détachées. Les contrôles négatifs présentaient généralement zéro zone symptomatique, bien que certaines chloroses aient été observées sur quelques variétés. La cohérence entre les réplicats biologiques a été confirmée (Spearman, $\rho > 0,8$), ce qui a permis l'analyse de l'ensemble des données.

Un modèle linéaire exploratoire sur les zones de lésions (transformées par logit) a révélé :

- Interaction isolat*variété très significative ($p < 2 \times 10^{-16}$, $R^2 = 0,903$)
- Effet de la variété très significatif ($p < 2 \times 10^{-16}$)
- Effet de l'isolat moins marqué mais détectable pour certaines analyses

Les variétés françaises Trapeze et Sy Scoop ont présenté la résistance la plus élevée, tandis que Prior, Skiff et Harrington ont été les plus sensibles. Certaines variétés ont montré une spécialisation vis-à-vis de certains isolats, révélant un phénomène d'adaptation locale. Par exemple, Trapeze est résistant à FRA0061 mais sensible à FRA0064, tandis que Ketos présente le schéma inverse. L'isolat *Ptm* a montré une virulence comparable à celle des isolats *Ptt*. La variété Etincel a montré une résistance remarquable à *Ptm*, cohérente avec son adoption récente en France pour sa résistance à l'helminthosporiose.

Une analyse de l'effet du type d'orge (printemps vs hiver) et de l'origine de l'isolat (printemps ou hiver) a montré que seule la variété testée influençait significativement la surface des lésions ($p < 2 \times 10^{-16}$), avec une plus grande sensibilité des orges de printemps ($p = 0,87$ pour l'interaction non significative).

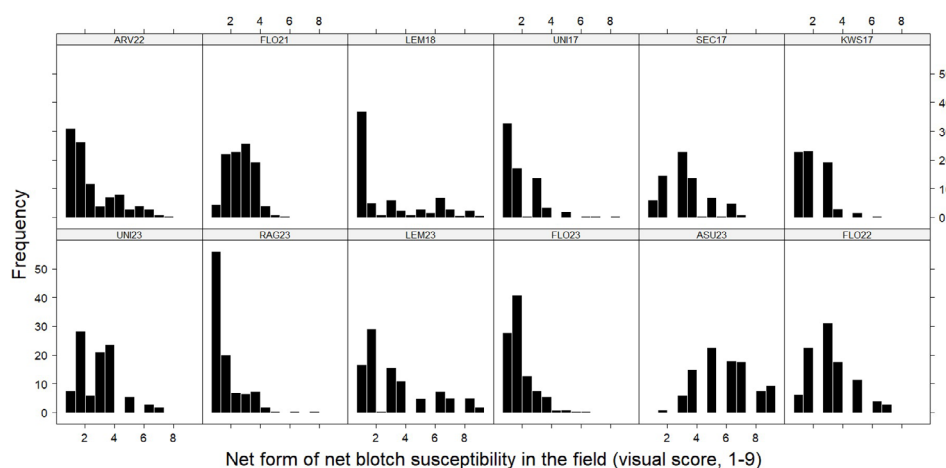


Figure 6 : Distribution des notes visuelles de sensibilité à l'helminthosporiose (variant de 1 à 9) dans les différents essais. Le nom des essais est indiqué tel que dans le Tableau 1.

► Déterminisme génétique et modélisation basée sur des marqueurs génétiques de la résistance à l'helminthosporiose chez l'orge d'hiver

Essais agronomiques

Au total, des notations de sensibilité à l'helminthosporiose ont été réalisées dans 20 essais en conditions agronomiques pour ce panel. L'analyse des données phénotypiques a conduit à écarter 8 essais avec une pression maladie faible. Sur les douze essais restants, la date de notation la plus discriminante a été retenue et des valeurs moyennes pour chaque variété ont été calculées. Les notes moyennes de sensibilité à l'helminthosporiose variaient de 1.7 à 5.9 selon les essais et les distributions des notes dans les différents essais indiquent une majorité de variétés résistantes dans le panel (Figure 6). Une analyse de variance a permis d'estimer le pourcentage de variance expliqué par le facteur variété à 14% et celui expliqué par le facteur essai à 36%. Ceci indique une part probablement importante d'interaction génotype × environnement. L'héritabilité à l'échelle du réseau d'essais a été estimée à 0.69. Les corrélations entre sensibilité à l'helminthosporiose, date d'épiaison et hauteur montrent :

- Des corrélations significatives avec la date d'épiaison dans 5 essais sur 12 avec des valeurs comprises entre -0.27 et 0.17
- Des corrélations significatives avec la hauteur dans 5 essais sur 12 avec des valeurs comprises entre -0.52 et 0.25

Les notes de sensibilité à l'helminthosporiose ont été corrigées des effets de la date d'épiaison et de la hauteur par le calcul du DRIHH. Les corrélations du DRIHH entre essais montrent des valeurs faibles avec une moyenne égale à 0.17 (minimum -0.12, maximum 0.52) confirmant les fortes interactions génotype × environnement.

Essais en conditions contrôlées

Des notations de sensibilité à l'helminthosporiose ont été réalisées pour 4 souches en conditions contrôlées (Tableau 3). Pour chaque souche, les variétés constituant le panel ont été réparties dans différents essais avec des variétés témoins présentes dans tous les essais. Pour les deux souches testées par Arvalis, les corrélations entre essais montraient une bonne répétabilité entre essais. La sensibilité moyenne variait de 11.2 à 38% selon les souches (Figure 7). L'héritabilité estimée pour chaque souche variait de 0.29 à 0.79 avec des valeurs supérieures à 0.70 pour trois souches. Le pourcentage de variance expliqué par le facteur variété a été estimé à 30% et celui expliqué par le facteur souche à 23%. Là encore, une part importante d'interaction génotype × environnement est probable et l'héritabilité à l'échelle de l'ensemble des essais en conditions contrôlées a été estimée à 0.41. La distribution des notes de sensibilité dans ces essais ont permis de montrer des valeurs plus faibles pour les souches testées par Arvalis comparées à celles testées par INRAE, possiblement lié aux différences de protocoles

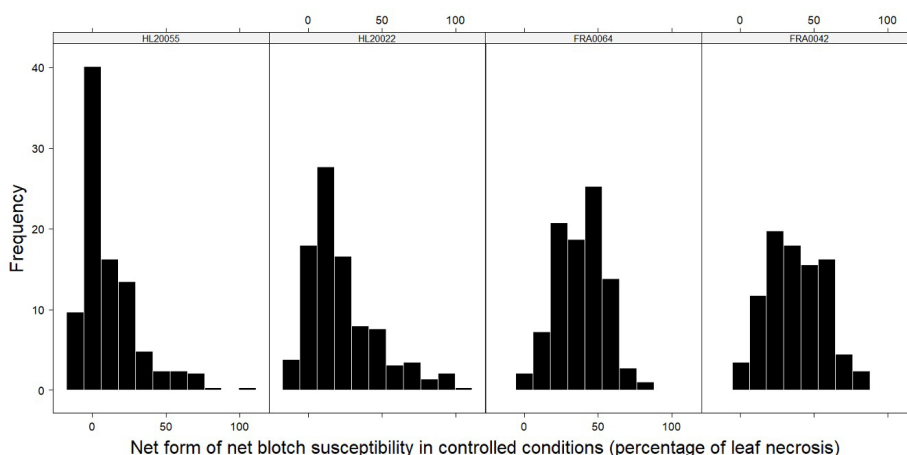


Figure 7 : Distribution des pourcentages de nécroses (moyennes ajustées des effets essais) observées sur plantules en conditions contrôlées pour quatre souches de Ptt (HL20055, HL20022, FRA0064, FRA0042).

entre les deux instituts. Par ailleurs, la sensibilité des orges de printemps inoculés avec les souches issues d'échantillons d'orge d'hiver paraissait plus faible que celle des orges d'hiver et inversement. Ceci peut être expliqué par la structuration des populations de *Ptt* mise en évidence dans le projet (cf. 3.1.2). Les corrélations entre notes de sensibilité pour les différentes souches étaient faibles (maximum 0.22) confirmant l'importance des interactions génotype × environnement.

Génétique d'association et prédiction génomique

Les 280 variétés hiver du panel ont été génotypées avec la puce à SNP « Illumina 50K iSelect » qui a permis d'obtenir des données pour 43 231 marqueurs avec un pourcentage de données manquante moyen de 0,3%. Après filtrage des marqueurs monomorphes et des marqueurs avec une fréquence de l'allèle minoritaire inférieure à 5%, 31 955 marqueurs ont été sélectionnés pour les travaux ultérieurs. Ainsi, 4000 à 7000 marqueurs étaient présents sur chaque chromosome et la densité de marquage était variable selon la position chromosomique avec une densité plus importante dans les parties télomériques où le taux de recombinaison est plus élevé. L'analyse de la structuration du panel de variétés hiver à partir des données de génotypage a permis d'identifier deux-sous populations correspondant aux orges 2 rangs et 6 rangs (données non montrées).

Un premier scan du génome pour le DRIHH dans chaque essai et pour le pourcentage de nécrose pour chaque souche a permis d'identifier 110 marqueurs significativement associés à la sensibilité à l'helminthosporiose sur les chromosomes 2H, 4H et 6H. Sur les 110 marqueurs associés, 93 étaient localisés sur le chromosome 6H, en particulier dans une zone péricentromérique à fort DL. Le marqueur le plus significatif sur ce chromosome (JHI-Hv50k-2016-398720)

a été utilisé comme covariable afin d'effectuer un second scan du génome et d'améliorer la résolution des QTL présents sur ce chromosome. Ainsi, 67 marqueurs localisés sur les chromosomes 2H, 4H, 5H et 6H ont pu être identifiés pour le DRIHH dans chaque essai et pour le pourcentage de nécrose pour chaque souche. 18 marqueurs supplémentaires ont pu être identifiés sur les chromosomes 1H, 2H, 3H et 6H par méta-analyse. L'ensemble des marqueurs associés ont été regroupés en 9 QTLs (Tableau 5). En particulier, les QTLs suivants ont été identifiés pour plusieurs essais et/ou souches :

- QPt-2H-28 pour deux souches en conditions contrôlées
- QPt-6H-54 pour deux souches en conditions contrôlées et un essai en conditions agronomiques
- QPt-6H-358 pour une souche en conditions contrôlées et trois essais en conditions agronomiques

A cela s'ajoutent deux QTLs additionnels identifiés par méta-analyse sur les essais en conditions contrôlées (QPt-1H-7, QPt-3H-9). Certains QTL n'étaient représentés que par un marqueur (QPt-1H-7, QPt-2H-1, QPt-3H-9, QPt-4H-595). L'intervalle de QPt-5H-498 a été estimé à 7kbp tandis que l'intervalle de QPt-6H-54 a été estimé à 97Mbp du fait du DL. L'analyse de la fréquence des allèles de résistance aux différents QTLs montre que l'allèle favorable était peu représenté pour 4 QTLs (QPt-2H-1, QPt-3H-9, QPt-5H-498, QPt-6H-54) ainsi que des différences marquées entre orges 2 et 6 rangs pour QPt-6H-358 et QPt-5H-498 (Figure 8). L'absence de corrélation entre le nombre de QTLs de résistance dans chaque accession et le DRIHH moyen indique une absence d'effets additifs des QTLs ce qui questionne une stratégie de pyramidage de l'ensemble des QTLs. L'examen de la sensibilité moyenne pour différentes combinaisons alléliques aux QTLs (représentées par au moins cinq individus) a permis d'identifier les combinaisons les plus intéressantes pour

QTL ID	Chr	Intervalle physique	Essai/isolat	Marqueur le plus significatif	Position du marqueur le plus significatif	Max -log10(p)	Allèle favorable	Méthode
QPt-1H-7	1H	7254189 - 7254189		JHI-Hv50k-2016-8306	7254189	4.37	AA	metaGE
QPt-2H-1	2H	880829 - 880829	FLO22	SCRI_RS_142851	880829	5.09	CC	SEA
QPt-2H-28	2H	23995925 - 28973874	FRA0042; HL20022	JHI-Hv50k-2016-74955	27655068	7.05	GG	metaGE; SEA
QPt-3H-9	3H	8948624 - 8948624		JHI-Hv50k-2016-153661	8948624	4.26	AA	metaGE
QPt-4H-595	4H	595307323 - 595307323	HL20055	JHI-Hv50k-2016-263864	595307323	5.05	CC	SEA
QPt-5H-498	5H	498131186 - 498138356	RAG23	JHI-Hv50k-2016-317808	498131186	5.21	CC	SEA
QPt-6H-54	6H	45758911 - 142433702	FRA0042; HL20022; RAG23	JHI-Hv50k-2016-386866	54240966	7.71	CC	metaGE; SEA
QPt-6H-358	6H	358331457 - 360107398	HL20022; LEM18; RAG23; SEC17	JHI-Hv50k-2016-398720	358331457	8.72	CC	metaGE; SEA
QPt-6H-570	6H	569815238 - 570637279	FRA0064	JHI-Hv50k-2016-432291	569815238	5.83	GG	metaGE; SEA

Tableau 5 : QTL de sensibilité à l'helminthosporiose identifiés dans un panel de 280 orges d'hiver françaises testées dans 12 essais en conditions agronomiques et pour 4 souches en conditions contrôlées. Le nom des QTLs, le chromosome, l'intervalle du QTL établit selon le déséquilibre de liaison local, le nom des essais et/ou souches pour lesquels le QTL a été identifié, le marqueur le plus significatif, sa position, la -log10(p) maximale, l'allèle favorable et la méthode de détection sont indiqués.

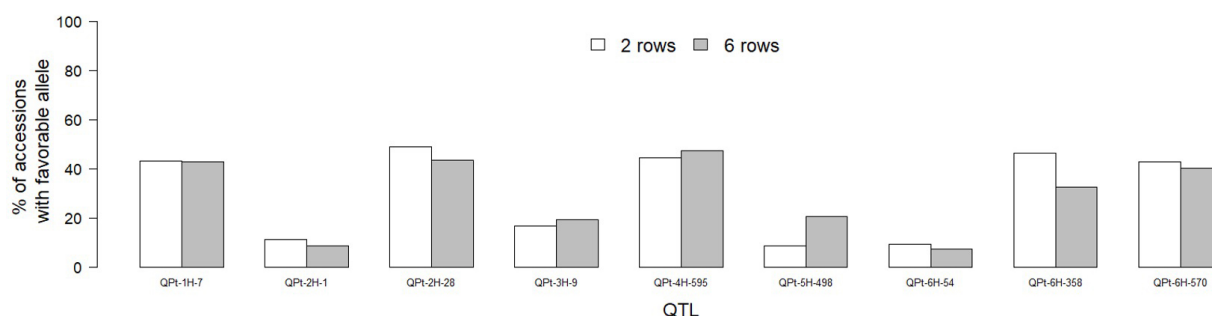


Figure 8 : Pourcentage des accessions du panel de type 2 ou 6 rangs porteuses de l'allèle favorable pour les différents QTL identifiés.

réduire le niveau de sensibilité. Ces résultats indiquent que QPt-5H-498 et QPt-6H-54 sont peu fréquents dans les combinaisons les plus intéressantes.

Une analyse du contenu en gènes des QTLs a permis d'identifier 69 gènes potentiellement impliqués dans l'interaction plante × pathogène pour quatre QTLs (QPt-2H-28, QPt-6H-49, QPt-6H-54 et QPt-6H-570). L'utilisation de la base de données d'expression « BarleyExpDB » a permis d'identifier 5 gènes montrant une réponse à l'inoculation avec *Cochliobolus sativus* (un champignon différent de *Pyrenophora teres* mais causant lui aussi des symptômes d'helminthosporiose).

Un modèle de prédiction génomique a été calibré pour la sensibilité moyenne à l'helminthosporiose calculée sur l'ensemble des essais en conditions agronomiques. Un schéma de validation croisée de type k-folds a été appliqué de manière à estimer les capacités du modèle à prédire la sensibilité à l'helminthosporiose à partir des données de génotypage des variétés. Les capacités prédictives du modèle semblent satisfaisantes avec une corrélation moyenne entre valeurs prédites et observées de 0.57 et une RMSE de 0.58 point pour la sensibilité moyenne à l'helminthosporiose (données non montrées).

► Prédiction du risque Helminthosporiose

Prévision de l'incidence d'helminthosporiose précoce

Caractérisation de la pression observée dans la base de données Vigicultures/Végéobs

La distribution de l'incidence moyenne de l'helminthosporiose sur les trois derniers étages foliaires,

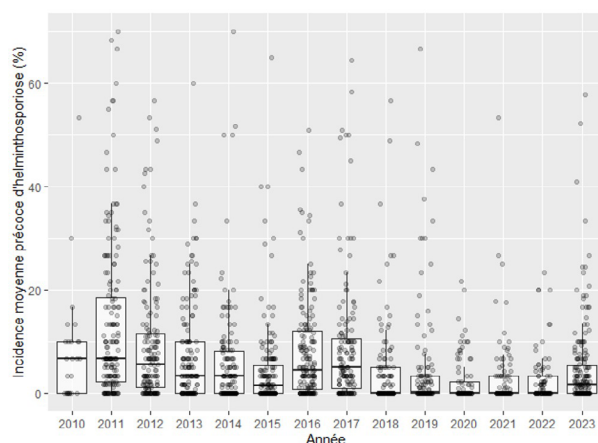


Figure 9 : Distribution de l'incidence précoce de l'helminthosporiose par année entre 2010 et 2023 observée dans la BDD1.

telle qu'observée dans la base de données BDD1 entre les stades 1N et DFP a été calculée (Figure 9). Les incidences moyennes observées restent globalement faibles et traduisent une occurrence précoce limitée de la maladie malgré quelques valeurs extrêmes. Certaines années (2011, 2012, 2016, 2017) présentent toutefois des niveaux légèrement plus élevés, mais l'ensemble met surtout en évidence une forte variabilité interannuelle.

Effets des facteurs agronomiques

L'ANOVA a révélé un effet significatif de la note de résistance variétale sur la fréquence moyenne d'helminthosporiose. Toutefois, cet effet reste limité puisqu'une augmentation d'un point de la note de résistance diminue en moyenne la fréquence d'attaques précoces de 1.3%. Aucun autre facteur agronomique étudié n'a montré d'influence significative. Concernant la date de semis, la tendance observée à un risque accru avec des semis précoces est cependant cohérente avec la littérature et l'absence de significativité pourrait résulter d'interactions non modélisées avec le climat automnal.

Facteurs agro-climatiques identifiés et performance prédictive des modèles

Les modèles retenus en fonction des approches de modélisation et les plages de calcul des variables climatiques considérées, retiennent entre 4 et 9 variables explicatives. Ils présentent des RMSEP similaires (11-12.5 %) mais des efficacités négatives, indiquant une incapacité à prédire le risque mieux qu'une simple moyenne. De même, les modèles de Cox montrent des performances faibles : le meilleur atteint un C index de 0.62, à peine supérieur au hasard, révélant une discrimination limitée et une faible valeur prédictive. De plus, l'analyse des variables retenues dans les modèles ne révèle pas de véritable cohérence d'un modèle à l'autre. Seule la sensibilité variétale est systématiquement sélectionnée, avec un effet négatif sur le risque d'incidence précoce, conformément aux connaissances agronomiques. Par ailleurs, des conditions estivales pluvieuses en interculture et des températures hivernales négatives apparaissent également de façon fréquente, toutes deux étant associées à une augmentation du risque. Il est également surprenant que les modèles ne fassent pas ressortir de variables climatiques printanières, pourtant déterminantes pour les infections secondaires.

Prévision de la sévérité d'helminthosporiose en fin de cycle

Caractérisation de la pression observée dans la base de données des essais

A l'instar de la BDD1, les données mettent en évidence une forte variabilité interannuelle et intra-annuelle de la pression d'helminthosporiose observée en fin de cycle

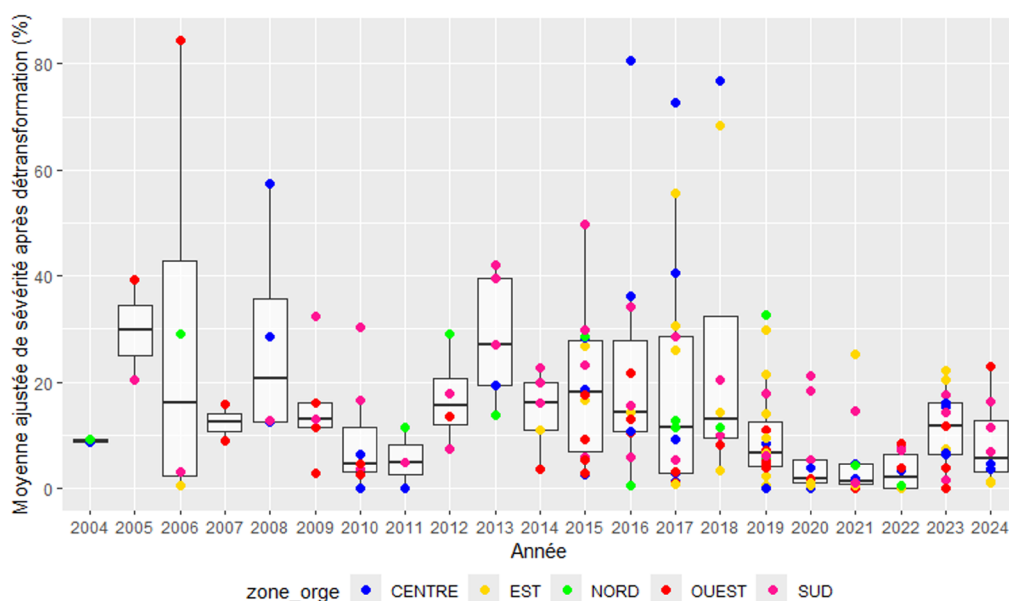


Figure 10 : Distribution des moyennes ajustées de la sévérité en fin cycle l'helminthosporiose observée dans les essais de la BDD2 par année entre 2004 et 2024. Les couleurs représentent les secteurs géographiques des différents essais.

dans les différents essais de la base de données BDD2 (162 sitesxannées) (Figure 10).

Effet de la sensibilité variétale :

L'analyse de variance révèle un effet significatif de la résistance variétale sur la sévérité finale d'helminthosporiose. Les moyennes ajustées après détransformation montrent une réduction progressive de la sévérité, de 17.6 % pour les variétés notées 4 à 5.5 % pour celles notées 8.

Facteurs agro-climatiques identifiés et performance prédictive des modèles :

Les différents modèles retiennent entre 4 et 10 variables explicatives et présentent des performances proches, avec des RMSEP élevés (14.6 % à 16.3 %) et des efficacités globales faibles (−0.02 à 0.17). Ces résultats traduisent une précision prédictive insuffisante au regard de la variabilité de la variable à prédire. Néanmoins, certaines variables sont fréquemment sélectionnées tant pour la campagne étudiée que parfois pour la campagne précédente, indépendamment de la méthode de calcul des variables climatiques, de la stratégie de modélisation mise en œuvre, ou de la variable étudiée, ce qui suggère une association potentielle de ces variables avec le risque étudié. On retrouve ainsi un effet récurrent des températures élevées en avril mai, ainsi que du nombre de jours de pluie, tous deux associés à une augmentation du risque, tandis que le cumul de rayonnement sur cette période est lié à une réduction du risque. Ces résultats sont cohérents avec les conditions favorables connues — printemps doux (15–25 °C ; Mathre, 1982) et humides (McLean *et al.*, 2009) —, et suggèrent que le rayonnement pourrait refléter des situations plus ensoleillées et moins humides, réduisant la durée d'humectation foliaire et donc le potentiel d'infection.

Parmi les modèles étudiés, le plus performant est une régression linéaire qui repose sur sept variables climatiques issues de l'approche « window pane » (données non montrées). Dans ce modèle, et comme pour l'analyse de l'infection précoce, les pluies en interculture en août et les températures hivernales

négatives, sont également associés à une augmentation du risque. Ceci suggère, d'une part, que des conditions estivales humides pourraient favoriser les repousses d'orge et le maintien de l'inoculum (Backes *et al.*, 2021), et, d'autre part, que des épisodes de froid hivernal pourraient ralentir la décomposition des résidus infectés, contribuant ainsi à la persistance de l'inoculum. Néanmoins, La comparaison entre valeurs observées et prédites par ce modèle en validation croisée par année montre une performance de prédiction faible.

DISCUSSION

► Structure génétique et occurrence des espèces

Notre étude a apporté un nouvel éclairage sur l'histoire de la diversification des espèces graminicoles de *Pyrenophora*. La phylogénie du genre et le statut taxonomique des différentes espèces ont été clarifiés. De ce fait, notre étude constitue la première tentative d'évaluation de l'évolution du genre *Pyrenophora* à l'aide de méthodes génomiques. Nos recherches permettent de fournir plusieurs précisions importantes. Les études antérieures utilisant des marqueurs moléculaires tels que l'ITS, la LSU et la GPDH (Aryawansa *et al.* 2014, Marin-Felix *et al.* 2019) présentaient un certain nombre de divergences entre elles, ainsi que des différences par rapport à nos résultats. Par exemple, les trois isolats que nous avons réattribués à *P. trichostoma* par Marin-Felix *et al.* (2019) prouvent qu'il s'agit en réalité de la même espèce (Index Fugorum, 2024). Nous avons également clarifié la relation entre les espèces *P. tr.* et *P. bromi*, confirmant qu'elles sont des espèces sœurs Aryawansa *et al.* (2014) et invalidant des résultats récents (Marin-Felix *et al.* 2019, Rodrigues *et al.* 2023). Nous avons également démontré que *P. graminea* et *P. tr.* représentent des lignées distinctes, et donc probablement des espèces différentes, contrairement aux affirmations précédentes (Aryawansa *et al.* 2014). Pour le reste des données, la topologie inférée est globalement cohérente avec les résultats antérieurs, même s'il convient de noter que notre résolution phylogénétique est supérieure, ce qui

permet, par exemple, de montrer que certaines espèces morphologiques, telles que *P. dictyoides*, sont en réalité des complexes d'espèces phylogénétiques.

En termes de structure génétique des espèces, nos résultats indiquent que les différentes espèces de *Pyrenophora* graminicoles présentent des niveaux de structure génétique variés, mais des niveaux de variation moléculaire très similaires, indépendamment de leur histoire d'invasion. Cependant, la taille limitée de notre échantillonnage ne nous permet pas de déterminer si la variation observée au sein de la subdivision de la population reflète des différences d'effort d'échantillonnage ou si elle est véritablement représentative de la structure génétique des espèces de *Pyrenophora*.

Un effort très significatif a été réalisé pour échantillonner des feuilles symptomatiques à l'échelle nationale et isoler les agents pathogènes causaux. Aucune souche de *C. sativus* ou *P. graminea* n'a été isolée à partir des échantillons français. Ce résultat suggère que ces deux espèces sont peu présentes en France sur les orges. L'absence ou la faible fréquence de *P. graminea* était un résultat attendu car les symptômes sont caractéristiques (non observés dans l'échantillonnage), que son observation est rare et que sa dissémination par la semence est fortement limitée par les traitements de semence. Pour *C. sativus*, à notre connaissance, aucune étude récente n'a essayé d'estimer sa présence sur le territoire. Or, les symptômes causés sur l'orge par ce champignon sont proches de ceux de la forme *Ptm* et pourrait entraîner une sous-estimation de son importance. Notre étude suggère que cet agent pathogène est réellement peu fréquent en France sur feuilles d'orge. Ce résultat est assez cohérent avec les conditions de développement de ce champignon qui cause le « spot blotch » principalement dans des zones de production chaudes et humides (Basak *et al.* 2025). Néanmoins, ce champignon est aussi connu pour attaquer d'autres céréales (blé, seigle, triticales) notamment au niveau du grain (causant la moucheture par exemple) et des racines. De plus, en prenant en compte les conséquences du changement climatique, une surveillance plus fréquente pourrait être menée en utilisant des méthodes plus rapides telles que des méthodes moléculaires pour anticiper un risque d'émergence sur orge mais aussi les autres céréales hôtes.

Un résultat majeur du projet est la confirmation que *Ptt* est largement dominant sur *Ptm* en France, avec seulement 1,4 % des isolats correspondant à *Ptm* dans la collection d'isolats. Ce résultat est confirmé par les analyses moléculaires effectuées sur la totalité des échantillons pour lesquels la fréquence de détection (85% versus 20%) et la biomasse fongique de *Ptt* (98.6% de la somme de la biomasse totale des deux formes) sont très largement supérieures à celles de *Ptm*. Ceci contraste avec les données historiques suggérant que *Ptm* était auparavant la forme prédominante (Arabi *et al.* 1992) ce qui indique un changement rapide de la composition de la population au cours des trois dernières décennies. Des changements similaires ont été rapportés dans d'autres régions et sont probablement influencés par la résistance de l'hôte et des facteurs environnementaux (McLean *et al.* 2010, Marshall *et al.* 2015). La présence à bruit de fond de *Ptm* milite pour

continuer à évaluer la sensibilité variétale à cette forme pour anticiper une éventuelle recrudescence.

La faible fréquence de *Ptm* a empêché une analyse détaillée de la structure des populations, mais la forte différenciation au sein des populations de *Ptt* en France, associée au type d'orge, souligne une possible adaptation à l'hôte. Un effort d'isolement complémentaire pourra être mené dans les échantillons significativement positifs en qPCR pour *Ptm* afin de collecter des isolats qui pourront être séquencés et pathotypés.

Nos analyses indiquent que les populations de *Ptt* sont subdivisées en deux groupes principaux correspondant à l'orge de printemps et à l'orge d'hiver. L'existence d'une telle structure suggère que les populations du pathogène sont différenciellement adaptées aux deux types d'orge, et/ou aux conditions de leur culture. Ces travaux ouvrent de nombreuses perspectives de recherche pour déterminer les barrières, notamment prézygotiques (Giraud *et al.* 2006, Servedio *et al.* 2011) qui contribuent au maintien des deux populations, et en particulier, la contribution relative de l'adaptation à l'hôte et de l'adaptation aux conditions abiotiques. Nos résultats soulignent également l'importance de tester de nouvelles variétés d'orge résistantes à des isolats de *Ptt* issus d'orges de printemps et d'hiver, notamment dans les régions où ces deux types d'orge sont cultivés. Ils ouvrent aussi des questions sur l'impact de la pratique agricole consistant à semer des orges de printemps à l'automne sur la structure des populations et leurs adaptations à l'hôte (adaptation ou maladaptation, transfert de facteurs de virulence entre populations, ...).

Pathogénicité et résistance variétale

Nos résultats montrent que la production de conidies chez *P. teres* est fortement influencée par des facteurs environnementaux et des stimuli liés à l'hôte. Les approches répétées d'inoculation sur l'orge et de ré-isolation permettent de réactiver la sporulation mais sont chronophages et peu efficaces pour générer de grandes quantités de conidies. L'utilisation de conditions spécifiques (blessures, lumière N-UV, aération, obscurité et températures plus fraîches) constitue une méthode prometteuse pour accroître la production de conidies.

Les méthodes développées dans les deux laboratoires pour évaluer la résistance variétale en conditions contrôlées sur feuilles détachées ou plantes entières se sont montrées fiables et reproductibles dans chaque laboratoire.

Les différences de résistance observées entre les variétés et les isolats indiquent un phénomène de spécialisation de l'hôte. Certaines variétés (Trapeze, Sy Scoop) offrent une protection efficace contre plusieurs isolats, tandis que d'autres (Prior, Skiff, Harrington) sont uniformément sensibles. Cette interaction entre diversité génétique du pathogène et variétés d'orge souligne l'importance d'adapter la gestion des cultures à la diversité locale des isolats de *P. teres*. Les méthodologies développées constituent des outils complémentaires aux essais au champ pour l'évaluation de la résistance variétale et peuvent servir à des études génomiques visant à identifier les gènes impliqués dans la résistance ou la spécialisation de *P. teres*.

Ainsi, neufs QTLs ont pu être détectés sur l'ensemble des données utilisées (essais en conditions agronomiques et

en conditions contrôlées) et à l'aide de deux méthodes de génétique d'association (GWAS par essai ou souche et méta-analyse). En particulier, trois QTLs semblent robustes car identifiés pour au moins deux essais/souches (QPt-2H-28, QPt-6H-54 et QPt-6H-358). Parmi ceux-ci, le QTL QPt-6H-358 semble particulièrement intéressant car significatif pour une souche et trois essais. Par ailleurs, deux QTLs additionnels (QPt-1H-7 et QPt-3H-9) ont été identifiés grâce à la méthode de méta-analyse et n'auraient pas été détectés sur la base des résultats de GWAS par essai. La puissance de cette méthode a donc permis d'identifier des QTLs supplémentaires du fait de la consistance de l'effet de ces QTLs pour différentes souches (p-valeur légèrement en dessous du seuil de significativité pour les GWAS par souche mais signe de l'effet identique entre souches). Un marqueur a déjà été publié dans l'intervalle QPt-2H-28 (Rozanova *et al.* 2019) ainsi que des marqueurs dans les zones QPt-6H-54 et QPt-6H-358 (Richards *et al.* 2017; Rozanova *et al.* 2019; Novakazi *et al.* 2019) dans des études sur la résistance à *Ptt*. Les études de génétique d'association publiées dans la littérature conduisent généralement à lister les marqueurs significativement associés à la sensibilité à l'helminthosporiose. Les travaux réalisés ici conduisent à préciser pour chaque région un intervalle en s'appuyant sur le déséquilibre de liaison local. Ceci devrait permettre de faciliter l'utilisation des QTLs en sélection assistée par marqueurs et ouvre la voie à d'éventuelles études ultérieures de cartographie fine des QTLs.

L'analyse du contenu en gènes des QTLs a permis d'identifier 69 gènes potentiellement impliqués dans l'interaction plante × pathogène pour quatre QTLs dont 5 gènes montrant un différentiel d'expression du fait de l'inoculation avec *C. sativus*. Ceci indique que ces gènes (i) sont exprimés in planta et (ii) interviennent dans l'interaction avec *C. sativus*. Ces 5 gènes semblent donc de bons candidats pour des études ultérieures. Aucun gène n'a pu être identifié pour le QTL QPt-6H-358 qui semble pourtant le plus intéressant car significatif pour une souche en conditions contrôlées et trois essais en conditions agronomiques. Néanmoins, ce type d'analyse repose sur l'identification par mots-clés des gènes dont la fonction prédite est potentiellement en lien avec l'interaction plante × pathogène. Ce type d'approche *in silico* peut conduire à la fois à des faux positifs et à des faux négatifs. En effet, certaines fonctions prédites telles que « protéin kinase » peuvent être associées à l'interaction plante-pathogène mais toutes les protéines de ce type ne le sont pas nécessairement. Par ailleurs, cette analyse se base sur le contenu en gène de Morex v2. Or, certains QTL peuvent être associés à un polymorphisme de type présence-absence (PAV ; « presence absence variation ») et le gène causal est possiblement absent chez Morex.

Les capacités prédictives du modèle de prédiction génomique indiquent qu'il est possible d'utiliser ce type de stratégie afin de sélectionner des individus à partir de données de génotypage. Néanmoins, la précision du modèle étant modérée, il est sans doute nécessaire de ne pas appliquer un taux de sélection trop élevé afin d'éviter d'éliminer des individus mal-prédits.

Prédiction du risque maladie

Prédire l'apparition d'une maladie aux champs et l'implémenter dans des outils d'aide à la décision est

un moyen efficace d'accompagner les producteurs pour accroître l'efficacité d'utilisation des produits phytosanitaires. Bien que de nombreuses approches aient été évaluées, les modèles retenus pour la prévision du développement de l'helminthosporiose, tant en début qu'en fin de cycle, présentent globalement une capacité prédictive limitée, se traduisant par des valeurs de RMSEP élevées et des efficacités généralement négatives. Certains signaux climatiques — notamment pluies et température élevées au printemps, pluies importantes pendant l'interculture et gel hivernal — demeurent toutefois régulièrement associés au niveau de risque en fin de cycle. Leur récurrence suggère que ces covariables sont utiles dans la prévision du risque, mais sans toutefois constituer, à elles seules, des prédicteurs suffisamment robustes pour une estimation fiable du risque. Dans ces conditions, il n'est pas possible, à ce stade, d'envisager l'usage opérationnel de ces modèles pour moduler la protection contre l'helminthosporiose de l'orge en fonction de la nuisibilité attendue.

Ces résultats laissent donc supposer que des variables déterminantes manquent probablement, en particulier l'humectation foliaire, identifiée dans la littérature comme un facteur clé et susceptible d'interagir non linéairement avec la température. Une piste d'amélioration consisterait peut-être à développer un modèle mécaniste représentant explicitement les relations complexes entre variables climatiques non agrégées (température, humectation, précipitations) sur les différentes phases du cycle épidémique. Des essais exploratoires ont été réalisés dans ce sens au cours du projet, mais se sont révélés non concluants, probablement en raison de l'absence de données d'humidité ou d'humectation disponibles et de la résolution temporelle limitée au pas journalier. En outre, une approche d'analyse fonctionnelle des données (FDA) pourrait peut-être permettre de mieux rendre compte de la dynamique temporelle des séries climatiques brutes non agrégées.

Concernant les facteurs agronomiques, hormis la résistance variétale, aucun ne ressort de manière significative sur le développement précoce d'helminthosporiose. L'absence d'effet du précédent orge — sans doute aussi lié à sa faible représentation dans la base de données — et du travail du sol sur la survie des résidus infectés suggèrent que des déterminants extérieurs à la parcelle pourraient être prépondérants. L'intégration de variables caractérisant le contexte des pratiques culturales l'échelle du paysage constituerait ainsi une piste d'analyse pertinente pour de futurs modèles.

CONCLUSION

Le projet HELMO apporte des éléments nouveaux et déterminants pour la compréhension de la diversité, de la structure génétique et de l'épidémiologie des agents causaux de l'helminthosporiose de l'orge en France. Les analyses génomiques menées ont permis de clarifier la phylogénie du genre *Pyrenophora*, confirmer que *Pyrenophora teres* est le taxon principal causant la maladie et démontrer une forte prédominance de *Ptt* par rapport à *Ptm*. La dynamique historique des formes

Ptt et *Ptm* et la mise en évidence d'une structuration nette des populations de *Ptt* selon le type d'orge (printemps versus hiver) soulignent l'importance de l'épidémiosurveillance pour gérer au mieux la résistance variétale. L'identification de plusieurs QTLs associés à la résistance, dont certains déjà décrits dans la littérature, constitue un levier concret pour la sélection assistée par marqueurs et pour l'amélioration génétique de l'orge. En parallèle, malgré des jeux de données indépendants conséquents et les nombreuses approches méthodologiques testées, nous n'avons pas pu développer un modèle de prévision du risque performant pour l'implémenter dans un OAD. Les résultats suggèrent que l'intégration de données climatiques plus précises, de variables paysagères et le développement de modèles mécanistes pourraient améliorer les capacités prédictives.

Dans l'ensemble, ce projet fournit des avancées substantielles pour la surveillance, la compréhension et

la gestion de l'helminthosporiose de l'orge en France. Il met également en lumière l'intérêt et la nécessité de poursuivre les efforts d'épidémiosurveillance, d'intégrer des données environnementales plus fines et de renforcer les liens entre génétique du pathogène, génétique de l'hôte et modélisation épidémiologique. Ces résultats constituent une base solide pour optimiser les stratégies de protection des cultures dans un contexte de changement climatique et d'évolution rapide des populations pathogènes.

REMERCIEMENTS

Nous remercions l'ensemble des collaborateurs et collaboratrices de tous les partenaires qui ont contribué à ce projet, acquis les données expérimentales et participé aux analyses. Nous remercions vivement le FSOV et son comité d'engagement pour le financement du projet HELMO.

Références bibliographiques

Afanasenko O.S., Jalli M., Pinnschmidt H.O., Filatova O., Platz G.J. (2009). Development of an international standard set of barley differential genotypes for *Pyrenophora teres* f. *teres*. *Plant Pathology* 58, 665-676.

Ahrens W. H., Cox D. J., & Budhwar G. (1990). Use of the arcsine and square root transformations for subjectively determined percentage data. *Weed Science*, 38, 452-458.

Alqudah A.M., Sallam A., Stephen Baenziger P., Börner A. (2020). GWAS: Fast-forwarding gene identification and characterization in temperate Cereals: lessons from Barley – A review. *J Adv Res* 22:119-135.

Amezrou R, Verma RPS, Chao S, et al (2018). Genome-wide association studies of net form of net blotch resistance at seedling and adult plant stages in spring barley collection. *Mol Breed* 38:58.

Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. (Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom).

Arabi, M.I., Barrault, G., Sarrafi, A., and Albertini, L. (1992). Variation in the resistance of barley cultivars and in the pathogenicity of *Drechslera teres* f. sP. *maculata* and *D. teres* f. sP. *teres* isolates from France. *Plant Pathology* 41, 180-186.

Arabi M.I.E, Jawhar M. (2003). Pathotypes of *Cochliobolus sativus* (spot blotch) on barley in Syria. *Journal of Phytopathology* 85, 193-196.

Backes A., Guerriero G., Ait Barka E., & Jacquard C. (2021). *Pyrenophora teres*: taxonomy, morphology, interaction with barley, and mode of control. *Frontiers in Plant Science*, 12, 614951.

Bayer M.M., Rapazote-Flores P., Ganai M., et al. (2017). Development and Evaluation of a Barley 50k iSelect SNP Array. *Front Plant Sci* 8: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01792>

Beuningen LT van, Kohli M.M. (1990). Deviation from the regression of infection on heading and height as a measure of resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. *Plant Dis* 74:488-493.

Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114-2120.

Breiman L. (2001). Random forests. *Machine Learning*, 45(1), 5-32.

Browning S.R. (2008). Missing data imputation and haplotype phase inference for genome-wide association studies. *Hum Genet* 124:439-450.

Burlakoti R.R., Gyawali S., Chao S, et al. (2016). Genome-Wide Association Study of Spot Form of Net Blotch Resistance in the Upper Midwest Barley Breeding Programs. *Phytopathology* 107:100-108.

Cantarel, B.L., Korf, I., Robb, S.M.C., Parra, G., Ross, E., Moore, B., Holt, C., Alvarado, A.S., and Yandell, M. (2008). MAKER: an easy-to-use annotation pipeline designed for emerging model organism genomes. *Genome research* 18, 188-196.

Carlsen, S.A., Neupane, A., Wyatt, N.A., Richards, J.K., Faris, J.D., Xu, S.S., Brueggeman, R.S., and Friesen, T.L. (2017). Characterizing the *Pyrenophora teres* f. *maculata*-barley interaction using pathogen genetics. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 7, 2615-2626.

Cormier F., Le Gouis J., Dubreuil P., et al. (2014). A genome-wide identification of chromosomal regions determining nitrogen use efficiency components in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 127:2679-2693.

Cox D.R. (1972). Regression models and life-tables. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 34(2), 187-202.

Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C.A., Banks, E., DePristo, M.A., Handsaker, R.E., Lunter, G., Marth, G.T., and Sherry, S.T. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics* 27, 2156-2158.

Deudon O., Le Bris X., & Piraux, F. (2017). Interest and implementation of a spatialization method of meteorological data used in Agricultural Decision Support Tools. In *Proceedings of the 2017 EFITA Congress*, Montpellier, France

- Dress, A., Huson, D., and Moulton, V.** (1996). Analyzing and visualizing sequence and distance data using SPLITSTREE.
- El-Mor, I.M., Fowler, R.A., Platz, G.J., Sutherland, M.W., and Martin, A.** (2018). An improved detached-leaf assay for phenotyping net blotch of barley caused by *Pyrenophora teres*. *Plant Disease* 102, 760-763.
- Emms, D.M., and Kelly, S.** (2015). OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. *Genome biology* 16, 157. *Discrete Applied Mathematics* 71, 95-109.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J.** (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611-2620.
- EWELS, P., Magnusson, M., Lundin, S., and Källér, M.** (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* 32, 3047-3048.
- Fetch TG, Steffenson BJ, Bockelman HE, Wesenberg DM.** (2008). Spring barley accessions with dual spot blotch and net blotch resistance. *Canadian Journal of Plant Pathology* 30, 534-542.
- Flynn, J.M., Hubley, R., Goubert, C., Rosen, J., Clark, A.G., Feschotte, C., and Smit, A.F.** (2020). RepeatModeler2 for automated genomic discovery of transposable element families. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117, 9451-9457.
- Gao X., Becker L.C., Becker D.M., et al.** (2010). Avoiding the high Bonferroni penalty in genome-wide association studies., Avoiding the high Bonferroni penalty in genome-wide association studies. *Genet Epidemiol Genet Epidemiol* 34, 34:100, 100-105.
- 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.
- Gouache, D., Léon M. S., Duyme F., & Braun P.** (2015). A novel solution to the variable selection problem in Window Pane approaches of plant pathogen-climate models: Development, evaluation and application of a climatological model for brown rust of wheat. *Agricultural and Forest Meteorology*, 205, 51-59.
- Gourdain E, Couleaud G, Piraux F.** (2018). Piloter la première intervention sur orge d'hiver. *Végéphyt*- 12^{ème} conférence sur les maladies des plantes- TOURS- 11 et 12 décembre 2018.
- Gourdain E, Piraux F, Barrier-Guillot B.** (2009). Les outils pour gérer le risque déoxynivalénol sur blé tendre et blé dur. AFPP - 9^{ème} Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, Tours, 8 et 9 décembre 2009.
- Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., and Zeng, Q.** (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature biotechnology* 29, 644-652.
- Herten, K., Hestand, M.S., Vermeesch, J.R., and Van Houdt, J.K.J.** (2015). GBSX: a toolkit for experimental design and demultiplexing genotyping by sequencing experiments. *BMC bioinformatics* 16, 1-6.
- Jacques, S., Lenzo, L., Stevens, K., Lawrence, J., and Tan, K.-C.** (2021). An optimized sporulation method for the wheat fungal pathogen *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Methods* 17, 52.
- Karakaya, A., and Akyol, A.** (2006). Determination of the seedling reactions of some Turkish barley cultivars to the net blotch.
- Koladia VM, Faris JD, Richards JK, Brueggeman RS, Chao S, Friesen TL.** (2017). Genetic analysis of net form net blotch resistance in barley lines Clho 5791 and Tifang against a global collection of *P. teres* f. *teres* isolates. *Theoretical and Applied Genetics* 130, 163-173.
- Kozlov, A.M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., and Stamatakis, A.** (2019). RAXML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics* 35, 4453-4455.
- Knight, N. L., Adhikari, K. C., Dodhia, K. N., Mair, W. J. & Lopez-Ruiz, F. J.** (2024). Workflows for detecting fungicide resistance in net form and spot form net blotch pathogens. *Pest Management Science* 80, 2131-2140.
- Kumar J, Schäfer P, Hückelhoven R, Langen G, Baltruschat H, Stein E, Nagarajan S, Kogel KH.** (2002). *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Molecular Plant Pathology* 3, 185-195.
- Langmead, B., and Salzberg, S.L.** (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Meth* 9, 357-359.
- Laporte F., Charcosset A., Mary-Huard T.** (2022). Efficient ReML inference in variance component mixed models using a Min-Max algorithm. *PLoS Comput Biol* 18:e1009659.
- Leisova, L., Kucera, L., Minarikova, V., and Ovesna, J.** (2005). AFLP-based PCR markers that differentiate spot and net forms of *Pyrenophora teres*. *Plant Pathology* 54, 66-73.
- Li, H.** (2011). A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* 27, 2987-2993.
- Li T., Li Y., Shangguan H, et al.** (2023). BarleyExpDB: an integrative gene expression database for barley. *BMC Plant Biol* 23:170.
- Liu Z, Ellwood SR, Oliver RP, Friese TL.** (2011). *Pyrenophora teres*: profile of an increasingly damaging barley pathogen. *Molecular Plant Pathology* 12, 1-19.
- Louw, J.P.J.C.P.W., and Holz, G.** (1996). Relative importance of the barley net blotch pathogens *Pyrenophora teres* f. *teres* (net-type) and *P. teres* f. *maculata* (spot-type) in South Africa. *African Plant Protection* 2, 89-95.
- Mair, W. J. Wallwork, H. , Garrard, T.A. , Haywood, J. , Sharma, N. , Dodhia, K.N. , Oliver, R.P., Lopez-Ruiz, F.J.** (2023). Emergence of resistance to succinate dehydrogenase inhibitor fungicides in *Pyrenophora teres* f. *teres* and *P. teres* f. *maculata* in Australia.
- Manni, M., Berkeley, M.R., Seppey, M., and Zdobnov, E.M.** (2021). BUSCO: assessing genomic data quality and beyond. *Current Protocols* 1, e323.
- Mangin B., Siberchicot A., Nicolas S., et al.** (2012). Novel measures of linkage disequilibrium that correct the bias due to population structure and relatedness. *Heredity* 108:285-291.
- Mathre D. E. (Ed.).** (1997). *Compendium of barley diseases* (Vol. 90). St. Paul, MN: APS Press.
- McLean, M.S., Howlett, B.J., and Hollaway, G.J.** (2010). Spot form of net blotch, caused by *Pyrenophora teres* f. *maculata*, is the most prevalent foliar disease of barley in Victoria, Australia. *Australasian Plant Pathology* 39, 46-49.

- Miele, V., Penel, S., and Duret, L.** (2011). Ultra-fast sequence clustering from similarity networks with SiLiX. *BMC bioinformatics* 12, 116.
- Min, B., Grigoriev, I.V., and Choi, I.-G.** (2017). FunGAP: Fungal Genome Annotation Pipeline using evidence-based gene model evaluation. *Bioinformatics* 33, 2936-2937.
- Monat C., Padmarasu S., Lux T., et al.** (2019). TRITEX: chromosome-scale sequence assembly of Triticeae genomes with open-source tools. *Genome Biol* 20:284.
- Novakazi F, Afanasenko O, Anisimova A, Platz GJ, Snowdon R, Kovaleva O, Zubkovich A, Ordon F.** (2019). Genetic analysis of a worldwide barley collection for resistance to net form of net blotch disease (*Pyrenophora teres* f. *teres*). *Theoretical and Applied Genetics* 132, 2633-2650.
- Oğuz, A.Ç., KarAkaya, A., ErGÜN, N., and Sayim, I.** (2017). Turkish barley landraces resistant to net and spot forms of *Pyrenophora teres*. *Phytopathologia Mediterranea* 56, 217-223.
- Oğuz, A.Ç., Rahimi, A., and Karakaya, A.** (2019). Seedling response of Iranian barley landraces to *Pyrenophora teres* f. *teres* and *Pyrenophora teres* f. *maculata*. *Journal of Agricultural Sciences* 25, 86-92.
- Pérez P., de los Campos G.** (2013). BGLR: A Statistical Package for Whole Genome Regression and Prediction. R package version.
- Pierre, A., E. Gourdain, G. Couleaud, X. Le Bris, F. Moreau, O. Deudon, E. Heritier, D. Simonneau and F. Piroux.** (2015). Elaboration d'un modèle d'alerte de maladie fongique sur grandes cultures : application au pathosystème puccinia striiformis/ble tendre d'hiver. Proc Afpp - Onzième Conférence Internationale Sur Les Maladies Des Plantes Tours - 7-9 Décembre 2015.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.** (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Ramírez Martínez, J., Guillou, S., Le Prieur, S., Di Vittorio, P., Bonal, F., Taliadoros, D., Gueret, E., Fournier, E., Stukenbrock, E.H., Valade, R., Gladieux P.** (2024). Deep population structure linked to host vernalization requirement in the barley net blotch fungal pathogen. *Microbial Genomics* 10, 001241.
- Richards JK, Friesen TL, Brueggeman RS.** (2017). Association mapping utilizing diverse barley lines reveals net form net blotch seedling resistance/susceptibility loci. *Theoretical and Applied Genetics* 130, 915-927.
- Rozanova IV, Lashina NM, Mustafin ZS, Gorobets SA, Efimov VM, Afanasenko OS, Khlestkina EK.** (2019). SNPs associated with barley resistance to isolates of *Pyrenophora teres* f. *teres*. *BMC Genomics* 20, 292.
- Roy JK, Smith KP, Muehlbauer GJ, Chao S, Close TJ, Steffenson BJ.** (2010). Association mapping of spot blotch resistance in wild barley. *Molecular Breeding* 26, 243-256.
- Simonneau D., et al.** (2011b). *Vigicultures® — Mode opératoire observation Orges d'hiver*. 16 p.
- Simpson, J.T., Wong, K., Jackman, S.D., Schein, J.E., Jones, S.J.M., and Birol, I.** (2009). ABySS: a parallel assembler for short read sequence data. *Genome research* 19, 1117-1123.
- Siol, M., Coudoux, T., Ravel, S., and De Mita, S.** (2022). EggLib 3: A python package for population genetics and genomics. *Molecular Ecology Resources* 22, 3176-3187.
- Smit, A.F.A., Hubley, R., and Green, P.** (2015). RepeatMasker Open-4.0. 2013-2015.
- Tamang P, Richards JK, Alhashal A, Sharma Poudel R, Horsley RD, Friesen TL, Brueggeman RS.** (2019). Mapping of barley susceptibility/resistance QTL against spot form net blotch caused by *Pyrenophora teres* f. *maculata* using RIL populations. *Theoretical and Applied Genetics* 132, 1953-1963.
- Tibshirani R.** (1996). Regression shrinkage and selection via the Lasso. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 58(1), 267-288.
- Valjavec-Gratian M, Steffenson BJ.** (1997). Genetics of virulence in *Cochliobolus sativus* and resistance in barley. *Phytopathology* 87, 1140-1144.
- Vatter T, Maurer A, Kopahnke D, Perovic D, Ordon F, Pillen K.** (2017). A nested association mapping population identifies multiple small effect QTL conferring resistance against net blotch (*Pyrenophora teres* f. *teres*) in wild barley. *PLoS ONE* 12.
- Walsche A.D., Vergne A., Rincet R., et al.** (2025) metaGE: Investigating genotype x environment interactions through GWAS meta-analysis. *PLOS Genet* 21:e1011553.
- Wilcoxon RD, Rasmusson DC, Miles MR.** (1990). Development of barley resistant to spot blotch and genetics of resistance. *Plant Disease* 74, 207-210.
- Wonneberger R, Ficke A, Lillemo M.** (2017a). Mapping of quantitative trait loci associated with resistance to net form net blotch (*Pyrenophora teres* f. *teres*) in a doubled haploid Norwegian barley population. *PLoS ONE* 12.
- Wonneberger R, Ficke A, Lillemo M.** (2017b). Identification of quantitative trait loci associated with resistance to net form net blotch in a collection of Nordic barley germplasm. *Theoretical and Applied Genetics* 130, 2025-2043.
- Wyatt, N.A., Richards, J.K., Brueggeman, R.S., and Friesen, T.L.** (2018). Reference assembly and annotation of the *Pyrenophora teres* f. *teres* isolate O-1. G3: Genes, Genomes, Genetics 8, 1-8
- Wyatt, N.A., and Friesen, T.L.** (2021). Four reference quality genome assemblies of *Pyrenophora teres* f. *maculata*: a resource for studying the barley spot form net blotch interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 34, 135-139.
- Zhang, C., Rabiee, M., Sayyari, E., and Mirarab, S.** (2018). ASTRAL-III: polynomial time species tree reconstruction from partially resolved gene trees. *BMC bioinformatics* 19, 15-30.
- Zhong S, Steffenson BJ.** (2001). Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology* 91, 469-476.