



HAL
open science

Stabilité de QTL et de composantes de résistance adulte du blé tendre à la rouille jaune.

Axel Olivier, Gwenn Verplancke, Claude C. Pope de Vallavieille, Marc Leconte, Bernard Rolland, Sophie Paillard, Jean-Bruno Beaufume, Jayne Stragliati, Denis Beghin, Philippe Lonnet, et al.

► To cite this version:

Axel Olivier, Gwenn Verplancke, Claude C. Pope de Vallavieille, Marc Leconte, Bernard Rolland, et al.. Stabilité de QTL et de composantes de résistance adulte du blé tendre à la rouille jaune.. FSOV 2008-2011,, Mar 2013, Paris, France. hal-01189718

HAL Id: hal-01189718

<https://hal.science/hal-01189718>

Submitted on 3 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Synthèse des programmes de recherche FSOV



Actes de
la rencontre
scientifique

15 mars 2013



FsoV

*Fonds de soutien
à l'Obtention Végétale*

Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale

Dans l'accord interprofessionnel relatif au renforcement de l'obtention végétale dans le domaine du blé tendre, le Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale (FSOV) a été défini comme un fonds destiné à financer des programmes de recherche collectifs dans le domaine du blé tendre, dont la finalité est la sélection de variétés adaptées à une agriculture durable plus respectueuse de l'environnement.

Cette finalité définie en 2001 lors de la mise en place de l'accord interprofessionnel se révèle toujours d'actualité et au cœur des préoccupations de la société, comme en témoignent les récentes propositions issues du Grenelle de l'environnement.

Ainsi le FSOV soutient les projets de création variétale dans le domaine du blé tendre, répondant simultanément aux objectifs d'amélioration des performances, de baisse ou de meilleure valorisation des intrants et d'adaptation aux contraintes multiples du milieu.

Le FSOV soutient également les projets innovants, en particulier ceux mettant en œuvre le transfert d'outils modernes (génomique, modélisation,...) débouchant sur des applications directement utilisables en création variétale pour les objectifs visés.

Cette synthèse des programmes de recherche FSOV présente les résultats des programmes retenus lors de l'appel à propositions 2008. Ils ont fait l'objet d'une communication orale lors de la rencontre scientifique du 15 mars 2013 à Paris.



François JACQUES
Président du Comité d'engagement du FSOV



Section Céréales et Protéagineux
44 rue du Louvre - 75001 Paris
Tél. : 01 42 33 79 09 - E-mail : fsov@gnis.fr

SOMMAIRE



AMÉLIORATION DES QUALITÉS TECHNOLOGIQUES DU BLÉ TENDRE

Développement, par génétique d'association, d'un outil moléculaire de prédiction du poids spécifique chez le blé tendre page 2

Compréhension du rapport "Ténacité/ Extensibilité" et du volume du pain page 18



DES VARIÉTÉS VALORISANT LES INTRANTS ET RESSOURCES NATURELLES

Évaluation de variétés tolérantes à la sécheresse par la signature de la composition isotopique du carbone photosynthétique de la feuille et du grain page 27

Développement d'un outil d'optimisation des réseaux d'essais et de caractérisation des variétés page 41

Caractérisation du rythme de développement du blé tendre pour des variétés adaptées aux risques climatiques page 50



AMÉLIORATION DE LA QUALITÉ SANITAIRE DES BLÉS TENDRES

Exploitation de résistances durables aux septorioses et fusarioses du blé tendre page 67



DES VARIÉTÉS PLUS RESISTANTE DE BLÉ TENDRE

Stabilité de QTL et de composantes de résistance adulte du blé tendre à la rouille jaune page 74

Résistance partielle à la rouille brune : sources de résistance, utilisation en sélection et durabilité page 85

Évaluation de la résistance du blé à la septoriose provoquée par *Mycosphaerella graminicola* page 93

Introduction de résistances au puceron des épis de *Sitobion avenae* chez le blé tendre page 105

Développement, par génétique d'association, d'un outil moléculaire de prédiction du poids spécifique chez le blé tendre

Jacques BORDES¹, Olivier ROBERT^{*2}, Ellen GOUEMAND², Laure DUCHALAIS³, Valérie LAURENT², Marie Reine PERRETANT¹, François-Xavier OURY¹, Annie LAPIERRE¹, Laëtitia CHEVARIN¹, Denis BEGHIN², Eric STORLIE¹, Bernard ROLLAND⁴, Gilles CHARMET¹

* **Coordinateur** : Olivier ROBERT¹, olivier.robert@florimond-desprez.fr, Tél. : 03 20 84 94 90

1 - INRA-GDEC - 5 chemin de Beaulieu, 63039 Clermont-Ferrand Cedex 2

2 - BIOPLANTE - Florimond Desprez, BP41, 59242 Cappelle en Pévèle

3 - BIOPLANTE - R2n, 60 rue Léon Beauchamp, 59930 La Chapelle d'Armentières

4 - INRA-APBV - Domaine de la Motte, BP 35327, 35653 Le Rheu cedex

1. Introduction

Le poids spécifique (PS) est un critère économique majeur pour la commercialisation du blé. En effet, les industriels recherchent des poids spécifiques élevés, de façon à avoir de la masse sous un faible volume. Ainsi, les lots apportés à l'intervention doivent répondre à des normes minimales de qualité. De plus, les prix payés par les organismes stockeurs (coopératives, négociants) tiennent compte de ces mêmes normes. Ainsi, le seuil du PS retenu pour les contrats commerciaux est de 76 kg/hl. Le prix d'intervention subit une refaction de -0.5 €/t lorsque le PS est compris entre 76 et 75 kg/hl et jusqu'à -1.5 €/t kg/hl pour des PS compris entre 74 et 73 kg/hl.

Le PS étant un caractère relativement héritable, il est possible de le sélectionner. Actuellement, les sélectionneurs évaluent le poids spécifique à posteriori par des pesées d'échantillons, mais sans pouvoir orienter efficacement leurs croisements en fonction de ce critère, ni le prendre en compte durant les toutes premières générations de sélection. Le développement dans ce projet, d'un outil moléculaire de prédiction du PS, aidera le sélectionneur dans les choix des croisements et/ou le tri précoce dans les descendances. Cela lui permettra d'obtenir plus efficacement de nouvelles variétés et de fournir aux agriculteurs français, un plus grand choix de variétés avec un poids spécifique amélioré.

La mise au point d'un outil de prédiction nécessite deux étapes : une étape de calibration et une étape de validation. L'étape de calibration consiste à identifier dans des populations, par génétique d'association ("Linkage Disequilibrium Mapping"), des marqueurs moléculaires liés aux caractères étudiés. L'étape de validation consiste à mettre au point des équations de prédiction de sélection génomique pour ces caractères et de les valider dans une nouvelle population, en comparant les résultats de phénotypage observés, à ceux obtenus par la prédiction.

Comme l'analyse QTL, devenue classique depuis l'avènement des marqueurs moléculaires, l'analyse d'association vise à tester la dépendance statistique entre un polymorphisme moléculaire et une variation phénotypique.

En exploitant des populations naturelles d'individus non apparentés, l'accumulation des recombinaisons historiques doit logiquement conduire à une portée très réduite du déséquilibre de liaison (DL), moins de 2 kb chez le maïs (Flint-Garcia *et al* 2003, 2005). Dans ce cas, seuls les polymorphismes très proches du facteur causal de la variation sont liés de façon significative à la variation du caractère. Cette approche a été

appliquée avec succès chez les plantes, en particulier à l'INRA chez le maïs (Thornsberry *et al* 2001) et le blé (Ravel *et al* 2006, Bordes *et al* 2011, Le Gouis *et al* 2012). Des considérations théoriques ont amené à penser que, dans certains cas, la portée du DL pourrait s'étendre à plusieurs cM : une couverture du génome avec quelques milliers de marqueurs, pourrait alors être suffisante. Les paramètres qui peuvent accroître la portée du DL sont, entre autres, l'autogamie et la consanguinité du matériel. La sélection, exercée sur un gène candidat, tendrait également à renforcer la portée du DL local (Rhoné *et al* 2007). Des études expérimentales chez l'orge (Kraakman *et al* 2004) et le blé (Somers *et al* 2007) ont confirmé la faisabilité d'une analyse « genome-wide » avec une densité de marquage de l'ordre du cM. Les marqueurs DArT (Diversity Arrays Technology) obtenus à partir d'une technologie développée par Triticarte Pty Ltd peuvent répondre à cette contrainte. Toutefois, le risque de « spurious associations » demeure, voire est encore augmenté si l'on utilise par exemple un set de variétés européennes ou des lignées de sélectionneurs, qui présentent des taux d'apparentement élevés.

La difficulté dans ce type d'approche est le contrôle des faux positifs causés par l'existence d'une structure des populations ou de différentes parentés entre les individus, se traduisant par des DL significatifs entre loci non liés. Afin de remédier à ce problème, une solution consiste à rechercher le modèle le plus approprié, entre un modèle linéaire prenant en compte la structure (Pritchard *et al* 2000) et un modèle mixte prenant en compte : soit les coefficients de parenté seuls, soit combinés avec la structure, dans les tests d'association (Meuwissen and Goddard 2001, Yu *et al* 2006).

Cependant, avec un nombre important de données (marqueurs, individus et caractères), la méthode MLM nécessite un temps de calcul très lourd. Afin de réduire cette durée, Zhiwu Zhang *et al.* (2010), décrivent deux méthodes, dérivées de l'approche "sire model" utilisée en sélection animale : "compressed MLM method" and "population parameters previously determined" (P3D). Cette dernière, dérivée de la première et qui fait appel aux coefficients de parentés entre individus est maintenant implantée dans le logiciel : TASSEL3.0.66 (<http://www.maizegenetics.net>).

La sélection génomique, proposée par Meuwissen *et al* en 2001, consiste à utiliser de façon globale, c'est-à-dire sans procédure de choix a priori, des marqueurs moléculaires « genomewide », pour prédire la valeur génétique des candidats. Cette valeur génétique est toujours inconnue,

sauf pour des données simulées selon un modèle connu), et la sélection « classique », qui est donc toujours indirecte, porte sur un prédicteur de cette valeur génétique (breeding value), basé sur le phénotype des candidats eux-mêmes ou de leurs apparentés (filles ou petites filles, par exemple, pour estimer la valeur laitière d'un taureau). La réponse à cette sélection « phénotypique » dépend de la corrélation entre la vraie valeur génétique et le phénotype mesuré (régression géno-phénotypique), dont le coefficient est égal à l'héritabilité au sens large du caractère pour la population considérée (Gallais 1990, p55).

Comme l'ensemble des gènes gouvernant les caractères complexes (QTL) n'est pas encore connu, l'utilisation de marqueurs en nombre suffisant devrait permettre de capturer l'information apportée par les QTL. Pour que cette capture soit efficace, il faut que tous les QTL soient en déséquilibre de liaison (DL) significatif avec au moins un marqueur. C'est donc l'étendue et la distribution du DL qui détermine la densité de marqueurs à utiliser. Ainsi, chez le blé, les estimations, bien qu'encore peu nombreuses, donnent des étendues allant de 300 kB à plusieurs cM, selon le matériel considéré (Horvath *et al* 2009, Trebbi *et al* 2011). Il est donc encore difficile de dire quelle densité de marquage sera nécessaire pour avoir des prédictions génomiques précises.

La calibration du modèle de prédiction nécessite d'avoir à la fois des génotypes et des phénotypes (comme succédané de la valeur génétique). Une fois les équations établies et leur qualité éprouvée par validation croisée, la valeur génétique peut être estimée pour des candidats dont on connaît seulement le génotype aux marqueurs. L'utilisation de marqueurs plutôt que des phénotypes pour estimer la valeur génétique présente un intérêt si :

- Le coût du marquage est très inférieur à celui du génotypage
- Le génotypage permet de raccourcir les cycles de sélection

Dans le cas d'une plante annuelle comme le blé, dont le phénotypage pour le rendement est relativement peu cher l'avantage économique paraît moins évident par exemple que pour les bovins laitiers.

Finalement, les principaux objectifs de ce projet étaient multiples :

- Identification de lignées ou de variétés avec un poids spécifique élevé et stable
- Obtention de données moléculaires à partir d'une puce à ADN de 5000 marqueurs DArTs, révélant la diversité génétique du matériel étudié. Ces données pourront être exploitées par exemple pour orienter le choix des géniteurs à croiser.
- Acquisition de la méthode d'analyse "génétique d'association à l'échelle du génome" (contrôle des risques statistiques adaptés au matériel de sélection), qui pourra être réinvestie pour tout autre caractère.
- Identification de marqueurs moléculaires liés au PS, au rendement et à la précocité : outil de prédiction.
- Validation de l'outil de prédiction sur un autre panel de variétés, afin d'en évaluer sa robustesse et sa pertinence.

2. Matériel et méthodes

► Matériel végétal

Le matériel étudié est composé de 2 populations de 376 lignées haploïdes doublées (HD1 et HD2) fournies par

Bioplante et 376 lignées recombinantes (RIL) apportées par l'INRA. Le matériel des deux partenaires a été choisi pour être complémentaire :

- Le taux de recombinaison entre le matériel HD et RIL est différent.
- Le matériel Bioplante (HD) est composé de lignées HD produites pour obtenir des variétés destinées au marché Français voire européen.
- Le matériel végétal (RIL) proposé par l'INRA représente une diversité génétique plus importante.

Le matériel HD est composé de 4 à 5 lignées issues d'environ 80 croisements. Ces lignées auront été prises au hasard. Le matériel RIL est constitué des 376 lignées les plus avancées du programme de sélection INRA (blés rustiques de qualité). Il s'agit de lignées F8 issues du croisement d'une centaine de géniteurs différents et qui ont été évaluées dans le réseau INRA (inter-stations A) entre 2000 et 2010.

► Phénotypage

Les expérimentations ont été réalisées en 2009 (HD1), 2010 (RIL) et 2011 (HD2) dans 3 lieux différents. En 2009, la population HD1 a été implantée à Clermont-Ferrand (63), Cappelle-en-Pévèle (59) et Milly-la-Forêt (91). En 2010, la population RIL a été implantée à Clermont-Ferrand, Cappelle-en-Pévèle et Mons en Chaussée (80). En 2011 la population HD2 a été implantée à Cappelle-en-Pévèle, Milly-la-Forêt et Rennes (35). Le niveau d'intrants correspondait aux pratiques culturales utilisées habituellement dans chaque lieu, pour des objectifs à haut rendement : forte densité de semis, niveau élevé de fertilisation azotée et pesticides appropriés.

Toutes les lignées, cultivées sur des parcelles de 10 m² ont été implantées en blocs aléatoires (1 bloc par lieu). Pour estimer l'hétérogénéité possible du sol, dans chaque bloc, deux variétés Apache et Caphorn ont été répétés 10 fois. Le poids spécifique (PS, kg/hL), le rendement en grains (RDT, Qtx/ha à 0% d'humidité) et la date d'épiaison (Ep, jours à compter du 1er Janvier) ont été déterminés pour chaque parcelle.

► Génotypage

Le génotypage a été réalisé par Triticarte Pty Ltd, à partir d'une puce à ADN de 5000 marqueurs DArT, testés sur les 3 populations. Avec les 2700 qui étaient polymorphes, une carte génétique a été réalisée à partir d'une carte consensus, construite avec le logiciel MetaQTL (Veyrieras *et al* 2007), à partir de données publiées. Les marqueurs non cartographiés dans la carte consensus ont été placés à côté du marqueur DArT avec lequel le DL était le plus fort. Ce DL a été calculé avec R.

Nous avons considéré les allèles rares (<2,5% du nombre total d'allèles) comme données manquantes.

► Déséquilibre de liaison

Le DL entre les loci (DArTs cartographiés), représenté par le R² a été calculé avec TASSEL3.0.66. Pour chaque population, le DL a été calculé séparément pour les loci non liés et ceux portés par le même chromosome. Au sein d'une région chromosomique, si plusieurs marqueurs étaient signalés au même locus de la carte de référence, un seul était utilisé pour l'analyse. Le seuil de signification par paire a été calculé pour 1000 permutations. Le seuil p < 0.001 a été retenu. La valeur

critique du R² (environ 0.20) a été déterminée en utilisant la valeur du quantile à 95% de la distribution de la racine carrée des R² des loci non liés (méthode décrite par Brescghello et Sorrells, 2006).

La décroissance du DL sur la distance génétique a été représentée par un histogramme pour les R² significatifs en fonction des distances.

► Associations génétiques

Afin d'éviter les risques de type I (détection de fausses associations) et de type II (non détection de vrais associations), différentes méthodes statistiques d'analyse de données, pouvant prendre en compte la structure des populations et la parenté entre individus, ont été développées. Une première étape de recherche du modèle le mieux adapté, a été réalisée à partir de l'épiaison, caractère très héritable. Pour chaque population deux matrices de structure (Q) ont été déterminées, une à l'aide du logiciel "Structure" (Q) et une deuxième à partir des coordonnées des axes d'une analyse en composante principale (ACP) calculée avec R⁺. Les coefficients de parenté ou "Kinship" (K) entre les individus, ont été calculés avec TASSEL3.0.66.

Les modèles testés sur l'épiaison ont été : GLM (sans correction de structure de la population), GLM-Q et GLM-ACP (avec matrice de structure et matrice des coordonnées des ACP pour correction de la structure) et MLM-K (avec Kinship pour correction des différentes parentés), MLM-Q-K et MLM-ACP (correction à la fois de la structure et des différentes parentés).

La recherche du meilleur ajustement a été faite à partir de l'appréciation graphique de la concordance entre une distribution observée et un modèle théorique représentée par le diagramme *probabilités observées-probabilités cumulées* (Kang et al 2008).

Le modèle le mieux adapté a ensuite été utilisé pour la recherche d'associations avec les autres caractères.

► Construction d'un outil de prédiction par les marqueurs moléculaires (sélection génomique)

Les méthodes suivantes ont été comparées :

- 1 - pedigree-BLUP : il s'agit du BLUP « modèle animal » ou la matrice de parenté, habituellement reconstruite à partir des pédigrées, est estimée à l'aide des marqueurs (library pedigree de R)
- 2 - RR-BLUP : ridge regression BLUP (Piepho 2009) : un estimateur BLUP des effets de chaque marqueur est estimée par une méthode de régression avec pénalisation pour éviter le surparamétrage liée au problème $n \gg p$ (plus de marqueurs que d'observations)
- 3 - Deux méthodes bayésiennes : Bayesian Ridge Regression (BRR) et Bayesian LASSO : les deux méthodes diffèrent par les distributions des effets dans les prior. Ces deux méthodes ont été mises en œuvre avec la library BRR de R (Perez et al 2010)
- 4 - Une méthode non paramétrique apparentée aux « support vector machine » (SVM), la random Hilbert Kernel Space (RKHS)
- 5 - Une méthode basée sur l'échantillonnage parmi des classifications semi-supervisées : la random forest regression.

Toutes les méthodes ont été mises en œuvre sous R. Les scripts des fonctions ont été échangés entre les partenaires.

3. Résultats et discussions

► Phénotypage

Les Tableaux 1 à 3 indiquent, pour chaque population, les résultats moyens, l'étendue et les corrélations entre les lieux, des caractères rendement (RDT), poids spécifique (PS) et épiaison (Ep).

Lieu-Caractère	Moyenne	Etendue	Ca-RDT	Clit-RDT	Mi-RDT	Ca-PS	Clit-PS	Mi-PS	Ca-Ep	Clit-Ep
Ca-RDT	97.6	72.8 - 114.4	1.00							
Clit-RDT	88.6	58.5 - 110.8	0.34	1.00						
Mi-RDT	96.2	64.9 - 112.7	0.62	0.08	1.00					
Ca-PS	78.2	72.5 - 83.9	-0.04	0.20	-0.24	1.00				
Clit-PS	77.5	70.5 - 83.0	-0.07	0.36	-0.21	0.75	1.00			
Mi-PS	76.2	69.9 - 82.1	-0.15	0.18	-0.17	0.67	0.65	1.00		
Ca-Ep	150.6	143 - 158	0.25	-0.20	0.37	-0.22	-0.20	-0.25	1.00	
Clit-Ep	145.2	136 - 153	0.27	-0.22	0.39	-0.20	-0.24	-0.23	0.90	1.00
Mi-Ep	140.5	133-149	0.27	-0.21	0.35	-0.19	-0.22	-0.24	0.92	0.92

En rouge : corrélation significative à $p < 0.05$. Ca : Capelle, Clit : Cleemont, Mi : Milly

Tableau 1 Population HD1 : Moyenne, étendue et corrélation entre les lieux pour rendement (RDT), poids spécifique (PS) et épiaison (Ep)

Lieu-Caractère	Moyenne	Etendue	Ca-RDT	Clit-RDT	Mo-RDT	Ca-PS	Clit-PS	Mo-PS	Clit-Ep
Ca-RDT	102.7	66.3 - 130.9	1.00						
Clit-RDT	92.1	61.2 - 112.8	0.23	1.00					
Mo-RDT	86.1	59.4 - 100.9	0.36	0.26	1.00				
Ca-PS	74.3	66 - 80.6	0.34	-0.05	-0.16	1.00			
Clit-PS	71.2	61 - 79.2	-0.04	0.06	-0.10	0.36	1.00		
Mo-PS	75.9	69.7 - 81.2	0.07	-0.06	-0.12	0.65	0.62	1.00	
Clit-Ep	137.7	128 - 147	0.21	0.14	0.31	-0.14	0.02	-0.02	1.00
Mi-Ep	150.4	142 - 159	0.19	0.06	0.17	-0.15	-0.13	-0.17	0.76

En rouge : corrélation significative à $p < 0.05$. Ca : Capelle, Clit : Cleemont, Mo : Mons

Tableau 2 Population RIL : Moyenne, étendue et corrélation entre les lieux pour rendement (RDT), poids spécifique (PS) et épiaison (Ep)

Lieu-Caractère	Moyenne	Etendue	Ca-RDT	Mi-RDT	Re RDT	Ca-PS	Mi-PS	Re-PS	Ca-Ep	Re-Ep
Ca-RDT	106.2	78.9 - 124.8	1.00							
Mi-RDT	97.5	73.9 - 118.4	0.27	1.00						
Re-RDT	107.8	56.8 - 134.0	0.31	0.22	1.00					
Ca-PS	79.4	73.4 - 83.2	0.16	-0.25	-0.08	1.00				
Mi-PS	80.0	73.6 - 88.0	-0.23	-0.01	-0.02	0.33	1.00			
Re-PS	75.8	68.8 - 81.0	0.07	-0.28	0.19	0.75	0.38	1.00		
Ca-Ep	137.7	127 - 151	0.51	0.05	0.02	0.32	-0.31	0.21	1.00	
Re-Ep	128.5	114 - 140	0.50	0.09	-0.02	0.33	-0.17	0.23	0.87	1.00
Mi-Ep	132.1	122 - 141	0.45	0.06	-0.06	0.33	-0.16	0.22	0.88	0.93

En rouge : corrélation significative à $p < 0.05$. Ca : Capelle, Mi : Milly, Re : Rennes

Tableau 3 Population HD2 : Moyenne, étendue et corrélation entre les lieux pour rendement (RDT), poids spécifique (PS) et épiaison (Ep)

Le rendement moyen, relativement fort pour l'ensemble des lieux, indique un matériel végétal de très bon niveau agronomique. Le niveau, sensiblement équivalent entre HD1 et RIL est légèrement supérieur pour HD2. Excepté entre Clermont et Milly pour HD1, les corrélations entre les lieux sont significatives. Elles sont en général assez faibles (0.22 à 0.62), indiquant la présence d'une interaction génotype*milieu. L'étendue, importante à très importante, proche de 80 Qtx pour HD2 sur le lieu Rennes, montre une forte variabilité des 3 populations pour ce caractère.

Le poids spécifique semble relativement plus faible pour la population RIL. Il y a une relativement meilleure corrélation entre les lieux pour la population HD1. Quelle que soit la population considérée, l'étendue est égale ou supérieure à 10. Elle peut aller jusqu'à 18 pour la population RIL à Clermont.

L'étendue pour l'épiaison de la population HD2 est la plus importante. La corrélation entre les lieux est très bonne pour HD1 et HD2, elle est relativement plus faible pour RIL.

► Génotypage et Déséquilibre de liaison

Finalement 2575 (HD1), 1436 (HD2) et 2172 (RIL) DArTs ont été utilisés pour tester les associations, 1154 sont communs aux 3 populations (Tableau 5).

L'étendue du déséquilibre de liaison (DL) est représenté Figure 1. Il est sensiblement équivalent pour les 3 populations avec toutefois une étendue relativement plus faible pour HD2.

	HD1	HD2	RIL	Communs
	2575	1436	2172	
HD1 - HD2	X	X		1435
HD1 - RIL	X		X	1951
HD2 - RIL		X	X	1235
HD1 - HD2 - RL	X	X	X	1154

Tableau 4 : Nombre de DArTs polymorphes et communs entre les populations

Le nombre d'étapes de recombinaisons réduit à 2 dans le processus d'obtention des lignées HD par rapport aux lignées RIL en 8^{ème} année d'autofécondation, ne change pas l'étendue du DL.

Population	Paires	DL $p < 0.001$	DL $p < 0.001$ et $R^2 > 0.2$
HD1	25617	5.16	0.16
HD2	22347	5.00	0.13
RIL	24043	7.35	0.10

Tableau 5 : Paires de locus inter-chromosomiques en déséquilibre de liaison

Le nombre de paires de locus inter-chromosomique en DL, significatif à $p < 0.001$, légèrement supérieur pour la population RIL, va dans le sens opposé à ce qui est attendu du fait du plus grand nombre de recombinaison subi par les lignées autofécondées. Si l'on ne retient que les DL significatifs à $p < 0.001$, mais avec un $R^2 > 0.2$, le pourcentage très faible est équivalent pour les 3 populations. Ceci indique que les 3 populations n'ont pas une structure très marquée.

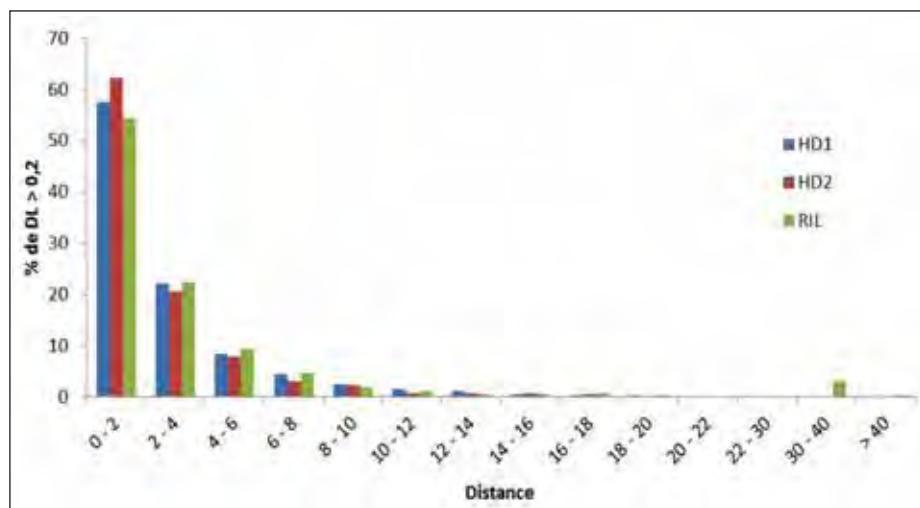


Figure 1 : Fréquence des DL en fonction de la distance génétique



Le seuil de probabilité retenu pour déclarer une association significative a été de $p < 0.01$.

Le bilan global de tous les marqueurs associés au poids spécifique, au rendement et à l'épiaison, dans chaque lieu

et pour la moyenne des 3 lieux, est indiqué Annexes 1, 2 et 3. Puisque le DL entre 2 marqueurs liés peut être significatif jusqu'à 10 cM (Figure 1) nous avons considérés que les marqueurs significatifs, séparés par une distance voisine de 10 cM, faisaient partie du même QTL (Figure 3).

Pour le poids spécifique, 143 marqueurs répartis sur l'ensemble du génome, étaient associés. On peut observer 8 QTLs communs aux 3 populations (HD1-HD2-RIL) et 9 communs à 2 populations. Pour le rendement, 186 marqueurs étaient impliqués. 5 QTLs sont communs aux 3 populations et 18 sont communs à 2. Pour l'épiaison, 126 marqueurs étaient impliqués. 3 QTLs sont communs aux 3 populations et 16 sont communs à 2. Malgré un dispositif expérimental relativement simple et à partir de populations différentes, on observe une bonne répétabilité des résultats. Celle-ci pourrait être améliorée, soit en augmentant le nombre de lieux ou de répétitions, soit en ayant une meilleure couverture du génome en augmentant le nombre de marqueurs. La deuxième solution pourrait être réalisée à un coût moindre.

4 QTLs colocalisent entre les 3 caractères, dont 3 sur le groupe 6. 11 colocalisent entre le PS et le RDT. Avec ce matériel de type "élite", ce résultat est conforme à ce que l'on peut attendre. Le poids spécifique n'est pas corrélé au rendement (Tableaux 1, 2 et 3), mais étant devenu un critère important de sélection, il est tout à fait envisageable que l'on soit en présence d'un phénomène de "linkage drag". La sélection au cours du temps s'opérant sur un haplotype comportant 2 gènes, un impliqué au niveau du RDT et l'autre sur le PS.

En conclusion, l'expérimentation conduite a permis l'identification de lignées ayant un poids spécifique élevé.

Des marqueurs DArTs polymorphes à partir d'une puce à ADN de 5000 marqueurs ont été cartographiés : 2575 (HD1), 1436 (HD2) et 2172 (RIL) révèlent ainsi une diversité génétique du matériel étudié. Ces données pourront donc être exploitées, principalement au niveau de la matrice de kinship, pour orienter le choix des géniteurs à croiser.

Génotypes	Croisements de Prebreeding	FDHD42
FDHD42		1.00
FDHD38	a	0.79
HDAssSR141	b	0.63
FDHD61		0.40
HDAssSR126		0.25
HDAssSR41		0.25
HDAssSR40		0.25
HDAssSR24		0.15
HDAssSR80		0.10
HDAssSR172		0.09
CF08084		0.08
EM08221		0.07
HDAssSR21		0.05
HDAssSR25		0.04
FDHD74	d	0.04
HDAssSR143		0.04

Coefficient de parenté : 1 = parenté complète et 0 = absence de parenté.
Exemples de croisements possible avec FDHD42 : a et b) FDHD38 et HDAssSR141 = entre lignées proches, c) HDAssSR141 avec une lignée plus éloignée et d) avec une lignée sans aucune parenté

Tableau 6 : Matrice de parenté entre FDHD42 et quelques lignées de la population HD2 et exemple de croisements

Une méthodologie d'application de la "génétique d'association à l'échelle du génome" avec recherche du "meilleur" modèle, adapté au matériel de sélection, pour le contrôle des risques statistiques, a été décrite et expérimentée. Des marqueurs moléculaires, liés au PS, au rendement et à la précocité ont été identifiés ils peuvent servir d'outil de prédiction.

► Prédiction génomique

Sur le panel d'entraînement 2010 (INRA), le comportement des différentes méthodes varie d'un caractère à l'autre (donc probablement selon l'architecture inconnue des QTL), mais aussi selon les lieux, comme illustré Figure 4 :

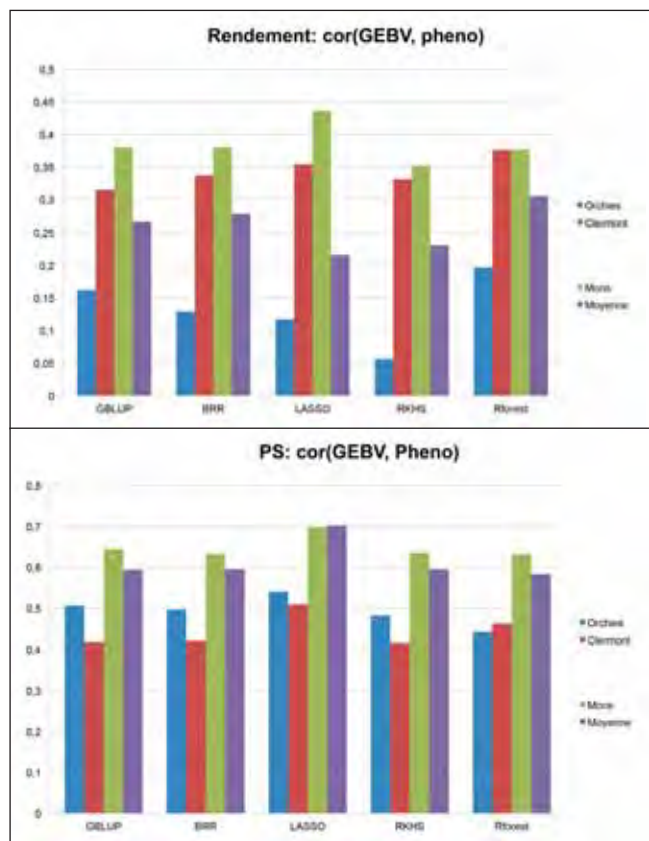


Figure 4 : Efficacité (corrélations entre GEBV et phénotype) par validation croisée pour 5 méthodes statistiques dans les 3 lieux et la moyenne, pour 2 caractères cibles.

Pour le rendement, c'est la méthode LASSO qui semble se détacher dans certains lieux, mais pas pour la moyenne. Et pour le poids spécifique, c'est encore la méthode LASSO, mais cette fois avec une plus grande stabilité entre lieux.

Mais l'intérêt d'une prédiction génomique est également, et sans doute surtout, de permettre de prédire la GEBV de lignées autres que celles du panel d'entraînement.

Pour estimer cette portabilité des prédictions, un troisième panel de 382 lignées (342 Bioplante et 40 INRA) a été implanté en 2011 dans 3 lieux Capelle (59), Milly (77) et Rennes (35). Les panels 2009, 2010 ou 2009+2010 ont été utilisés comme populations d'entraînement et les équations ont servi à prédire les GEBV du panel 2011. Les résultats sont présentés en Figure 5 pour les 3 caractères cibles. (Les lieux n'étant pas les mêmes, on n'a considéré que la moyenne des 3 lieux). Seuls les marqueurs communs (1098) peuvent être utilisés.

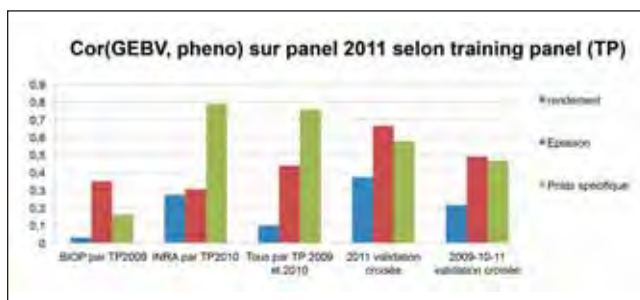


Figure 5

On constate que la qualité de prédiction est du même ordre de grandeur que celle obtenue au sein d'un même panel, donc toujours mauvaise pour le rendement, mais sans être vraiment pire. Par contre, la qualité de prédiction pour le caractère cible du projet, à savoir le poids spécifique, est parfois très bonne, que ce soit au sein du matériel INRA (0.790, NB : 0.802 avec LASSO) ou même pour la prédiction globale de l'ensemble du panel 2011 (Bioplante + INRA) en utilisant les 2 panels 2009 et 2010 comme population d'entraînement ($r=0.758$).

La Figure 6 illustre la qualité de la prédiction dans le cas le plus favorable (INRA2011 par INRA2010).

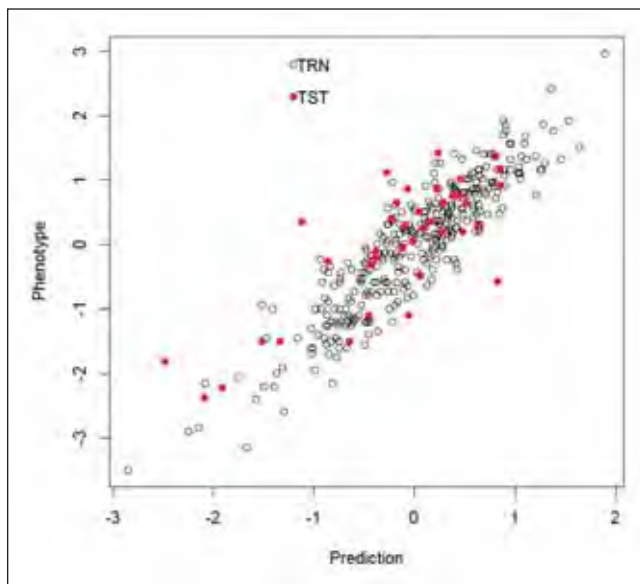


Figure 6

Pour le rendement, on peut avancer l'hypothèse d'une couverture insuffisante du génome, mais aussi celle d'une taille insuffisante de la population de référence, qui ne permet pas aux méthodes, même si elles sont théoriquement prévues pour, de bien répondre au problème de surparamétrisation.

Il est intéressant de regarder, dans les méthodes qui estiment un effet par marqueurs (ridge regression et méthodes bayésienne), quels sont les marqueurs ayant les plus forts effets : retrouve-t-on des marqueurs significativement associés ? Nous avons pris pour exemple la prédiction du poids spécifiques par le panel 2010 ($r=0.790$), et reporté dans le Tableau des associations les 50 marqueurs présentant les plus forts effets génomiques. Sur les 50 marqueurs ayant les plus forts poids dans la prédiction GEBV, 12 correspondent à des associations significatives. Les 2 approches, de philosophie différente

(en SG, les poids peuvent être répartis sur de nombreux marqueurs en DL), donnent des résultats cohérents.

En conclusion, nous pensons que les méthodes de prédiction génomique constituent une alternative intéressante à l'évaluation des phénotypes, surtout quand celle-ci est longue et/ou coûteuse. Néanmoins, des recherches sont encore nécessaires pour améliorer la qualité des prédictions et leur portabilité entre différents germplasmes. Pour cela, la taille de la population de référence est certainement un élément critique, et une

collaboration entre recherche publique et obtenteurs serait sans doute un bon moyen de constituer une population de grande taille, au bénéfice de tous.

3. Remerciements

Nous remercions Laurence Moreau et Alain Charcosset pour leurs conseils au niveau de la génétique d'association et Jacques Le Gouis pour son aide dans la construction de la carte consensus.

Références bibliographiques

- Bordes J., Ravel C., Le Gouis J., Charmet G., Balfourier F. (2011) Use of global wheat core collection for association analysis of flour and dough quality traits. *Journal of Cereal Science* 54: 137-147
- Bresegghello F., Sorrells M.E. (2006) Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics* 172:1165-1177
- Gallais A. (1990) Théorie de la sélection en amélioration des plantes. Masson Ed, Paris, Milan, Barcelone, Mexico.
- Horvath A., Didier A., Koenig J., Exbrayat F., Charmet G., Balfourier F. (2009) Analysis of diversity and linkage disequilibrium along chromosome 3B of bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 119:1523-1537
- Kraakman A.T.W., Niks R.E., Van den Berg P.M.M.M., Stam P., Van Eeuwijk A. (2004) Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. *Genetics* 168:435-446
- Le Gouis J., Bordes J., Ravel C., Heumez E., Faure S., Praud S., Galic N., Remoué C., Balfourier F., Allard V., Rousset M. (2012) Genome wide association analysis to identify chromosomal regions determining components of earliness in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 124: 597-611
- Meuwissen T.H.E., Hayes B., Goddard M.E. (2001) Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157:1819-1829
- Pérez P., De los Campos G., Crossa J., Gianola D. (2010) Genomic-enabled prediction based on molecular markers and pedigree using the Bayesian Linear Regression Package in R. *The Plant Genome* 3:106-116
- Piepho H.P. (2009) Ridge regression and extensions for genomewide selection in maize. *Crop Sci* 49:1165-1175
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959
- Ravel C., Praud S., Murigneux A., Linossier L., Dardevet M., Balfourier F., Dufour P.H., Brunel D. and Charmet G. (2006) Identification of *Glu-B1-1* as a candidate gene for the quantity of high-molecular-weight glutenin in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by means of an association study. *Theor. Appl. Genet.* 112: 738-743
- Rhoné B., Raquin A.L., Goldringer I. (2007) Strong linkage disequilibrium near the selected *Yr17* resistance gene in a wheat experimental population. *Theor. Appl. Genet.* 114: 787-802.
- Somers, D.J., Banks T., DePauw R., Fox S., Clarke J., Pozniak C. and McCartney C. (2007) Genome-wide linkage disequilibrium analysis in bread wheat and durum wheat. *Genome* 50:557-567
- Thornsberry J.M., Goodman M.M., Doebley J., Kresovich S., Nielson D. et al (2001) Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nat. Genet.* 28: 286-289.
- Trebbi D., Maccaferri M., De Heer P. et al (2011) High-throughput SNP discovery and genotyping in durum wheat (*Triticum durum*). *Theor. Appl. Genet.* 123: 555-569
- Veyrieras J.B., Goffinet B., Charcosset A. (2007) MetaQTL: a package of new computational methods for the meta-analysis of QTL mapping experiments. *BMC Bioinformatics* 8: 1-16
- Yu J., Pressoir G., Briggs W.H., Vroh Bi I., Yamasaki M., Doebley J., McMullen M.D., Gaut B.S., Nielsen D.M., Holland J.B., Kresovich S., Buckler E.S. (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat Genet* 38: 203-208.
- Zhiwu Zhang, <http://www.nature.com/ng/journal/v42/n4/full/ng.546.html> - a1 Elhan Ersoz, Chao-Qiang Lai, Rory J. Todhunter, Hemant K. Tiwari, Michael A. Gore, Peter J. Bradbury, Jianming Yu, Donna K. Arnett, Jose M. Ordovas & Edward S. Buckler (2010) Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies, *Nature Genetics* 42: 355-360

Annexe 1 - Marqueurs associés au poids spécifique pour les 3 populations sur l'ensemble des lieux et $r^2 p < 0.01$

Chromosome	Marqueur	Distance	HD1-Ca	HD1-Clt	HD1-Mi	HD1-Moy	HD2-Ca	HD2-Mi	HD2-Re	HD2-Moy	RIL-Ca	RIL-Clt	RIL-Mo	RIL-Moy
1A	wPt-731490	0.45						2.25						
	wPt-665724	16.90					2.20							
	wPt-4765	57.42					2.11							
1B	wPt-1911	21.89		2.17										
	wPt-7460	21.89	1.85	2.86		2.55								
	wPt-730718	100.00						2.49		2.20				
1D	wPt-3738	32.07		2.43		2.01								
	wPt-1387	39.51		3.07		2.41								
	wPt-7946	40.00		3.34		2.43								
	wPt-664824	44.48									2.48			2.00
	wPt-0487	44.60								2.28				
	wPt-5320	52.07					1.80					2.01		
	wPt-5503	52.10										2.54		
	wPt-734229	52.70					2.03							
	rPt-4471	53.59										2.27		
	wPt-3743	70.80	2.56	1.97	2.00	2.83								
	wPt-666719	70.87	2.57	1.98		2.73								
wPt-733835	71.35	2.18												
wPt-667287	72.16	2.13	2.17		2.31								1.94	
2A	wPt-733012	17.45											2.12	
	wPt-743211	39.78			2.25									
2B	wPt-4664	37.46									2.82			
	wPt-2425	91.04									3.36			
	wPt-732040	99.13		3.09										
2D	wPt-734106	0.12			2.74									
	wPt-731336	128.81										3.41		
3A	wPt-745076	16.86										3.79		
	wPt-0714	17.07										3.01		2.18
	wPt-6942	40.00									2.87			
	wPt-0286	57.26					1.99							
	wPt-3816	59.17					2.00							
	wPt-1562	60.83					2.06							
	wPt-4725	82.08	2.01											
	wPt-741749	85.00		2.73										
	wPt-4128	94.91									3.33			
	tPt-9901	95.37									3.38			
wPt-1888	106.82							2.78						
3B	wPt-10006	20.88									2.52		2.06	2.32
	wPt-7504	23.84										3.24	4.07	4.37
	wPt-667891	24.00										3.26	2.75	4.36
	wPt-741465	26.72										3.07		2.25
	wPt-10192	29.55											3.15	2.17
	wPt-742172	31.62									2.60			
	wPt-5432	37.78											3.63	
	wPt-733477	44.09									2.79			
	wPt-666139	46.24										2.03		2.49
	wPt-742225	47.12									3.92			
	wPt-742060	47.12									2.96			
	wPt-8915	52.27										2.17		1.94
	wPt-11295	58.58	1.91											
	wPt-5939	58.95					1.96							
	wPt-4364	68.70						1.87						
wPt-731910	69.59						1.91							

Annexe 1 - (suite)

Chromosome	Marqueur	Distance	HD1-Ca	HD1-Clt	HD1-Mi	HD1-Moy	HD2-Ca	HD2-Mi	HD2-Re	HD2-Moy	RIL-Ca	RIL-Clt	RIL-Mo	RIL-Moy
3D	WPI-731416	36.75	1.90			1.91								
	WPI-731378	38.18			1.94									
	WPI-667098	38.23	1.99			2.08								
	WPI-732812	42.15		2.07										
	WPI-671603	42.64							1.89					
	WPI-4045	42.64	1.88											
	WPI-744794	42.82							2.28					
	WPI-742687	42.84								1.97				
	WPI-741419	42.84								2.19				
	WPI-7535	42.97							1.89					
	WPI-669412	43.79							2.32					
WPI-9389	44.46							2.32						
WPI-9662	50.85							2.28						
4A	WPI-3515	47.28									3.17			
	WPI-744256	71.37		2.83										
	WPI-4620	71.49		2.18										
	WPI-4680	71.49		2.25										
	WPI-5172	71.69			1.97									
	WPI-669203	71.96										2.16		
	WPI-2057	72.25									3.20			
	WPI-0447	0.94			1.81									
	WPI-0238	72.34			1.88									
WPI-730913	72.44			2.40										
4B	WPI-4607	47.86									2.46			
	WPI-1046	47.90									2.47			
4D	WPI-0710	20.00	2.34			2.20								
5A	WPI-1712	47.19			1.94									
	WPI-9452	48.01	1.89											
	WPI-9748	61.50			3.93	2.72								
	WPI-3924	79.42												1.90
	WPI-0907	79.42												2.33
	WPI-6495	164.72					2.03	2.03						
	WPI-4203	166.40					3.03							
WPI-6462	166.43					2.67								
WPI-4351	168.81					2.82								
5B	WPI-8157	64.09								2.20				
	WPI-4281	64.48								1.87				
	WPI-6880	68.00					2.24							
	WPI-0935	107.23			1.99									
6A	WPI-666927	2.64		2.23		1.87								
	WPI-9832	3.99												2.21
	WPI-667740	8.62									2.64			
	WPI-0168	15.20							1.87					
	WPI-1060	19.30										1.95		
	WPI-2206	87.23								2.72				1.98
	WPI-672030	94.77						1.86						
	WPI-16189	95.00						2.14						
	WPI-7548	96.00						2.03						
	WPI-731524	98.00	2.53											
WPI-731002	98.00	2.05												
6B	WPI-664276	20.69					2.61							
	WPI-666793	20.92			2.14									
	WPI-1325	31.25										2.63		
	WPI-3207	34.34									2.41			
	WPI-2810	35.00					2.47							
	WPI-1264	36.03			2.35									
	WPI-3045	36.06			1.90									
WPI-7636	0.88			2.16										

Annexe 1 - (suite)

Chromosome	Marqueur	Distance	HD1-Ca	HD1-Clt	HD1-Mi	HD1-Moy	HD2-Ca	HD2-Mi	HD2-Re	HD2-Moy	RIL-Ca	RIL-Clt	RIL-Mo	RIL-Moy
6D	wPt-733130	36.48					2.90		3.36					
	wPt-664682	37.56					2.85		3.37					
	wPt-731887	37.65					2.89		3.37					
7A	wPt-9255	15.80					1.86							
	wPt-6668	16.42										2.30		
	wPt-9207	17.92						2.85						
	wPt-4835	19.68						2.42						
	wPt-6447	20.42						2.25						
	wPt-3002	68.50		1.83										
	wPt-5476	69.20												
	wPt-5524	91.82		2.22	2.68	2.50								
	wPt-671471	92.00		2.17	2.03	2.35								
	wPt-1706	92.00			1.93									
	wPt-671548	93.16		2.49	2.92	2.83								
	wPt-0639	96.58	2.86		3.40	3.01								
	wPt-0494	109.30							1.91					
	wPt-1023	112.00						3.05						
wPt-1259	113.00						3.71		2.37					
7B	wPt-0963	62.52								1.92				
	wPt-5892	114.26	3.29			2.07								
	wPt-7887	116.93	3.40			2.21								
	wPt-5975	117.00	3.30			2.08								
	wPt-8615	119.00					2.21							
7D	wPt-743140	34.60											1.97	
	wPt-743384	34.60											1.96	
	wPt-744124	34.60											1.96	
	wPt-744866	34.60											1.96	
	wPt-745121	34.60											1.96	
	wPt-731493	75.00									2.49			
	wPt-2256	126.26							2.86					
	wPt-4315	140.20							2.53					
wPt-4441	144.03											3.09		

Annexe 2 - Marqueurs associés au Rendement pour les 3 populations sur l'ensemble des lieux et r^2 $p < 0.01$

Chromosome	Marqueur	Distance	HD1-Ca	HD1-Clt	HD1-Mi	HD1-Moy	HD2-Ca	HD2-Mi	HD2-Re	HD2-Moy	RIL-Ca	RIL-Clt	RIL-Mo	RIL-Moy
1A	wPt-0580	48.10							4.12					
	wPt-734216	55.40							3.37	1.93				
	wPt-732546	55.50							3.05					
	wPt-669499	90.11											2.27	
	wPt-5577	106.75									3.78			2.70
	wPt-7049	107.60										2.74		
	wPt-734074	108.44								2.07				
	wPt-5160	108.62								2.16				3.24
	wPt-6005	108.98								1.85				2.62
	wPt-7117	109.05								1.94				3.25
wPt-732616	109.13								1.82				3.14	
wPt-744613	109.44								2.22					
1B	wPt-2988	4.63			2.06									
	wPt-668	5.60			1.95									
	wPt-2395	6.35			1.97									
	wPt-668076	6.35			1.97									
	wPt-1637	24.70				2.06								
	wPt-5313	28.63					2.87							
	wPt-9973	30.20											2.84	
	wPt-3451	35.92			2.81					1.92				
	wPt-3579	46.10										2.98		
	tPt-7980	57.61											4.05	
	wPt-1103	61.66										2.21		
	wPt-4532	71.37							2.11					
wPt-2861	91.24				1.95									
wPt-730718	100.00					2.05								
1D	wPt-1387	39.51		3.56										
	wPt-7946	41.00		2.88										
	wPt-1145	70.82				1.85								
	wPt-732556	76.73					3.33					2.13		3.00
	wPt-6059	79.62				1.92	2.77							3.10
wPt-4711	113.60		3.87		2.20									
2A	wPt-5738	13.19								1.82				
	wPt-4197	15.75												
	wPt-5839	16.71								2.36				
	wPt-8132	17.36									3.14			
	tPt-0228	17.40									3.03			
	wPt-9712	17.64								2.49				
	wPt-8242	17.77								2.81				
	wPt-7175	18.11								2.70				
	wPt-742886	18.59								2.00				
	wPt-6431	18.65								2.06				
	wPt-9104	19.00								2.32				
	wPt-2309	19.13								2.27				
	wPt-3976	20.07								1.94				
	wPt-7626	27.24								2.26				
	wPt-9320	46.31										2.03		
wPt-9793	117.57						1.96							
2B	wPt-9274	8.95			1.94									
	wPt-744022	11.82										2.67		
	tPt-4602	12.50			1.83									
	wPt-5672	53.02		2.62										
	wPt-4125	53.53		2.20										
	wPt-0408	53.74										3.45		
	wPt-8548	64.04										2.92		
	wPt-6174	64.07										3.08		
	wPt-2397	90.84					2.87			2.38				
	wPt-732386	90.84					3.00			2.57				
	wPt-0471	99.15							2.38	2.55				
	wPt-733725	99.72							3.73					
	wPt-2261	102.53											2.15	
	wPt-665550	105.00					2.99			1.88				
wPt-744181	105.00					4.58			3.27					

Annexe 2 - (suite)

Chromosome	Marqueur	Distance	HD1-Ca	HD1-Clt	HD1-Mi	HD1-Moy	HD2-Ca	HD2-Mi	HD2-Re	HD2-Moy	RIL-Ca	RIL-Clt	RIL-Mo	RIL-Moy
2D	wPt-731619	14.21					2.14							
	wPt-666223	18.12									2.80			
	wPt-666518	79.13							1.86					
	wPt-668239	80.33									4.88			
	wPt-732704	94.24					2.92							
3A	wPt-741190	7.07									2.56			
	wPt-0286	57.26		2.76										
	wPt-3816	59.17		2.81										
	wPt-1562	60.83		2.84										
	wPt-2127	62.61					3.08							
	wPt-9761	97.37										3.25		
	wPt-743015	106.31										3.38		
3B	wPt-1888	106.82					1.94	2.24		2.70				
	wPt-9066	23.50						2.05						
	wPt-741465	26.72											3.50	
	wPt-741887	27.00						2.50						
	wPt-3260	30.20									2.65			
	wPt-2510	48.30								2.37				
	wPt-741685	0.23						2.17						
	wPt-0446	67.45											4.40	
	wPt-2904	88.91			2.39	1.9								
	wPt-2491	116.08										2.13		
	wPt-3760	126.39										2.96		
	wPt-7514	126.60	2.12			2.24						2.96		
	wPt-0492	127.41	2.51			3.13								
3D	wPt-0438	128.95						1.88						
	wPt-8983	128.99						1.88						
	wPt-0280	129.42						1.95						
	wPt-3480	42.64			1.96									
	wPt-4991	42.64			1.95									
	wPt-6107	42.64			1.85									
	wPt-731402	42.64	2.76		2.66									
4A	wPt-9525	42.64	1.90											
	wPt-4276	43.48			1.98									
	wPt-8655	43.50			1.80									
	wPt-730913	72.44			2.86									
4D	wPt-6502	0.52			2.05									
	wPt-9675	72.52		2.11										
	wPt-6966	75.71			2.16									
5A	wPt-731627	28.95		3.90		2.12								
	wPt-3924	79.42												
	wPt-742997	83.00										2.50		
	wPt-743708	83.00										2.09		
	tPt-6495	164.72						2.94						
	wPt-4203	166.40					1.90							
5B	wPt-6462	166.43					1.82							
	wPt-4351	168.81					1.91							
	wPt-1302	37.96											2.57	
	wPt-9666	44.55				1.92			2.23					
	wPt-1432	53.39									3.37			
	wPt-5737	61.43									2.89			
	tPt-7755	75.11	2.03											
	wPt-3661	92.74	2.14											
	wPt-7238	99.37										2.15		
	wPt-4577	107.83										2.60	2.87	4.30
wPt-6191	111.61										2.59	2.87	4.15	
wPt-2707	115.61										2.13	2.64	3.77	
wPt-665750	137.07											2.10		
wPt-730009	137.12											2.31		

Annexe 2 - (suite)

Chromosome	Marqueur	Distance	HD1-Ca	HD1-Clt	HD1-Mi	HD1-Moy	HD2-Ca	HD2-Mi	HD2-Re	HD2-Moy	RIL-Ca	RIL-Clt	RIL-Mo	RIL-Moy
6A	wPt-9858	0.00					2.58							
	wPt-6904	8.99	2.66											
	wPt-3524	14.12	1.87											
	tPt-0877	14.76	2.66											
	tPt-2833	14.76	2.99											
	wPt-666574	14.76	1.92											
	wPt-671855	14.76	2.93		2.01									
	wPt-731842	14.76	3.23		2.14									
	wPt-731934	14.76	2.02											
	wPt-8266	16.35				1.91								
	wPt-732062	16.83			2.32	2.21								
	wPt-0168	18.15			2.15									
	wPt-667405	19.17										2.19		
	wPt-730460	20.06												2.00
	wPt-9132	20.34				2.01								
	wPt-733151	25.28						1.84						
wPt-4229	91.41									2.81				
wPt-734140	91.68											2.04		
wPt-666773	92.17			1.96										
wPt-731786	92.48							2.11						
6B	wPt-7642	20.91										2.37		
	wPt-741515	21.03	2.12			2.06			2.52					
	rP16847	22.45	1.81											
	wPt-1241	23.40	2.10			2.38			2.66					
	wPt-5256	24.11	2.11			1.98			2.34					
	wPt-7935	34.73	2.97											
	wPt-2810	34.80							2.33					
	wPt-0419	34.80							2.74					
	wPt-4924	44.32							3.21					
wPt-741804	44.35							3.40						
6D	wPt-7394	12.46	3.79											2.62
	wPt-3350	105.65											2.42	3.05
	wPt-731816	106.57												2.36
	wPt-1814	108.23											2.24	2.52
7A	wPt-6417	18.85					2.17							
	wPt-4637	62.80		2.26										
	wPt-6083	63.35		2.07										
	wPt-2100	63.61		2.02										
	wPt-9555	66.58						1.83						
	wPt-4796	69.48		2.07										
	wPt-6620	100.10												2.38
	wPt-731500	105.85										3.07		
	wPt-4831	106.70												3.19
wPt-7947	109.18						1.85							
7B	wPt-664517	20.53	3.47		1.87	3.31								
	wPt-665112	20.53	3.47		1.87	3.31								
	wPt-671801	22.91	3.71		1.90	3.53								
	wPt-0963	62.52					2.40			1.79				
	wPt-0318	63.00					2.35							
	wPt-9467	70.00					2.47			2.36				
	wPt-5975	117.00								1.89				
	wPt-8615	118.00								2.02	3.16			
	wPt-9992	123.50							2.24					
	wPt-4673	128.00												2.21
	wPt-8989	128.00												2.07
	wPt-3939	135.05	4.67			3.20								
	wPt-665293	139.26	2.22											
wPt-1066	142.36	1.99												
7D	wPt-742840	34.60										2.66		
	wPt-669512	125.70										2.22		
	wPt-664290	126.06										2.07		
	wPt-2258	100										2.14		
	wPt-664391	127.20										2.20		
	wPt-4315	140.20						1.95						

Annexe 3 - Marqueurs associés à l'épiaison pour les 3 populations sur l'ensemble des lieux et $r^2 < 0.01$

Chromosome	Marqueur	Distance	HD1-Ca	HD1-Clt	HD1-Mi	HD1-Moy	HD2-Ca	HD2-Mi	HD2-Re	HD2-Moy	RIL-Ca	RIL-Clt	RIL-Mo	RIL-Moy
1A	wPt-0527	34.30	2.32	2.19		2.12								
	wPt-741297	5.53			2.45									
1B	wPt-0308	13.98											2.81	
	wPt-4325	25.05					2.63	2.63						
	wPt-0170	32.62												
	wPt-4655	32.70					2.27							
	wPt-668027	36.29			2.69									
1D	wPt-0705	44.50										3.09		2.05
	wPt-664824	44.48												
	wPt-0487	44.60					2.16		2.09					
2A	wPt-8854	61.94	2.36											
	wPt-0100	-27.77		2.06	3.25		1.82							
	wPt-4197	15.75										2.38		
	wPt-668033	17.80				2.13								
	wPt-5245	17.84											2.20	
2B	wPt-1657	37.80					1.98							
	wPt-6361	59.39										3.56	3.29	3.82
	wPt-8058	9.98			2.69									
	wPt-8918	11.37			2.01									
	wPt-744022	11.82	2.47	2.98	4.03	2.70								
	wPt-8398	22.00			3.88									
	wPt-8349	36.29	2.31	2.28	2.64	2.39								
	wPt-4664	37.46	2.04	1.98	2.29	2.00								
	wPt-6932	41.83					1.79							
	wPt-1646	83.97											2.38	2.79
	wPt-6643	89.57								1.85				
	wPt-2397	90.84								2.19				
	wPt-732386	90.84								2.16				
	2D	wPt-7004	92.32					3.26	2.23	2.38	1.99			
wPt-8916		92.74										3.81	2.27	3.21
wPt-0471		99.15							2.13					
wPt-665550		0.95					2.62	2.33	3.14					
wPt-744181		0.94							2.80					
wPt-6780		16.16										2.53		
wPt-733227		66.10			3.06									
wPt-667584		69.44			2.99									
wPt-731148		69.61			2.89									
wPt-0298		71.15			2.22									
3A		wPt-666436	94.24		1.88									
	wPt-3812	94.24					2.84	4.88	2.52					
	wPt-732704	94.24							2.17					
	wPt-731865	94.24							1.88					
	wPt-730934	94.24							2.11					
	wPt-729821	94.24							2.11					
	wPt-671742	94.24		1.98										
	IP1-0519	0.42										2.56		
	wPt-745076	16.86										3.29	2.91	3.75
	wPt-2127	62.61							2.12					
3B	wPt-1162	10.55	3.14	2.65	3.58	3.15								
	wPt-2644	31.02			1.91									
	wPt-0302	31.04							2.28	1.97				
	wPt-1191	46.60					2.19		2.05					
	wPt-743395	48.61												1.98
	wPt-4209	66.89										2.20		
3D	wPt-0367	118.36										2.13	2.68	2.98
	wPt-4045	42.64							2.03					
4A	wPt-5857	48.88			2.43									
	wPt-6997	49.71												
	wPt-5124	50.00	2.40	3.53	3.16	3.17								
	wPt-5374	72.08			2.03									
	wPt-4828	72.15						1.90						
4B	wPt-9883	72.24					2.40							
	wPt-6869	0.76								1.96				
5A	wPt-4243	64.00											2.27	
	wPt-5588	47.20											2.15	

Annexe 3 - (suite)

Chromosome	Marqueur	Distance	HD1-Ca	HD1-Clt	HD1-Mi	HD1-Moy	HD2-Ca	HD2-Mi	HD2-Re	HD2-Moy	RIL-Ca	RIL-Clt	RIL-Mo	RIL-Moy
5B	wPt-1784	59.40	3.60	2.26	3.19	3.00								
	wPt-667015	109.10			2.08									
	wPt-0927	109.53			1.87									
	wPt-9858	0.00								2.14				
	wPt-666927	2.64	1.96											
	wPt-669271	3.35	1.96											
	wPt-1742	3.57	1.89											
	wPt-731250	15.40					1.97							
	wPt-8266	16.40								1.83				
	wPt-9890	16.54					2.45	3.09	2.32					
	wPt-2573	18.35					1.83	2.20	2.12					
	wPt-730631	18.40						1.91						
	wPt-9132	20.34		2.43	2.26	2.26								
wPt-5696	91.47											2.00		
wPt-732370	101.17								1.96					
6B	tPt-4887	20.55								2.56				
	wPt-666793	20.92	2.22		2.07									
	wPt-729979	22.62	1.99											
	wPt-743974	25.01					2.39							
	tPt-3506	25.54								2.40				
	wPt-8721	33.16						1.98						
	wPt-9784	33.39	2.66		2.34	2.73								
	wPt-3733	33.50	2.63		2.46	2.56								
	wPt-9952	35.96		2.08	2.40									
	wPt-1264	36.03					2.18	2.14						
	wPt-3045	36.06					2.18	2.14						
	wPt-8493	40.83			1.95									
	wPt-743099	41.06					3.79	2.56	2.75					
7A	wPt-6417	18.85								1.90				
	wPt-1080	60.03	1.85											
	wPt-1706	92.00						1.85						
	wPt-3425	96.03	1.93											
	wPt-1533	143.08					2.14							
	wPt-2565	5.45											2.05	
	wPt-8211	19.87	2.46		2.88	2.16								
	wPt-6498	64.96							2.79					
	wPt-9467	70.00								2.50				
	wPt-9925	96.55							1.88	1.97				
	wPt-742351	97.00			2.20									
	wPt-731357	97.00			1.87									
	wPt-3093	126.86		1.98	2.03									
wPt-4743	142.44					2.01								
wPt-800258	1.00					1.93								
7D	wPt-733859	31.25											2.15	
	wPt-744148	32.07		2.67										
	wPt-5765	33.49					2.29							
	wPt-6833	33.55					3.34							
	tPt-6015	33.55					3.15							
	rPt7959	33.55					3.27							
	tPt-2440	33.55					3.46							
	wPt-744784	34.05		2.47									2.14	
	wPt-663820	34.75											2.04	
	wPt-663918	34.75											2.08	
	wPt-733104	34.75											2.34	
	wPt-743698	34.75											2.13	
	wPt-743749	34.75											2.15	
	wPt-744889	34.75											2.24	
	wPt-745067	37.99											1.96	
wPt-731493	75.00										4.02	4.23	4.41	
wPt-800147	128.00	4.17	2.66	4.89	3.23									
wPt-666097	141.07	2.20			2.13									

Compréhension du rapport "Ténacité/ Extensibilité" et du volume du pain

Gérard BRANLARD*¹, Benoît MELEARD², Francois-Xavier OURY¹, Larbi RHAZI³, Nelly BOINOT⁴, les membres du Club5⁵ et du CETAC⁶

* Coordinateur : Gérard BRANLARD, branlard@clermont.inra.fr - 04 73 62 43 16

1 - INRA UMR 1095 GDEC - UBP, 63039 Clermont-Ferrand, Cedex 03

2 - ARVALIS - Institut du Végétal, 91720 Boigneville

3 - Institut Polytechnique - La salle Beauvais, 60 000 Beauvais

4 - Chopin Technologies - 92390 Villeneuve la Garenne

5 - Club5 - 83 av. Grande Armée, 75782 Paris Cedex 16

6 - CETAC - 7 rue Coq Héron, 75030 Paris Cedex 01

La mise en place d'un essai multi local sur deux années comprenant 67 cultivars judicieusement retenus pour leurs caractéristiques rhéologiques et leur aptitude boulangère a permis, après analyse de la composition des grains, des farines et de leurs propriétés technologiques d'apporter des éléments de réponses aux objectifs fixés.

- 1 - le rapport P/L est fortement influencé positivement par la dureté, le poids spécifique, les pentosanes, plusieurs allèles des gluténines HPM et FPM ainsi que par l'indice de polydispersité des polymères de gluténine et négativement par la teneur en protéines et plusieurs allèles des gluténines associés à l'extensibilité de la pâte.
- 2 - le volume du pain a augmenté avec la teneur en protéines, la dureté de l'albumen et lorsque le gluten était formé de sous unités gluténines connues pour être non associées à la force.
- 3 - Les polymères des gluténines furent très fortement influencés par les températures des mois de juin et juillet du lieu de culture.
- 4 - l'effet sur le P/L des variations des caractéristiques des polymères est opposé selon que les températures élevées se situent en juin ou en juillet.
- 5 - Le volume du pain fut négativement influencé par la taille des polymères.
- 6 - L'indice du gluten notamment ainsi que plusieurs allèles des gluténines peuvent être avantageusement utilisés pour approcher la prédiction du volume du pain qui reste cependant un paramètre peu héritable.
- 7 - La mise au point d'un protocole adapté du Mixolab par la société Chopin a permis d'exploiter les potentialités de ce nouvel instrument pour prédire les caractéristiques rhéologiques de la farine et avec une probabilité satisfaisante pour le volume du pain. La note totale en panification possède de nombreux autres paramètres qui n'ont pu que partiellement être clarifiés par cette expérimentation et nécessiteront une étude complémentaire.

1. Introduction

► Les objectifs

Les caractéristiques des blés fréquemment sélectionnés en Europe et spécialement en France font souvent apparaître une insuffisance d'extensibilité de la pâte, telle que mesurée à l'alvéographe. Ces blés ont généralement une pâte très tenace, il en résulte un déséquilibre du rapport P/L souvent

préjudiciable à une transformation satisfaisante en panification. On sait que la diversité des protéines de réserve ajoutée à la teneur en protéines et la dureté du grain permet d'expliquer près de 70 de la variabilité phénotypique de la force, mais est très insuffisante pour expliquer le volume du pain (Oury *et al*, 2010). Peu de travaux ont été conduits sur la recherche de marqueurs moléculaires (autres que ceux codant pour les protéines de réserve) associés au volume du pain (Law *et al*, 2005, Kuchel *et al*, 2006). Le volume du pain résulte de nombreux facteurs qu'il est nécessaire de préciser notamment en regardant les effets des allèles des protéines de réserve et de leur polymérisation. Les insuffisances d'extensibilité et le faible volume du pain sont deux défauts qui, s'ils sont présents dans un même cultivar, conduisent à son rejet lors de l'inscription au Catalogue. Les recherches ont été entreprises pour mieux cerner dans les constituants du grain et les propriétés de la farine, les variables qu'il convient de prendre en compte pour effectuer une sélection. Les objectifs ont été les suivants :

- 1 - approfondissement des bases biochimiques et moléculaires caractéristiques des blés à gluten extensible,
- 2 - approfondissement des caractéristiques biochimiques et technologiques des blés à pâte extensible,
- 3 - recherche des QTL impliqués dans la distribution des tailles de granules d'amidon,
- 4 - prédiction du volume du pain.

2. Matériel et Méthodes

L'étude a été conduite à partir de 40 génotypes par année. Les critères de choix de ces cultivars ont été :

- 1 - avoir une bonne productivité,
- 2 - appartenir à la classe des BP et BPS, seuls quelques BAU et BB ont été retenus,
- 3 - ne pas être de dureté extrême (très soft ou très hard),
- 4 - présenter entre eux de fortes différences d'aptitudes boulangères (en particulier sur le volume du pain) et de P/L.

Les blés retenus et présentés Tableau 1, ont été expérimentés en essais randomisés (deux répétitions en mode conventionnel et protection phytosanitaire) dans cinq lieux en France. Trois lieux (1 Club5, 1 CETAC et 1 INRA) ont été retenus, par année, après récolte sur la base des observations en végétation et de variables (protéines, dureté, PS, PMG, Hagberg).

Les mesures suivantes ont été effectuées :

Par l'Inra de Clermont Ferrand :

Diversité génétique des gluténines de haut et faible poids moléculaire (Branlard *et al*, 2003)

Caractéristiques physiques : PMG (AFNOR NF V 03-702) ; PS (mesure au Nilema) ; Mesure % protéines et dureté du grain par spectrométrie dans le proche infrarouge : Méthodes respectivement AACC 39-10 et AACC 39-70A.

Viscosité des pentosanes (mesure de la viscosité AFNOR NF V 03-749) ; Temps de chute d'Hagberg (AFNOR NF V 03-703), Extraction des granules d'amidon selon Bancel *et al*, (2010) et détermination des proportions des types A, B et C, à l'aide du granulomètre laser Malvern Mastersizer 2000 E (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK)

Préparation des moutures complètes au moulin laboratory mill 3100 (Perten Instruments, Springfield, USA) pour Momont, Arvalis, l'IPL Beauvais.

L'analyse par HPLC des sucres solubles dans l'éthanol (Méthode Inra Clermont Fd)

Par la SARL Adrien Momont et Fils :

Extraction et mesure des caractéristiques du gluten au glutomatic (Perten Instruments, Springfield, USA)

Arvalis-Institut du végétal :

Teneur en protéines et dureté des grains par spectrométrie dans le proche infrarouge ,

Détermination des fractions protéiques par HPLC d'exclusion de taille,

Année 1: 2008 2009						Année 2: 2009 2010					
Obt	Variété	P/L	dur	das	volume	Obt	Variété	P/L	dur	das	volume
1	CS SOLLARIO	très élevé	MH	BPS	moyen	CS SOLLARIO	très élevé	MH	BPS	moyen	
2	Ra CAPHORN	élevé - elast.	MH	BPS	bon	Ra CAPHORN	élevé - elast.	MH	BPS	bon	
3	Un EXCELSIOR	élevé	MH	BPS	moyen	Os SOBBEL	assez élevé	MH	BP	Ass. Bon	
4	Ra AREZZO	élevé	MH	BP	moyen	Os SOBALD	équilibré	MS	BP	moyen	
5	Mh ANDALOU	élevé	MH	BP	faible	Ld ALBIANO	élevé	MH	BPS	moyen	
6	Ra PREMIO	assez élevé	MH	BPS	moyen	Ld ROCHEFORT	élevé	hard	BP	Ass. Bon	
7	Un COMODOR	assez élevé	MH	BPS	bon	Mh KALYSTAR	équilibré	hard	BPS	bon	
8	Mh SOLBHO	assez élevé	MH	BPS	moyen	Mh PROXY	élevé	MH	BP	moyen	
9	Su TIMBER	assez élevé	MH	BPS	moyen	Su TIMBER	assez élevé	MH	BPS	moyen	
10	Un DINOSOR	équilibré	hard	BPS	moyen	Un DINOSOR	équilibré	hard	BPS	moyen	
11	Sc CAMPERO	équilibré	MH	BPS	bon	Ra ADAGIO	élevé	hard	BPS	Ass. Bon	
12	Mh SELEKT	équilibré	MH	BPS	bon	Ra RAZZANO	élevé	hard	BPS	moyen	
13	LvH APACHE	équilibré	MH	BPS	bon	LvH APACHE	équilibré	MH	BPS	bon	
14	Ld AEROBIC	équilibré	MH	BPS	bon	Ld AEROBIC	équilibré	MH	BPS	bon	
15	Os SORRIAL	équilibré	MH	BPS	bon	Sc FLAUBERT	assez élevé	hard	BPS	bon	
16	Su HYSTAR	bas à exten.	MS	BP	faible	Sc PREVERT	assez élevé	hard	BPS	moyen	
17	Ra SANKARA	bas	hard	BPS	moyen	Ra SANKARA	bas	hard	BPS	moyen	
18	Ra MENDEL	bas	MH	BPS	bon	Su CHEVRON	élevé	MH	BAU	moyen	
19	Ra HEKTO	bas	MH	BP	bon	Su TIMING	assez élevé	hard	BP	Ass. Bon	
20	Su BOISSEAU	bas à exten.	MH	BP	moyen	Su MIROIR	équilibré	soft	BP	faible	
21	Mh GALIBIER	bas à exten.	MH	BAF	faible	Un AMADOR	long	MS	BPS	moyen	
22	Un SPONSOR	bas	soft	BP	faible	Un ALIGATOR	élevé	MH	BPS	très bon	
23	Sc PALEDOR	bas	soft	BB	faible	Un TRAPEZ	élevé	MH	BP	moyen	
24	Sc GALOPAIN	bas à exten.	MS	BPS	faible	Sc GALOPAIN	bas à exten.	MS	BPS	bon	
25	LvH ARLEQUIN	bas à exten.	MH	BPS	bon	LvH ATTITUDE	élevé	MH	BPS	bon	
26	LvH ALIXAN	moy- élevé	MH	BPS	bon	LvH ARAMIS	moyen	hard	BP	bon	
27	LvH ALTIGO	moyen	MH	BP	moyen	LvH ALTIGO	moyen	MH	BP	moyen	
28	SR SEBASTO	assez élevé	MH	A	bon	SR GONCOURT	assez élevé	hard	BPS	bon à T.B	
29	SR PEPIDOR	équilibré	MS	BP	moyen	SR PEPIDOR	équilibré	MS	BP	moyen	
30	SR BOREGAR	équilibré	MS	BP	Ass. Bon	SR AZZERTI	faible	MS	BAU	faible	
31	FD BERMUDE	assez élevé	MH	BPS	bon	FD FD 06012-9	assez élevé	MH		bon	
32	FD ALDRIC	équilibré	MH	BPS	bon	FD ALDRIC	équilibré	MH	BPS	bon	
33	FD BOKARO	bas à exten.	MS	BPS	moyen	FD FD 06074	élevé	MH		bon à T.B	
34	SY COB-INGENIO	tenace	Hard	BPS	Ass. Bon	SY PLAYER	tenace	hard	BP	faible	
35	SY INSTINCT	bas à exten.	MH	BPS	moyen	SY ILLICO	bas	MH	BP	faible	
36	SY INNOV	bas à exten.	MS	BB	bon	SY INNOV	bas à exten.	MS	BB	bon à T.B	
37	INRA SKERZZO	équilibré	MH	BPS	bon	INRA CF05079	tenace	hard		bon	
38	INRA GHAYTA	équilibré	Hard	BAF	bon	INRA LYRIC	tenace	MH	BP	bon	
39	INRA HENDRIX	équilibré	Hard	BPS	faible	INRA RED6134	équilibré	soft		bon	
40	INRA KORELJ	assez élevé	hard	BPS	faible	INRA KORELJ	assez élevé	hard	BPS	faible	

Tableau 1 : Quelques caractéristiques des variétés expérimentées les deux années en 10 lieux en France

Réalisation des farines (CD1 auto) et sur ces farines réalisation de : l'Alvéographe Chopin (NF EN ISO 27971), l'analyse du comportement rhéologique en double contrainte de pétrissage et de chauffe au Mixolab Chopin, la Panification BIPEA (NF V 03-716).

Par l'Institut Polytechnique La salle Beauvais :

Extraction des protéines et détermination de la distribution de la taille et de la masse des polymères par AFFFF-MALLS (Lemelin *et al*, 2005a).

Par Chopin technologies :

Prédiction du comportement rhéologique à l'Alvéographe et en panification à l'aide du Mixolab selon un protocole rapide mis au point par la société, sur deux types de produits (farine préparée par Arvalis, et mouture intégrale préparée par Chopin).

Les mesures réalisées avec les 14 tests de technologies ont fournis 120 paramètres ou variables de technologie. Les analyses statistiques (ANOVA, héritabilité, corrélation) ont été réalisées avec chacun de ces paramètres. L'approche des caractères d'intérêt - pour l'alvéographe ténacité **P**, extensibilité **L** ou gonflement **G** et **P/L** et pour la panification **volume du pain** - a été conduite par des régressions multiples par lieu et par régression PLS en prenant l'ensemble des données sur les deux années avec un échantillonnage aléatoire de 50% des génotypes pour validation.

3. Résultats

► La variabilité technologique fut fortement influencée par le milieu et les génotypes

Les 40 variétés cultivées chaque année avaient été choisies sur la base de leurs aptitudes technologiques : absence de « very soft » et de « very hard » (soft 12%, MHard 46% et Hard 42%), ayant un P/L très bas <0.3 à P/L >3 et un volume du pain allant de très faible <1200 à >1800 cm³. Seulement 13 variétés sont communes aux deux années d'expérimentation. Les 67

variétés présentent une diversité allélique, des sous-unités de haut et de faible poids moléculaires des gluténines, très élevée. Au total 28 allèles ont été dénombrés aux six loci des gluténines (Tableau 2) sur ces 67 génotypes, dont 90% ont été proposés par les 11 établissements privés de sélection participant à cette étude.

<i>Glu-A1</i>	1, 2*, n	3
<i>Glu-B1</i>	6-8, 7, 7-8, 7-9, 13-16, 14-15, 6.1-22, 17-18,	8
<i>Glu-D1</i>	2-12, 3-12, 4-12, 5-10,	4
<i>Glu-A3</i>	a, d, ef,	3
<i>Glu-B3</i>	b, b', c, c', d, f, g, j,	8
<i>Glu-D3</i>	b, c, b/lc	2

Tableau 2 : La diversité des allèles des gluténines HPM et FPM des blés analysés se retrouvent dans la majorité des blés mondiaux

Les caractéristiques des grains et des farines ont été mesurées à l'aide de 14 tests apportant au total 120 variables physicochimiques et technologiques mesurées sur les 240 échantillons des deux années de récolte. Les valeurs phénotypiques observées révèlent une très grande variation pour la totalité des paramètres ; par exemple: %protéines de 9,0 à 14,9, gluten index de 8,9 à 99,5, W de 64 à 400, ténacité P de 33 à 156, gonflement G de 14,1 à 31,1 P/L de 0,22 à 3,68, volume du pain de 1024 à 1941. Les mesures sur la plupart des paramètres ont été significativement influencées par les lieux et l'année de l'essai mais aussi par les génotypes (Tableau 3).

Les effets génétiques sont généralement très hautement significatifs pour les paramètres usuels PMG, PS, dureté, Hagberg, Gluten, viscosité des pentosanes, Alvéographe, ainsi que pour le Mixolab. La distribution des tailles de granules d'amidon est aussi fortement influencée par le génotype. Les effets lieux (inclus avec l'année de culture) sont généralement très marqués pour les mêmes paramètres sur lesquels des effets génétiques ont été constatés. Les effets lieux ne sont pas significatifs pour de nombreuses notes effectuées en panification.

Paramètres	Moyenne	Minimum	Maximum	F _{Lieu} année	F _{Variété}	R ²	H ²
PMG	47.7	36.4	64.9	115.9***	17.4***	88.1	0.67-0.82
PS	79.5	73.4	83.9	62.4***	11.6***	82.1	0.34-0.66
Tps chute	371	188	452	17.1***	6.3***	67.5	0.35-0.67
Dureté	55.9	0.9	112.8	102.6***	28.1***	91.6	0.75-0.89
%Protéines	11.5	9.0	14.9	453.1***	7.32***	90.8	0.21-0.44
Gluten Index	80.4	8.9	99.5	81.3***	4.84**	72.3	0.38-0.54
Amidon Type A	81.3	70.3	93.3	12.3***	7.2***	69.6	0.58-0.66
Visco. Réelle	2.00	1.35	3.18	69.2***	21.4***	89	0.78-0.83
AFFFF Mw2	1.4E+07	5.4E+06	4.9E+07	34.4***	6.2***	70	0.17
W	203.0	64.0	400.0	120.2***	10.1***	83.7	0.40-0.73
G	20.1	14.1	31.1	242.4***	18.5***	90.9	0.54-0.66
P	77.1	33.0	156.0	88.4***	20.6***	89	0.75-0.80
P/L	1.11	0.22	3.68	57.4***	14.2***	84.5	0.60-0.77
volume Pain	1551	1024	1941	20.7***	3.1**	50.8	0.24-0.44
note totale Panif	246	124	281	6.3***	2.6*	38.90	0.20-0.47
HPLC%F2	23.8	17.9	27.4	5.8**	12.8***	80.3	0.71-0.90
Mixolab C2	0.53	0.40	0.67	26.4***	11.2***	79.6	0.73-0.86
Mixolab Rapid C2	0.92	0.58	2.41	2.7*	4.1**	51.9	0.69

Tableau 3 : Statistiques descriptives sur les 240 échantillons de blés, F_{Lieu}, F_{Variété} et R² du modèle de l'ANOVA, et héritabilité H² pour seulement 18 paramètres étudiés dont le P/L et le volume du pain.

Les paramètres de ténacité, d'extensibilité et de volume du pain sont tous fortement influencés par le génotype et le milieu. L'estimation de la part du génotype dans la variance phénotypique a été calculée, en supposant une répartition aléatoire des cultivars, à l'aide de la procédure Varcomp de SAS. L'héritabilité au sens large H^2 nous permet d'approcher l'influence que peut avoir la sélection en utilisant l'un ou l'autre de ces paramètres. Comme attendu très peu de paramètres révèlent une héritabilité forte ($H^2 > 0.7$). Ceux bien connus comme le PMG, la dureté, la viscosité des pentosanes, la ténacité P, mais apparaît aussi le P/L. Nous observons aussi une forte héritabilité pour le paramètre %F2 obtenu dans la séparation des protéines par HPLC et le C2 du Mixolab. Plusieurs des mesures effectuées se sont révélées comme reflétant bien l'effet génétique indiqué par l'ANOVA et confirmé par une héritabilité relativement élevée (0.5 à 0.69). Ce fut le cas des granules d'amidon A et B, du C3 du Mixolab, du gonflement G, de la fraction HPLC %F1 et la note de pâte en panification. La majorité des autres notes en panification répondent peu à une influence génétique et les valeurs obtenues sont souvent faiblement héritables. Notre analyse confirme une fois de plus que le volume du pain est un caractère peu héritable ainsi que les notes d'extensibilité en panification. Par contre les notes d'allongement et de section en panification semblent mieux refléter l'influence génétique.

Les comparaisons multiples entre variétés ont été effectuées par année et pour les deux années d'expérimentation. Les deux rapports, de l'année 1 et 2, ont présenté ces comparaisons multiples pour une trentaine de paramètres et bien évidemment pour le P, G, P/L et le volume du pain. Nous nous limiterons à ne donner ici que les variétés observées dans les groupes extrêmes, obtenus sur les valeurs moyennes dans les deux années, et classées par ordre croissant.

Pour l'alvéographe :

- $W < 150 \times 10^{-4} J$: Sponsor (W=103), Paledor, Innov, Hystar, Trapez, Boisseau, Pepidor, Chevron et Timber (W=148).
- $W > 250 \times 10^{-4} J$: Caphorn (W=267) CF05079, Aerobic, Hendrix, Excelsior, Skerzzo, CCB Ingenio, Ghayta, Galibier (W=349).
- $P < 60 mmH_2O$: Sponsor (P=43), Innov, Sobald, Paledor, Azzerti, Sankara, Boisseau, Hystar, RE06134, Pepidor, Bokaro, Aramis et Miroir (P=59).

- $P > 100 mmH_2O$: Caphorn (P=102), Arezzo, Adagio, Sollario, Illico, Proxy, Razzano, Galibier, Koreli, Ghayta, CF05079, Player (P=121).
- $G < 16$: Sollario (G=13,2), Proxy, Player, Chevron, Andalou, Razzano, Trapez, Rochefort, Premio, Koreli (G=15,7).
- $G > 22$: RE06134 (G=22,1), Boisseau, Aerobic, Innov, Azzerti, Hekto, Sobald, CCB-Ingenio, Apache, Sankara, Instinct, Skerzzo (G=26,3).
- $P/L < 0.7$: Sobald (P/L=0,45), Innov, Azzerti, Sankara, RE06134, Instinct, Aramis, Apache, Sponsor, Boisseau, Hekto, Skerzzo (P/L=0,65).
- $P/L > 2$: Trapez (P/L= 2,01), Attitude, Rochefort, FD06074, CF05079, Chevron, Lyric, Koreli, Razzano, Sollario, Proxy, Player (P/L=3,5).

Pour la panification :

- **Volume < 1400 mL** : Andalou (V=1284), Sobald, Proxy, Razzano, Azzerti, Miroir, Adagio (V=1397).
- **Volume > 1600 mL** : Sorrial (V=1604), Innov, Aerobic, Hekto, Aliogator, RE06134, Mendel, Comodor, FD06074, Sebasto, Ghayta, Caphorn, Exelcior, Bermude, Selett, Campero (V=1819).

► Principaux facteurs impliqués dans la variation du P, du G, du P/L et du volume

L'analyse de l'ensemble des données technologiques produites à partir des 240 échantillons de blés incluant l'identification des allèles des gluténines à la mesure des masses de polymères fait ressortir plusieurs points importants concernant les paramètres associés (positivement ou négativement) aux caractéristiques de ténacité, d'extensibilité de la pâte, de P/L et de volume du pain.

La ténacité P augmente avec la dureté du grain, le PS, la viscosité relative des pentosanes, mais peu avec la teneur en protéines. La mesure alvéographique étant conduite à hydratation constante, il apparaît logique que les deux variables diminuant la disponibilité de l'eau dans la pâte, - c'est-à-dire le pourcentage d'amidon endommagé pour la dureté et la viscosité des arabinoxylanes (molécules très hydrophiles) - ressortent comme associées à la ténacité. On constate également, dans les différentes analyses PLS effectuées, que la mesure du Gluten Index et aussi plusieurs variables du Mixolab permettent de bien approcher la ténacité P.

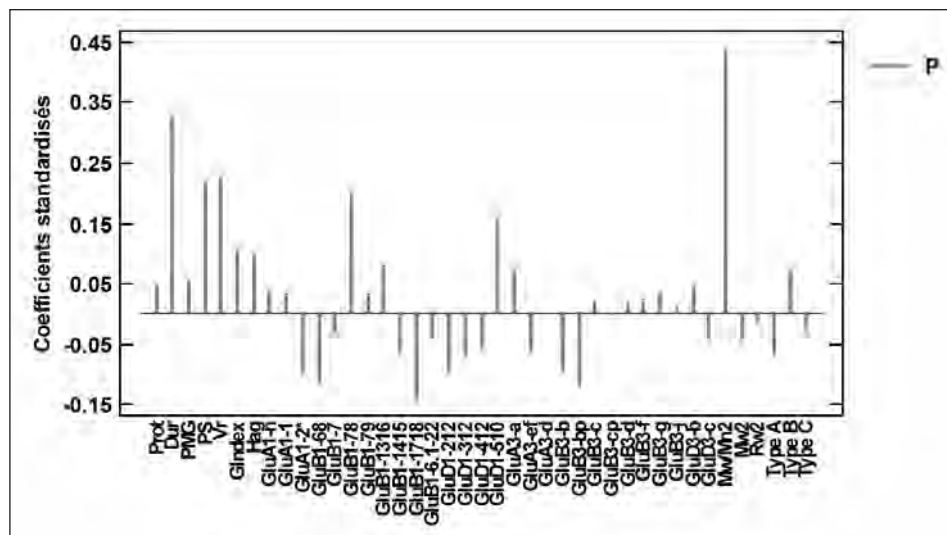


Figure 1 : Coefficients standardisés obtenus dans l'analyse de régression PLS de la ténacité P avec comme variables explicatives le %protéine du grain, la dureté, le PMG, le PS, la viscosité relative des pentosanes, le gluten index, le temps de chute d'Hagberg, les 28 allèles des gluténines HPM et FPM, trois paramètres des polymères des gluténines et la proportion des trois types de granules d'amidon. Le pourcentage de la variation phénotypique P expliquée par le modèle est $R^2=0,75$.

La ténacité est aussi significativement influencée par plusieurs allèles des gluténines HPM et FPM. Les sous unités *Glu-B1* 7-8, et *Glu-D1* 5-10 et l'allèle *Glu-A3a* sont associés à une ténacité élevée. Les sous unités *Glu-A1* 2*, *Glu-B1* 14-15, et 17-18, *Glu-D1* 2-12 et 3-12 et les allèles *Glu-B3b* et b' sont associés à une plus faible ténacité. Mais nous constatons surtout l'effet majeur de l'indice de polydispersité des polymères des gluténines Mw/Mn2 dans l'accroissement de la ténacité.

Le **Gonflement G** ou **Extensibilité L** augmente avec la teneur en protéines ; ce résultat est bien connu mais nous observons ici que la teneur en protéines est le paramètre le plus influant sur la variation de l'extensibilité. Seuls quelques sous unités des gluténines sont favorables : *Glu-A12**, *Glu-B1* 14-15, et 17-18, *Glu-D1* 2-12 et les allèles *Glu-B3b* et b' et *Glu-D3c*. Les sous unités favorables à la ténacité P (*Glu-B1* 7-8, et *Glu-D1* 5-10) sont logiquement défavorables à l'extensibilité. Les valeurs élevées de PS, de viscosité des pentosanes et dans une moindre mesure du temps de chute Hagberg semblent s'opposer à une forte extensibilité. Comme attendu, les valeurs élevées de ténacité ainsi que du Gluten Index influent négativement le G ou L. De même on relève qu'un faible indice Mw/Mn2 des protéines polymérisées est favorable à l'extensibilité (Figure 2). Contrairement à ce qui fut observé pour la ténacité, la proportion des granules d'amidon de type A ($\sigma > 15$ microns), B ($2 < \sigma < 15$) et C ($\sigma < 2$ microns) ne semble pas influencer l'extensibilité de la pâte. Or on sait que la dureté du grain influe de manière significative sur le

volume total représenté par ces trois classes de granules : les blés de la classe « hard » ont des granules d'amidon de type A occupant un volume moins important et sont par contre mieux pourvus en granules de type B contrairement aux blés de type Soft . L'abondance relative des granules d'amidon et la granulométrie des particules de la farine, également associée à la dureté, ont une influence sur les propriétés d'écoulement et de viscosité de la pâte. On relève que c'est principalement la ténacité, et non l'extensibilité, qui est influencée par la dureté et ces proportions de granules d'amidon.

Le **P/L équilibré** (voisin de 0,7) est plus facilement obtenu avec une teneur en protéines relativement élevée plus favorable à l'extensibilité. Nous constatons aussi que des valeurs pas trop élevées pour le PS, la viscosité des pentosanes, ainsi qu'une dureté de type Soft et MHard, sont favorables à un P/L équilibré. En fait les valeurs élevées pour ces trois paramètres atténuent la part d'eau disponible pour l'hydratation du réseau glutineux en piégeant au cours du pétrissage une partie de l'eau apportée pour la mesure alvéographique conduite à hydratation constante. De plus les allèles des gluténines associés à l'extensibilité, dont les effets favorables ont été notés dès 2001, sont toujours validés dans cette expérimentation. Un P/L équilibré est plus facilement obtenu avec les sous unités *Glu-A12**, *Glu-B1* 14-15, ou 17-18, *Glu-D1* 2-12 et les allèles *Glu-B3b* ou b' et un indice de polydispersité des polymères faible qu'avec les sous unités *Glu-B1* 7-8, et *Glu-D1* 5-10 et un indice Mw/Mn2 élevé (Figure 3).

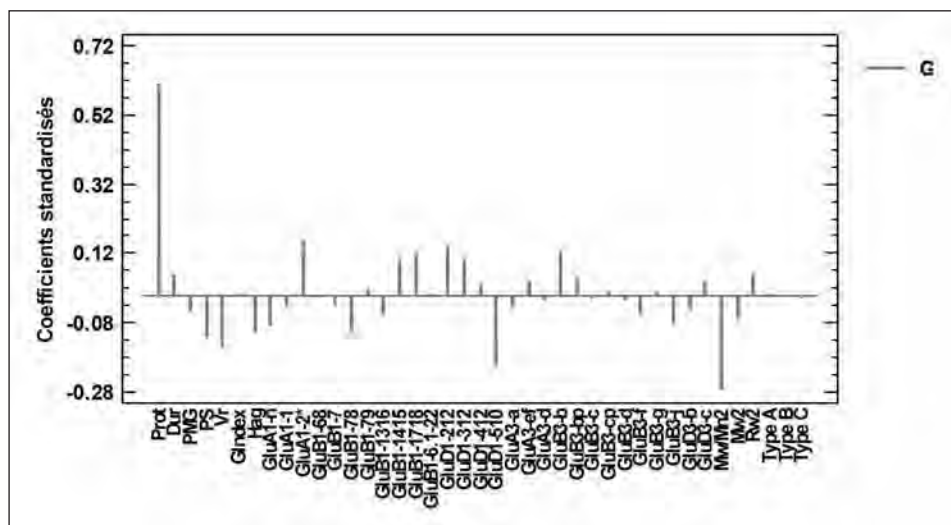


Figure 2 : Coefficients standardisés obtenus dans l'analyse de régression PLS du gonflement G en utilisant les mêmes variables explicatives que pour la ténacité (Figure 1). Le pourcentage de la variation phénotypique G expliquée par le modèle est $R^2=0,79$.

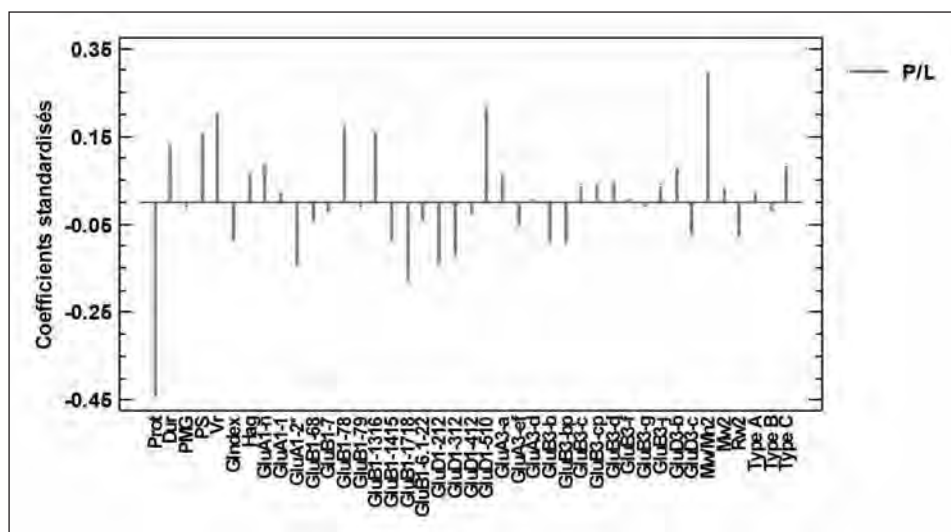


Figure 3 : Coefficients standardisés obtenus dans l'analyse de régression PLS du P/L en utilisant les mêmes variables explicatives que pour la ténacité et le gonflement G (Figure 1 et 2). Le pourcentage de la variation phénotypique P/L expliquée par le modèle est $R^2=0,58$.

Le P/L est ici moins bien approché par la régression PLS que ne le sont les paramètres P et G ou L. Ceci tient au fait qu'il s'agit d'un rapport dont les deux variables sont elles mêmes incomplètement expliquées et de plus on sait qu'un même ratio peut être obtenu par une multitude de valeurs possibles. L'usage du Mixolab (en particulier les paramètres C2, C3 et C5 avec la mesure de la teneur en protéine et la dureté) permettent d'approcher les valeurs du P/L.

Le Volume du pain est fortement associé à une teneur en protéines élevée (premier facteur explicatif suivi par la viscosité des pentosanes). La contribution du gluten est, pour le Volume, bien représentée par le Gluten Index sinon par la fraction %F1 obtenue avec la séparation HPLC. On relève aussi que le Mixolab possède plusieurs variables (C1, C3 et C4) permettant d'approcher le Volume. Une étude des potentialités offertes par le Mixolab, notamment sur le Volume du pain, est rapportée au chapitre 4, ci-dessous. L'analyse des corrélations sur chacun des différents lieux entre le Volume du pain et les variables rhéologiques fait souvent ressortir, parmi celles-ci, l'extensibilité comme étant associée au Volume. Mais les corrélations bien que très hautement significatives n'excèdent pas une valeur de $R^2=0.30$. On constate en effet qu'une pâte ayant un P/L équilibré (voisin de 0,7) est préférable. Une ténacité élevée n'est pas associée à un fort Volume du pain. Et l'analyse des effets des allèles des gluténines HPM et FPM confirme cette observation. On note en effet que les sous unités *Glu-B1* 7-8, et *Glu-D1* 5-10 et l'allèle *Glu-A3a*, bien connus pour être favorables à la ténacité, ont ici un effet négatif sur le Volume du pain. La présence des sous unités *Glu-D1* 2-12, et l'allèle *Glu-A3d* sont favorables au Volume. Mais de façon inattendue on observe que les sous unités des gluténines très négativement associés à la force *Glu-B3* 6-8 ou 7, les allèles *Glu-A3ef* et *Glu-B3j* (translocation 1BL/1Rs) ressortent favorables au Volume (Figure 4). Ces observations sont à rapprocher de l'analyse des polymères des gluténines qui nous révèle que la masse Mw2 et le rayon Rw2 des polymères s'opposent à un Volume du pain élevé. Les mesures obtenues sur la masse des polymères ont donné des valeurs maximales jusqu'alors insoupçonnées, Tableau 3.

Ces constatations nous ont amené à rechercher les facteurs impliqués dans la variation des caractéristiques des polymères. Ces analyses nous ont offert des possibilités supplémentaires d'approfondir les causes de variations du Volume du pain.

► Autres facteurs associés aux caractéristiques des polymères et au volume du pain

L'action de la température

L'étude des facteurs impliqués dans les variations des caractéristiques dimensionnelles des polymères a clairement montré la forte influence environnementale du lieu de culture. L'étude du protéome du grain en formation fait clairement ressortir une incidence des températures élevées sur l'accumulation des protéines de réserve (Majoul-Haddad *et al*, 2013). Nous avons donc analysé les sommes des températures quotidiennes pour les mois de juin et juillet relevées dans les stations les plus proches des 6 lieux où les blés ont été expérimentés. Nous constatons un effet très hautement significatif de la somme des températures (ST) de chacun des mois, Juin (STJn) et Juillet (STJt), ainsi que de la somme totale (STJJ) de ces deux mois sur les trois paramètres Mw2, Mw2/Mn2 et Rw2. Plus la somme des températures de ces deux mois STJJ est élevée plus la masse des polymères augmente. Mais une somme des températures en juin (STJn) forte, diminue Mw2, Mw/Mn2 et Rw2, alors qu'une somme élevée des températures en Juillet (STJt) les augmente.

Les coefficients standardisés, dans l'analyse PLS, sont les plus élevés pour STJn et STJt par rapport à l'ensemble des autres coefficients analysés ci-dessus, au paragraphe 2, pour la ténacité P. Ce paramètre est négativement influencé par STJn et positivement influencé par STJt. L'extensibilité ou le gonflement G est favorablement influencée par des fortes températures en Juin (STJn) et négativement par celles de Juillet (Figure 5).

Une approche protéomique de la synthèse des protéines de blés isogéniques Hard/Soft peut nous donner des éléments de compréhension du phénomène observé ci-dessus (Lesage *et al* 2011, 2012a). On constate en effet que l'absence de puroindoline A, (allèle *Pina-D1b*) associé à la dureté du grain, est accompagnée d'un stress biochimique au niveau du réticulum endoplasmique induisant vraisemblablement une aberration de polymérisation et une augmentation de la taille des polymères. L'analyse de gènes *Pina* et *Pinb*, codant les puroindolines des 67 blés de notre expérimentation, nous montre que les blés Hard ne sont pas dépourvus de la puroindoline A mais possèdent cette classe de dureté par des variants alléliques de *Pinb*.

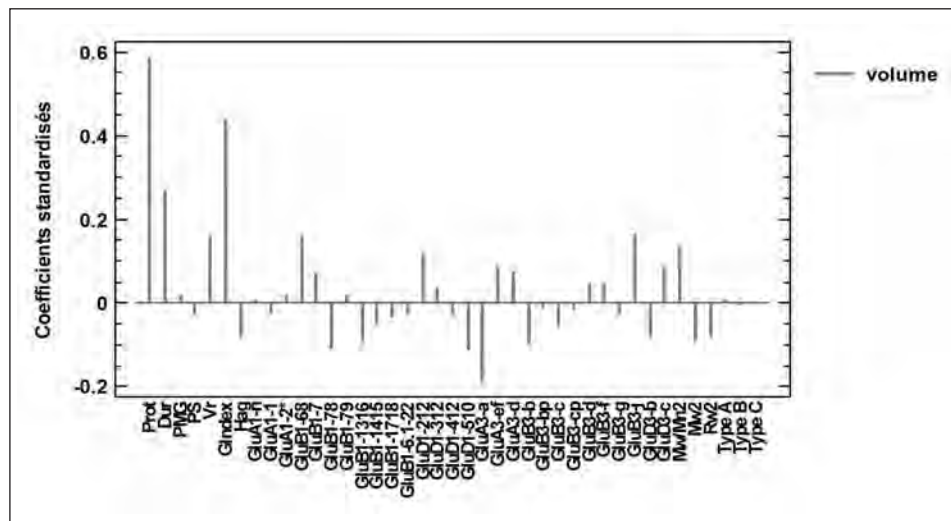


Figure 4 : Coefficients standardisés obtenus dans l'analyse de régression PLS du Volume du pain en utilisant les mêmes variables explicatives que pour la ténacité et le gonflement G (Figure 1 et 2). Le pourcentage de la variation phénotypique Volume du pain expliquée par le modèle est $R^2=0,53$.

Nous avons observé que l'effet de la somme des températures de ces deux mois a induit une augmentation significativement plus élevée de la masse des polymères Mw2 pour les Soft que pour les Hard (Lesage *et al*, 2012b). Ainsi les blés Hard ont montré sur les 6 lieux d'expérimentation une augmentation de masse de polymères allant en moyenne de 9 à 21 106 Da alors qu'elle variait de 13 à 32 106 Da pour les Soft.

Pour comprendre cet ensemble rappelons que, malgré les différences de précocité entre cultivars, l'accumulation des protéines dans le grain se produit en presque totalité au cours du mois de juin en France. Une température élevée au cours de ce mois (au delà de 32 °C l'accumulation des gluténines est fortement ralentie au profit des gliadines), causera donc une diminution de la masse des polymères Mw2, de l'indice Mw/Mn2, de la ténacité et aussi une augmentation de l'extensibilité : ce que nous observons. L'analyse protéomique nous indique aujourd'hui qu'il y aurait dans l'albumen des Hard un arrêt plus précoce de l'accumulation des réserves protéiques (et peut être amylicée ?) par rapport aux Soft, en réponse au stress thermique. Les blés de type Soft poursuivent l'accumulation des protéines qui atteignent des masses considérables. Les températures très élevées de Juillet n'affectent pas ou vraisemblablement peu la synthèse des protéines de réserve qui est bien avancée fin juin. Les températures élevées de juillet vont donc précipiter la déshydratation du grain et révèlent une ténacité plus forte en raison de la masse des polymères qui augmenta, notablement chez les blés Soft.

La difficulté d'approcher le Volume du pain (R^2 du modèle : 0,53, Figure 4) tient d'abord au fait que ce paramètre majeur de la panification est peu héritable ($H^2 < 0,45$). On peut donc espérer tout au plus que les effets additifs des variables de type mendélien, (allèles des protéines de réserve), qui expliquent ici 18% de la variabilité phénotypique du Volume du pain, puissent contribuer à expliquer 40% de la variance génétique de ce caractère. On sait en effet que d'autres locus sur le génome (par exemple QTL sur 2A et 3A, Kutcher *et al*, 2006) ont été associés, par l'analyse de descendances, au volume de pain (panification sur 100g de farine). Nous avons vu que la teneur en protéines du grain, la dureté, le poids spécifique les pentosanes ainsi que le Gluten Index expliquaient près de 31% de la variance phénotypique du Volume.

Contribution possible des sucres simples

En plus de l'effet des allèles des protéines de réserve et de la taille des polymères, il est apparu souhaitable d'examiner la variabilité des sucres simples. L'analyse des sucres simples par HPLC conduite à l'Inra de Clermont Fd sur les 120 échantillons de la première année d'expérimentation nous a apporté d'utiles compléments d'information. Bien qu'en faible concentration dans les blés analysés, (généralement <1 mg/g MS sauf pour le saccharose allant de 0,7 à 4.2 mg/g MS), leur variation a été très significativement influencée par le lieu de culture (en 2009 dans les départements 28, 60 et 78) et par les variétés expérimentées. Sur les huit sucres dosés, l'analyse PLS met en évidence un effet favorable de l'Inositol ($C_6H_{12}O_6$) et un effet négatif des teneurs en fructose et saccharose sur le Volume du pain. En intégrant ces mesures des sucres le modèle explique 64% de la variance phénotypique du Volume du pain. Il est en effet bien connu que la disponibilité de certains sucres simples comme l'activité de plusieurs hydrolases influence la fermentation et le gonflement du pain.

Mais le Volume n'est qu'un paramètre de la Note Totale en panification qui fit aussi l'objet de recherches. Pour un lieu donné la Note Totale en panification est toujours significativement associée au Volume du pain, mais la relation n'excède pas $R^2=0,45$. D'autres notations réalisées au cours du test de panification permettent de préciser les facteurs impliqués dans leur variation. Bien que ces notations soient peu liées aux différences variétales, les données accumulées constituent une base de phénotypage particulièrement importante pour, ultérieurement, en faire apparaître les causes moléculaires puis génétiques.

► Prédiction du comportement rhéologique à l'Alvéographe et en panification à l'aide du Mixolab selon un protocole rapide

Pour les semenciers, il est important de connaître les propriétés des blés le plus tôt possible dans le processus de sélection des nouvelles variétés. Dans le cadre de ce programme FSOV, CHOPIN Technologies a développé une méthode rapide utilisant le Mixolab pour répondre à cet objectif. Le Mixolab est un appareil permettant d'analyser le comportement rhéologique d'une pâte soumise à des contraintes de pétrissage et de variation de la température.

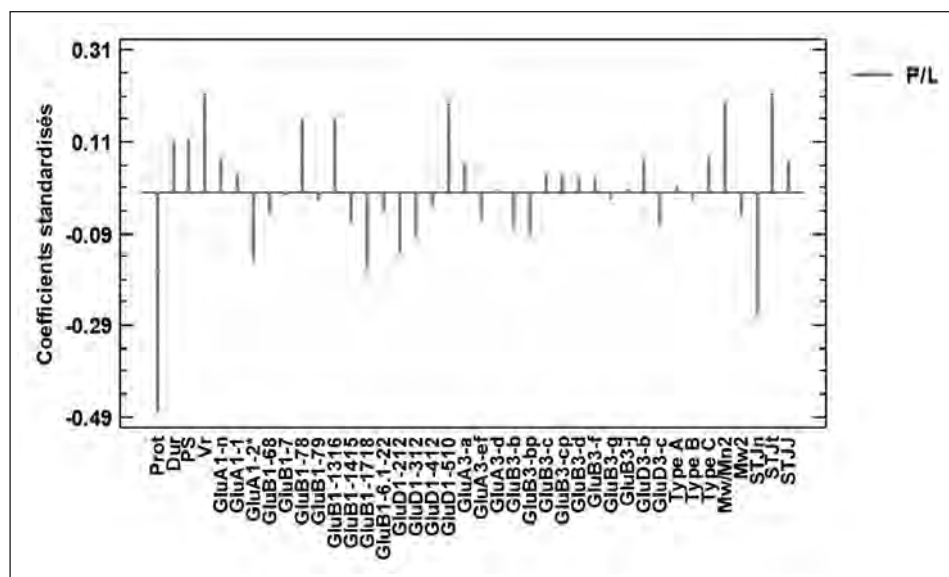


Figure 5 : Coefficients standardisés obtenus dans l'analyse de régression PLS du P/L en utilisant les variables explicatives suivantes : le %protéine du grain, la dureté, le PS, la viscosité relative des pentosanes, les 28 allèles des gluténines HPM et FPM, la proportion des trois types de granules d'amidon ainsi que les sommes des températures moyennes de juin et de juillet et la somme totale sur ces deux mois. Le pourcentage de la variation phénotypique du P/L expliquée par le modèle est $R^2=0.65$

Les informations issues de cette analyse sur pâte réelle permettent de prédire les paramètres alvéographiques et de panification. L'objectif de cette étude est de déterminer des modèles de prédiction pour ces paramètres avec un protocole rapide et une quantité de blé la plus faible possible.

Au total 270 échantillons de blés, provenant de différents lieux de cultures et de 3 années de récoltes (2009 à 2011) ont été broyés et analysés au Mixolab grâce à un protocole FSOV de 20 min et 50 g de blé broyé. Ces blés, référencés par Arvalis Institut du Végétal, couvrent une large gamme de valeurs alvéographiques et de panification. 240 échantillons ont été utilisés pour développer les modèles de prédiction de l'Alvéographe (W, P, G P/L) et de la panification (volume, hydratation, notes de panification). Les 30 échantillons supplémentaires, produits en 2011, ont permis de valider les modèles ainsi obtenus. L'étude mathématique de la courbe obtenue avec le Mixolab (Figure 6), permet de mettre en place des équations de régression multi-paramètres pour calculer les valeurs alvéographiques et de panification des échantillons testés. Pour chaque paramètre, les résultats sont présentés dans les Tableaux 4 et 5. Concernant les paramètres de l'Alvéographe, entre 64 et 72% des échantillons de validation sont prédits dans les limites de l'incertitude de la méthode de référence. Pour les paramètres de panification, entre 70 et 100% des échantillons sont prédits dans les limites de l'incertitude de la méthode de référence (Tableau 5).

	W	G	P	PsL	
Nombre prédicteurs	11	11	11	11	
Etendue des valeurs de référence	72 - 366	11,4 - 30,4	41 - 128	0,26 - 2,89	
Ecart prédiction/ref (valeur absolue)	Max	63,22	6,02	34,6	1,16
	Moyen	22,88	1,96	11,02	0,36
	Median	22,53	1,6	8,2	0,27
% prédiction dans les limites d'incertitudes de la méthode	66%	72%	70%	64%	
Limites d'incertitudes de la méthode	± 15%	± 2,5	± 19%	± 35%	
Tolérance pour obtenir 80% de bonnes prédictions	± 20%	± 3	± 24%	± 42%	

Tableau 4 : Synthèse des résultats obtenus pour les prédictions alvéographiques

En intégrant les données de dureté et de teneur en protéines (obtenues grâce à un spectrophotomètre proche Infra-rouge), dans les prédicteurs des modèles de l'Alvéographe, ou en utilisant une matrice de farine blanche, les performances des modèles sont améliorées (augmentation du pourcentage de prédiction dans les limites de l'incertitude de la méthode, diminution des écarts entre valeurs de référence et prédiction).

En résumé, la prédiction des paramètres alvéographiques et de panification par une méthode alternative en 20 min à partir de blé broyé (50 g au maximum) au Mixolab est possible. Pour des résultats encore plus performants, l'utilisation des valeurs de dureté et teneur en protéines ou de farine blanche peut être envisagée.

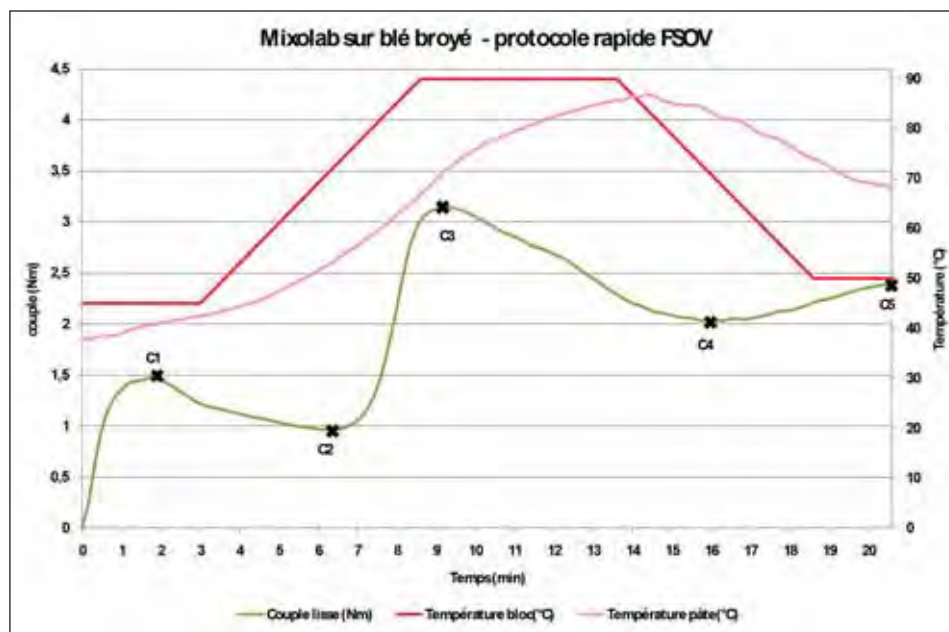


Figure 6 : Courbe Mixolab - protocole FSOV (20 min et 50g blé broyé)

	Volume	Hydratation	Note de pâte	Note de mise	Note de pain	Note totale	
Nombre prédicteurs	11	11	11	11	11	11	
Etendue des valeurs de référence	1155-1826	56,6 - 63	48 - 97	82 - 100	12 - 87	142 - 261	
Ecart prédiction/ref (valeur absolue)	Max	270	3,11	30,04	9,35	47,9	74,6
	Moyen	87,28	0,92	8,58	3,82	14,27	22,7
	Median	54,07	0,71	5,83	3,44	12,06	14
% prédiction dans les limites d'incertitudes de la méthode	93,30%	96,50%	88%	100%	70%	73,50%	
Limites d'incertitudes de la méthode	± 226	± 2,7	± 17,2	± 11,2	± 18,6	± 31,4	
Tolérance pour obtenir 80% de bonnes prédictions	± 170 cm ³	± 1,5	± 14	± 6	± 20	± 35	

Tableau 5 : synthèse des résultats obtenus pour les prédictions de panification.

► Quelques résultats sur la proportion des granules d'amidon

L'amidon représentant environ 65 à 72% de la masse du grain, il était nécessaire d'examiner l'influence de la proportion en volume des granules d'amidon de type A, B et C sur les paramètres P/L et Volume du pain mais aussi d'aborder leur déterminisme génétique. Les proportions des granules de type A et B ont présenté pour chacune des deux années une bonne héritabilité (H^2 voisin de 0.6) tandis que les granules de type C se sont révélées peu héritables ($H^2=0.4$). Une part de ces variations résulte de l'influence de la dureté qui, lorsque l'albumen est Hard, diminue le volume occupé par les A et augmente la proportion des B. Mais d'autres gènes sont impliqués dans la variation de ces proportions. L'analyse de génétique quantitative nous a permis de déceler des meta-QTL (QTL communs à plusieurs populations) pour les différents types de granules phénotypés sur les populations Renan x Recital et Apache x Ornicar. Les QTL identifiés sont localisés sur les chromosomes 1A et 2A (granules de type C), 3B (granules de type A et B) et 6B (granule de type B). Ces résultats qui seront précisés viennent en complément d'une analyse de la descendance (Syntetic x Opata), très éloignée des blés cultivés, qui avait révélé un QTL majeur sur 7As pour les granules de type B (Igrejas *et al*, 2002). La variation de ces proportions n'a pas influencé l'extensibilité de la pâte ni le Volume du pain. Mais les proportions de ces granules répondent à l'influence de la dureté et leur effet semble se révéler aussi sur la ténacité.

4. Conclusion

La variabilité génétique des cultivars et les essais réalisés ont fournis une large variation des caractères P/L et Volume du pain. Ces deux caractères sont très faiblement liés, mais plusieurs variables facilement mesurables et/ou très héritables sont désormais à privilégier pour améliorer la valeur en panification. Pour mieux maîtriser la ténacité, l'extensibilité et le P/L, les paramètres de Teneur en Protéines, Dureté (MHard), Poids Spécifique sont à considérer. Les allèles des gluténines associés à l'extensibilité sont à privilégier.

Le Volume du pain est un caractère peu héritable. Cependant en plus des paramètres précédents il est souhaitable pour améliorer le volume :

- 1 - de prendre en compte la viscosité relative des pentosanes (qui peut avantageusement être augmentée)
- 2 - d'exclure les allèles associés à une plus forte ténacité (et notamment *Glu-A3a*).

Cette étude a fait apparaître les caractéristiques des polymères des gluténines comme fortement influencées par la température au cours de l'accumulation des réserves dans le grain. Ces polymères sont à prendre en considération dans l'analyse du comportement en panification. Une variabilité génétique existe, notamment pour leurs caractéristiques dimensionnelles qu'il conviendra d'explorer si l'on veut obtenir une meilleure stabilité de la valeur d'utilisation.

Enfin le test du Mixolab offre, notamment par le protocole rapide mis au point dans cette étude, de réelles possibilités d'approcher en sélection la valeur phénotypique du volume du pain.

Références bibliographiques

AACC, Chemists. 1995 Approved method of the AACC. Saint Paul, MN USA American Association of Cereal Chemists, Approved methods of the AACC, ninth ed. (1995) The American Association of Cereal Chemistry, St Paul, MN

Bancel E., Rogniaux H., Debiton C., Chambon C., Branlard G. (2010). Extraction and proteome analysis of starch granule-associated proteins in mature wheat kernel (*Triticum aestivum* L.). Journal of Proteome Research 9, 3299-3310.

Branlard G., Dardevet M., Amiour N., Igrejas G. (2003) Allelic diversity of HMW and LMW glutenin subunits and omega-gliadins in French bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Genetic Resources and Crop Evolution, 50, 669-679.

Igrejas G., Faucher B., Bertrand D., Guilbert D., Leroy P., Branlard G. (2002) Genetic analysis of the size of endosperm starch granules in a mapped segregating wheat population. J Cereal Sci., 2002; 35: 103-107.

Kuchel H., Langridge P., Mosionek L., Williams K., Jefferies S.P. (2006) The genetic control of milling yield, dough rheology and baking quality of wheat. Theor Appl Genet. 112(8). p.1487 - 1495.

Law C.N., Bhandari D.G., Salmon S.E., Greenwell P.W., Foot I.M., Cauvain S.P., Sayers E.J., Worland A.J. Novel genes on chromosome 3A influencing breadmaking quality in wheat, including a new gene for loaf volume, Lvl 1. J. Cereal Sci.: 41(3) 317-326.

Lemelin E., Branlard G., Salvo L., Lein V., Aussenac T., Daydé J. (2005b) Breadmaking stability of wheat flours : Relation between mixing properties and molecular weight distribution of polymeric glutenins. J. Cereal Sci. 42(3), 317-326.

Lemelin E., Aussenac T., Violleau F., Salvo L., Lein V. (2005a) Impact of Cultivar and Environment on Size Characteristics of Wheat Proteins Using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation and Multi-Angle Laser Light Scattering. Cereal Chem 82, 28-33.

Lesage V.S., Bouchet B., Rhazi L., Elmorjani K., Branlard G., Marion D. (2011) New insight into puroindoline function inferred from their subcellular localization in developing hard and soft near-isogenic endosperm and their relationship with polymer size of storage proteins. J Cereal Sci. 53, 231-238.

Lesage V.S., Merlino M., Chambon C., Bouchet B., Marion D., Branlard G. (2012a) Major impacts of kernel hardness on protein folding, oxidative stress and developmental time in developing wheat grain of near-isogenic lines for kernel texture. J Exp Botany, 63(2), 1001-1011.

Lesage V.S., Rhazi L., Aussenac T., Meleard B., Branlard G. (2012b) Effects of HMW- & LMW-glutenins and grain hardness on size of gluten polymers. 11th International Wheat Gluten Workshop, Beijing 12-15 august 2012, In press.

Majoul-Haddad T., Bancel E., Martre P., Triboui E., Branlard G. (2013) Effect of short heat shocks applied during grain development on wheat (*Triticum aestivum* L.) grain proteome. J Cereal Sci. In press

Oury F.-X., Chiron H., Faye A., Gardet O., Giraud A., Heumez E., Rolland B., Rousset M., Trottet M., Charmet G., Branlard G. (2010) The prediction of bread wheat quality: joint use of the phenotypic information brought by technological tests and the genetic information brought by HMW and LMW glutenin subunits. Euphytica, 171. 87-109.

Évaluation de variétés tolérantes à la sécheresse par la signature de la composition isotopique du carbone photosynthétique de la feuille et du grain

Jean-Charles DESWARTE¹, Iñaki GARCIA de CORTAZAR-ATAURI², France CASSIGNOL³, Sylvie DUTRIEZ⁴, Philippe GATE⁵, Pascal GIRAUDEAU⁶, Christine GIROUSSE⁷, Patrice SENELLART⁸, Jayne STRAGLIATI⁹, Stephen SUNDERWIRTH¹⁰, Guillaume TCHERKEZ¹¹, David GOUACHE*¹

* Coordinateur : Gérard BRANLARD, branlard@clermont.inra.fr - 04 73 62 43 16

1 - Arvalis-Institut du végétal - Pôle Ecophysiologie. La Minière, 78280 Guyancourt

2 - INRA - Unité Agroclim, Domaine St Paul Site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9

3 - UFS - 17 rue du Louvre 75001 Paris

4 - Caussade Semences - ZI de Meaux, BP 109, 82303 Caussade Cedex

5 - Arvalis - Institut du végétal - Direction scientifique. 3, Rue Joseph et Marie Hackin 75116 Paris

6 - Secobra - Centre de Bois-Henry, 78580 Maule

7 - INRA - Unité de Recherche sur l'Ecosystème Prairial, 234 Avenue du Brezet, 63100 Clermont-Ferrand

8 - Syngenta Seeds - Ferme de Moyencourt, 78910 Orgerus

9 - Limagrain - 5 rue de l'Egalité, 28130 Chartrainvilliers

10 - Adrien Momont & fils SARL - Station de recherche - RN 154, 28150 Allonnes

11 - Institut de Biologie des Plantes - Université Paris Sud - CNRS - UMR 8618 Bâtiment 630 F-91405 Orsay

1. Introduction

► Contexte climatique

Le blé tendre en France est cultivé sur tous types de sol, y compris des sols superficiels à faibles réserves en eau, qui occupent une surface importante de la sole totale (de l'ordre de 25%). Il ne s'agit pas d'une culture irriguée : seules 5% des surfaces en blé tendre font l'objet d'irrigation (Arvalis Institut du végétal, 2012). Par ailleurs, face à une disponibilité plus faible des ressources, une demande de plus en plus forte des irrigants et des opérateurs politiques émerge : produire durablement avec une ressource en eau qui devient limitée. En moyenne, le blé perd entre 1,5 et 2 quintaux par hectare à chaque fois que le déficit hydrique s'accroît de 10 mm (Gate, 1995).

Les prévisions de changement climatique à venir sont incertaines quant à leur amplitude, mais toutes convergent vers une élévation de la température (particulièrement en été), et par conséquent de l'ETP. Les scénarii de précipitations tendent vers une plus grande variabilité, sans tendance globale claire. On peut donc imaginer que les contextes de production de céréales à pailles en France à échéance de 2050-2100 seront plus stressants (stress thermique en priorité, et également stress hydrique). La précocification du cycle associée au réchauffement climatique ne permettra qu'un échappement partiel au stress (Bancal and Gate, 2010), et l'effet à long terme de l'élévation du CO₂ reste sujet à controverse (Long *et al.*, 2006).

► Tolérance à la sécheresse

La tolérance au stress hydrique est un sujet fortement exploré dans le cadre de recherches académiques (Ludlow and Muchow, 1990; Turner, 1997; Bacon, 2004; Blum, 2005; Passioura, 2005; Richards, 2006; Morison *et al.*, 2008); néanmoins, derrière le terme générique de « tolérance à la sécheresse », des notions assez différentes cohabitent mais ne répondent pas forcément à des comportements

intéressants en production agricole. Compte-tenu de notre champ d'étude : la production de blé tendre en plein champ (irrigué ou non), nous nous restreindrons à la définition suivante : l'aptitude d'une culture à maintenir un rendement élevé malgré l'absence de pluie (ou d'irrigation) (Blum, 2006). A ceci, on pourra également rajouter l'objectif suivant : maintenir un potentiel élevé en l'absence de stress hydrique. En effet, la particularité des pédo-climats français est de présenter une forte variabilité des scénarii de stress hydrique, avec des sécheresses précoces suivies de conditions favorables (2011), de déficits hydriques de fin de cycle (2006, 2010), ou d'absence de stress hydrique (2012).

L'une des méthodes les plus mises en avant est l'utilisation de la discrimination isotopique du carbone (DIC ou $\Delta^{13}C$) photosynthétique comme révélateur intégratif de l'efficacité intrinsèque de l'eau chez les végétaux en C3 (Farquhar and Richards, 1984) ; il permet de qualifier les végétaux pour leur comportement « économe » (ou efficient) ou « opportuniste » en eau. Il a déjà été démontré que ce caractère d'efficacité intrinsèque de l'eau présente une variabilité génétique significative dans de nombreuses espèces (Hubick *et al.*, 1986; Hall *et al.*, 1992; Ismail and Hall, 1992; Ehleringer *et al.*, 1993; Specht *et al.*, 2001), et qu'il est héréditaire et issu d'un déterminisme génétique complexe. De plus, des corrélations significatives entre le DIC et le rendement ont été mises en évidence, mais avec des directions contraires selon le contexte environnemental.

Des gains de productivité significatifs ont été obtenus avec des variétés de blé tendre sélectionnées notamment pour ce critère (variétés Rees et Drysdale, variétés à $\delta^{13}C$ élevée, c'est-à-dire à efficacité de l'eau élevée)(Rebetzke *et al.*, 2002; Condon *et al.*, 2004), dans des milieux à stress hydrique marqué et terminal. L'explication physiologique sous-jacente réside dans une approche conservatrice du stock d'eau : une restriction précoce de la consommation permet de maintenir une alimentation hydrique courant remplissage suffisamment satisfaisante pour permettre une mise en place et un remplissage correct des grains. Ces résultats sont difficilement

transposables dans des milieux à plus haut potentiel ou européens, y compris dans le pourtour méditerranéen, compte-tenu de scénarii de stress hydriques différents et d'un éventuel recours à de l'irrigation d'appoint (Richards *et al.*, 2002; Blum, 2005; Richards, 2005).

Si le DIC est indicateur de l'efficacité intrinsèque de l'eau, il ne révèle cependant pas le mécanisme sous-jacent qui amène à une modification du ratio : soit un changement de la conductance stomatique, soit une altération de l'assimilation du carbone, soit les deux simultanément (Scheidtger *et al.*, 2000). Par ailleurs, il se focalise sur le fonctionnement de la source de photosynthétats ; il ne renseigne pas sur des éventuelles limitations au niveau du puits formé par les grains post-floraison.

Les études concernant la réponse de croissance des grains à une sécheresse sont peu nombreuses et il est difficile de les comparer entre elles car les modalités d'application et de contrôle (mesure de l'intensité) de la sécheresse sont souvent peu explicitées. Par ailleurs, les effets d'une sécheresse sont également liés à l'humidité et la température de l'air ambiant, conditions peu renseignées dans ces mêmes études. De manière générale, une sécheresse « modérée à sévère » provoque des diminutions de rendement en grains liée à une diminution de la masse sèche finale des grains. Il semble que la durée de remplissage des grains soit affectée prioritairement par rapport à la vitesse de remplissage des grains. Dans ce cas, une sénescence précoce du couvert pourrait expliquer la diminution de remplissage des grains. Les mécanismes à l'échelle du grain individuel impliqués dans cette diminution de masse finale n'ont fait à notre connaissance l'objet que de peu d'études et relativement anciennes (Wardlaw, 1971; Nicolas *et al.*, 1984, 1985). En particulier, cette dernière étude a montré qu'un déficit hydrique modéré de 6 jours pouvait entraîner une diminution du nombre de cellules dans l'albumen et une légère diminution de la taille des cellules, réduisant ainsi la force de puits des grains pour l'accumulation ultérieure des réserves.

► **Élévation de température et excès thermiques**

Les prévisions liées au changement climatique font état d'une hausse progressive des températures moyennes annuelles, ainsi que d'une fréquence accrue de températures extrêmes ponctuelles. Les températures élevées conduisent simultanément à une augmentation de la vitesse de remplissage des grains et à une forte baisse de la durée calendaire de ce remplissage. Ce phénomène semble ne pas être lié seulement à une baisse de la disponibilité des assimilats, et est dépendant de la variété. L'effet de choc thermique (exposition temporaire à des températures extrêmes, $T_{max} > 35^{\circ}\text{C}$) est peu renseigné dans la bibliographie ; seuls quelques travaux australiens (Nicolas *et al.*, 1984, 1985; Stone and Nicolas, 1995) indiquent des effets contrastés selon la période d'apparition de ces accidents thermiques, avec une sensibilité maximale au cours de la phase de multiplication cellulaire qui succède à la fécondation : une baisse du nombre de cellules de l'albumen affecterait la taille potentielle des grains et donc la force du puits d'assimilats, et au final le rendement.

► **Recours à la modélisation**

Les modèles de culture permettent de simuler des états de croissance et de développement de couverts sous diverses

conditions environnementales. Il est possible de les utiliser pour prédire l'impact potentiel de différents caractères candidats (Semenov *et al.*, 2009), voire même les conséquences à l'échelle de la plante et de la culture de la sélection pour un gène spécifique (Chapman *et al.*, 2003; Tardieu, 2003). La force des modèles est également de prédire dans quel(s) contexte(s) un caractère sera favorable, sans nécessiter un recours systématique et à grande échelle de dispositifs d'expérimentation. Enfin, il est également possible, grâce à cette approche, de se projeter dans un climat fictif non encore avéré sur le terrain, tel que dans l'hypothèse d'un changement climatique global, sous réserve que ces nouvelles conditions ne sortent pas des conditions de validité du modèle.

Le modèle de culture STICS (Simulateur multidisciplinaire pour les Cultures Standard) (Brisson *et al.*, 1998) a été développé pour permettre de simuler les écosystèmes agraires, tant sous un angle de quantité et de qualité de la production agricole (rendement, teneurs en protéines) qu'au travers d'indicateurs environnementaux (balance azotée du sol, bilan hydrique). En configuration d'origine, le modèle présente une faible efficacité de prédiction (< 0.5) pour les variables Rendement grain, INN, nombre de grains/m² et C/N du grain, alors que la fiabilité du modèle est bonne pour la biomasse totale (efficacité de 0.81) et moyenne pour la quantité d'azote présente dans la plante. Ce modèle ne permet donc pas une description fine de l'élaboration du rendement à travers les différents composantes (nombre d'épis, fertilité épi, PMG), paramètres potentiellement cruciaux pour la définition d'un idéotype variétal et la simulation de stress abiotiques variés.

► **Objectifs de l'étude**

L'objectif global du projet était d'apporter des éléments de compréhension des réponses des cultures aux stress abiotiques -stress hydrique en priorité- et d'investiguer la faisabilité d'une modélisation fine de ces stress abiotiques sur l'élaboration du rendement.

L'analyse du stress hydrique a été abordée à l'échelle du couvert d'une part, en testant dans les conditions de cultures françaises un indicateur de typologie d'utilisation de l'eau : la discrimination isotopique du carbone, et à l'échelle du grain en conditions contrôlées, en monitorant la croissance des grains courant remplissage. Les effets de stress thermiques ponctuels ont également été évalués à l'échelle du grain, en conditions semi-contrôlées.

Des tests sur la fiabilité et la flexibilité d'un modèle de culture ont été réalisés ; l'objectif est de vérifier la faisabilité de simulations des scénarii de stress et d'évaluation des effets de caractères introduits dans des idéotypes.

2. Matériel et Méthodes

► **Évaluation de la tolérance à la sécheresse**

Un réseau d'essais de plein champ dits CSVS (pour Caractérisation de la Sensibilité Variétale à la Sécheresse) a été mis en place et suivi au cours des campagnes 2005-2006 à 2009-2010, dans des milieux variés. Des modalités d'irrigation permettant d'induire des niveaux de stress différenciés en intensité et en période d'apparition ont été mises en place. Plusieurs variétés de blé tendre et de blé dur, de précocité à épiaison comparable, ont été semées

dans chaque essai (voir Tableau 1).

Les mesures effectuées systématiquement sur ces essais sont les composantes de rendement (rendement à 15%, PMG, nombre d'épis) et la détermination de la composition $\delta^{13}\text{C}$ sur les grains à la récolte (analyse réalisée à l'Institut de Biologie des Plantes, Orsay), sur un échantillon moyen par traitement. Par ailleurs, d'autres mesures de $\delta^{13}\text{C}$ ont été réalisées sur des échantillons de limbes prélevés à floraison et courant remplissage sur certaines modalités. Par abus de langage, la valeur $\delta^{13}\text{C}$ (composition isotopique) a été préférée à $\Delta^{13}\text{C}$ (discrimination isotopique) pour faciliter le raisonnement : $\Delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{13}\text{C}$ sont linéairement (et négativement) corrélés, mais $\delta^{13}\text{C}$ est positivement corrélé à l'efficacité intrinsèque de l'eau (Farquhar *et al.*, 1989).

Des bilans hydriques détaillés (Brochet and Gerbier, 1974; Jacquart and Choissnel, 1995) ont été réalisés pour chaque traitement de chaque essai afin de déterminer la période d'occurrence et l'intensité du stress hydrique. Ainsi, chaque modalité a pu être caractérisée par un niveau de déficit hydrique (ETM-ETR) sur les périodes Epi 1 cm - Floraison et Floraison - Maturité. Le profil d'épuisement de la réserve en eau du sol a également été déterminé, mais n'a pas été analysé. Les essais ne présentant pas de déficit hydrique ou touchés par d'autres facteurs limitants n'ont pas été inclus dans l'analyse (à l'exception de l'essai du Magneraud 2008-2009, où une nette carence en azote a été constatée à la floraison). Les variétés trop peu représentées dans le réseau d'essais (<3 essais) ont également été écartées.

Le site du Magneraud étant équipé de sondes à neutrons et de tunnels mobiles protégeant les parcelles, il a été possible de déterminer plus finement l'efficacité de l'eau des cultures.

Le Tableau 1 résume les essais retenus pour l'analyse.

Année de récolte	Site	Modalités d'irrigation	Variétés implantées
2006	Aix-Vallabre (13)	T1, T2, T3, T4	Cez, Ac, Cl, Ne
2006	Boigneville (91)	T1, T3, T4	Ap, Cez, Hy, So
2006	Etoile-sur-Rhône (26)	T1, T4, T9	So
2006	Gréoux (04)	T1, T3, T4	Cez, Ac, Cl, Ne
2006	St Gilles (30)	T1, T4, T6, T7	Cez, Ac, Ne, Cl
2007	St Gilles (30)	T1, T4, T5, T6	Hy, Ne, Cl
2007	Ouzouer-le-Marché (41)	T1, T2, T3, T4	Hy, Ap, Cez, So
2007	Lyon St Exupéry (69)	T1, T4	Hy, Ap, Cez, So, Bi
2007	Etoile sur Rhône (26)	T1, T2, T3, T4	Hy, Ap, Cez, So, Bi
2008	St Gilles (30)	T1, T4, T5, T6	Hy, Ne
2008	Ouzouer-le-Marché (41)	T1, T2, T3, T4	Hy, Ap, Cez, So
2008	Lyon St Exupéry (69)	T1, T4	Hy, Ap, Cez, So, Bi
2008	Le Magneraud (17)	T1, T3	Hy, Ap, Cez, So, Bi, Pe
2009	Etoile sur Rhône (26)	T1, T2, T3, T4	Hy, Ap, Cez, So, Bi
2009	Lyon St Exupéry (69)	T1, T2, T3, T4	Hy, Ap, Cez, So, Bi
2009	Le Magneraud (17)	T1, T3	Hy, Ap, Cez, So, Bi, Pe
2010	Etoile sur Rhône (26)	T1, T2, T3, T4	Hy, Ap, Cez, So, Bi
2010	Ouzouer-le-Marché (41)	T1, T2, T3, T4	Hy, Ap, Cez, So

Tableau 1 : Détail des essais mis en place pour évaluer la tolérance variétale à la sécheresse.

Modalités d'irrigations : T1 : irrigation à l'ETM ; T2 : irrigation après floraison ; T3 : Irrigation avant floraison ; T4 : modalité non irriguée ; T5 : 1 irrigation ; T6 : 2 irrigations ; T7 : 3 irrigations ; T9 : 50% ETM ; Variétés : Blé tendre : Ap : Apache, Céz : Cézanne, Hy : Hysun, So : Soissons ; Blé dur : Ac : Acalou, Bi : Biensur, Cl : Claudio, Ne : Nefer, Pe : Pescadou

Par ailleurs, un ensemble d'essais « variétés post-inscription » a été mobilisé pour effectuer des mesures de DIC sur grain à

la récolte et renseigner sur la variabilité génétique de ce critère dans le panel variétal actuellement sur le marché français : il s'agit d'essais des campagnes 2008-2009 (20 essais) et 2010-2011 (1 essai sec-irrigué).

► Etude de températures élevées post-floraison sur le poids de grains de blé

L'expérimentation a été conduite sur la plateforme C3-GEM à l'INRA de Clermont-Ferrand. Celle-ci est constituée de 4 bulles transparentes sous lesquelles des bacs de 2 m² (et 50 cm de profondeur) peuvent être placés. Ce dispositif expérimental permet de contrôler la température de l'air, l'humidité relative, mesurer les échanges gazeux d'un couvert de 2 m² sous lumière naturelle. Les plantes ont été semées dans les bacs contenant un mélange terre, terreau, sable et à une densité de 500 plantes par m² en automne. Les bacs ont été maintenus en conditions extérieures jusqu'à l'approche de la floraison. Avant la floraison, 200 épis homogènes (en termes de nombre d'épillets par épi au sein et entre bacs) ont été repérés par bac et la date de floraison des épillets centraux a été notée.

A la floraison, les bacs ont été transférés sur la plateforme C3-GEM. Ils ont été répartis selon 4 traitements :

- un traitement témoin (C) dans lequel le régime de température a été maintenu à 21°C de 6:00 à 21:30 et 14°C le reste de la journée.
- un traitement (CT1) dans lequel un choc thermique a été appliqué pendant la phase précoce (division) du grain, vers 100°Cj après floraison.
- un traitement (CT2) dans lequel un choc thermique a été appliqué pendant la phase de remplissage, vers 420°Cj après floraison.
- Un traitement (CT12) dans lequel un choc thermique a été appliqué à la fois vers 100°Cj (phase précoce de développement) et vers 420°Cj (phase de remplissage).

Les chocs thermiques ont consisté en l'application de températures de 38°C pendant 4 heures entre 12:00 et 16:00 pendant 4 jours consécutifs. L'augmentation et la diminution de température entre 21°C et 38°C se sont faites graduellement à raison de 4.25°C toutes les 30 min. Durant les jours d'application des chocs thermiques, la température nocturne était maintenue à 21°C. Ces jours-là, la température moyenne journalière était de 23.8°C.

Les températures étaient enregistrées au-dessus du couvert mais aussi à l'intérieur des grains à l'aide de fins thermocouples insérés dans les grains. Comme l'insertion des thermocouples dans les grains induit des nécroses, les thermocouples étaient déplacés tous les 3 jours environ.

Quel que soit le traitement thermique, les plantes étaient irriguées de manière optimale afin de ne pas induire de sécheresse édaphique.

Deux types de prélèvements ont été effectués :

- Sur plantes entières : une fois par semaine, environ 90 plantes par bac étaient prélevées. Les maîtres-brins et les talles étaient dénombrés ; sur un sous-échantillon des maîtres-brins, les épis ont été égrainés et les grains dénombrés, la surface des limbes mesurée, et chaque compartiment (tiges, limbes, épis) pesés avant et après étuvage (48h à 80°C). Au total 8 prélèvements ont été réalisés entre la floraison et la maturité, le premier ayant été fait à la floraison et le dernier à la maturité (récolte).

- Sur grains : par traitement, 5 épis (maître-brins) ont été prélevés tous les jours depuis la floraison jusqu'à environ 400°Cj, puis tous les 2-3 jours jusqu'à la maturité. Sur chaque épi, étaient dénombrés les épillets et les grains. Les 2 grains basaux de l'épillet central de chaque épi étaient prélevés et pesés; leur volume était mesuré par pycnométrie. L'un était mis à l'étuve puis pesé pour mesurer la matière sèche, l'autre grain était disséqué en 3 compartiments (enveloppes, albumen et embryon), pesés en frais. Les enveloppes et l'embryon étaient mis à l'étuve pendant 48h pour estimer la matière sèche. L'albumen était préparé en vue du comptage des cellules après coloration des noyaux (réaction de Feulgen) et dénombrement par analyse d'images.

► Etude d'un stress hydrique modéré post floraison sur le poids de grains de blé

Un dispositif similaire à celui présenté ci-dessus a été mis en place pour évaluer l'impact de stress hydriques modérés à différents moments du remplissage.

L'expérimentation a été conduite en chambre de culture où la température moyenne journalière était de 17°C (20/13°C jour/nuit; HR 65/85% jour/nuit; 14/10 jour/nuit). Après vernalisation, les plantes de Récital ont été repiquées dans des tubes contenant un mélange de tourbe/terreau/pouzzolane à une densité de 0.8 m³.m⁻³, à raison de 2 plantes par tube. Avant floraison, 800 maître-brins ont été sélectionnés et la date de floraison des épillets centraux de chacun des épis a été notée.

Les 800 plantes sélectionnées ont été réparties entre 4 traitements, à raison de 200 plantes par traitement :

- C : traitement témoin dans lequel les plantes ont été arrosées quotidiennement;
- DH1 : les plantes ont été soumises à un déficit hydrique pendant la phase de développement précoce des grains;
- DH2 : les plantes ont été soumises à un déficit hydrique uniquement pendant la phase de remplissage des grains;
- DH12 : les plantes ont été soumises à un déficit hydrique pendant les phases de division et de remplissage.

L'objectif était d'induire un stress édaphique modéré en contrôlant les niveaux d'alimentation en eau des plantes, tout en limitant les effets indirects liés à la fermeture des stomates, en se plaçant en conditions de VPD satisfaisant (<2kPa).

Les prélèvements réalisés dans cette expérience sont les mêmes que ceux réalisés dans l'expérimentation précédente sur les grains individuels : même effectif et même fréquence de prélèvement. Les variables mesurées au niveau des grains ont également été les mêmes. De ce fait, nous n'avons pas de donnée rendant compte de l'effet des traitements hydriques sur les composantes du rendement.

► Amélioration du paramétrage STICS

La version utilisée pour tester les modifications de paramétrage et de formalisme était la version STICS 69. Les données utilisées portaient autant sur le blé tendre que le blé dur. Il s'agissait de données de rendement et composantes, des INN, des biomasses de plantes et des teneurs en protéines des grains.

Les modifications de formalisme ont porté sur : l'intégration de l'effet d'un stress azoté en cours de cycle sur le nombre de grains, le paramétrage variétal du nombre de grains potentiels par m², l'intégration de fonctions de réponses aux fortes températures. Les formalismes de modèles éprouvés comme

AZODYN ou SIRIUS ont été introduits et testés dans STICS avec le même jeu de données afin d'en tester la pertinence en comparaison des formalismes natifs du modèle.

3. Résultats

► Evaluation de la tolérance à la sécheresse et valorisation de la signature isotopique dans le carbone photosynthétique

L'un des essais CSVS a fait l'objet d'une analyse DIC à la parcelle, pour vérifier à l'échelle d'un essai la sensibilité et la fiabilité de la mesure. L'analyse de variance (Tableau 2) confirme le déterminisme du DIC : contrôle environnement en priorité, et effet variétal en second. L'interaction génotype x environnement est nulle. D'autre part, la variabilité expérimentale de la mesure du DIC dans ce type d'essai est plus faible dans la modalité irriguée que dans la modalité sèche, où des hétérogénéités du terrain peuvent plus aisément s'exprimer (Figure 1).

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
Traitement	14.24	3	33.66	1.43e-12	***
Variete	6.98	5	9.90	8.09e-07	***
Traitement:Variete	0.67	15	0.32	0.99	
Residuals	7.8940	56			

Tableau 2 : Analyse de variance des mesures de δ¹³C sur l'essai CSVS d'Ouzouer-le-Marché, 2010

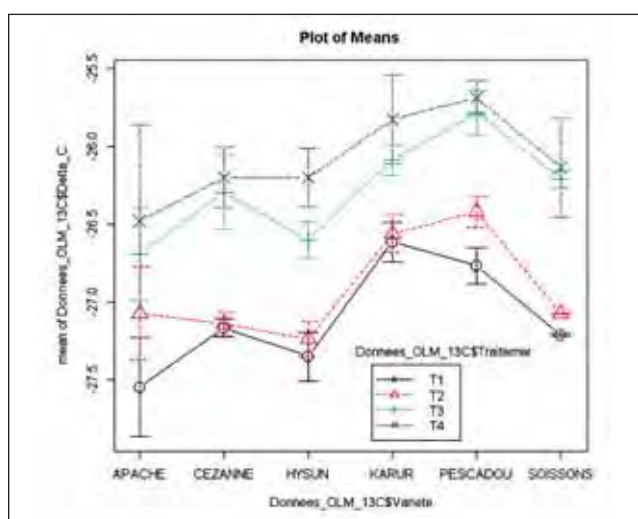


Figure 1 : valeurs moyennes et écart-type des mesures de δ¹³C obtenues sur l'essai CSVS d'Ouzouer-le-Marché, 2010

Le réseau d'essais CSVS a permis de recréer une grande diversité de scénarii et d'intensités de déficits hydriques ; dans les situations les plus stressantes, la modalité non-irriguée présentait une pénalité de rendement de 50% par rapport au témoin irrigué à l'ETM. A travers ce réseau d'essais, on retrouve les conclusions de l'essai CSVS 2010 analysé à la parcelle : un effet environnemental fort, une différence génétique de valeur absolue de δ¹³C, mais pas d'interaction Génotype x Environnement (Figure 2).

L'analyse de la relation δ¹³C - rendement ne conduit à aucun résultat concluant : on observe certes des corrélations significatives entre ces deux variables entre environnements (essai x modalité) (0.57) comme entre variétés (0.66), mais les liens restent ténus et fortement influencés par quelques variétés extrêmes, et la comparaison de deux espèces distinctes (blé tendre et blé dur).

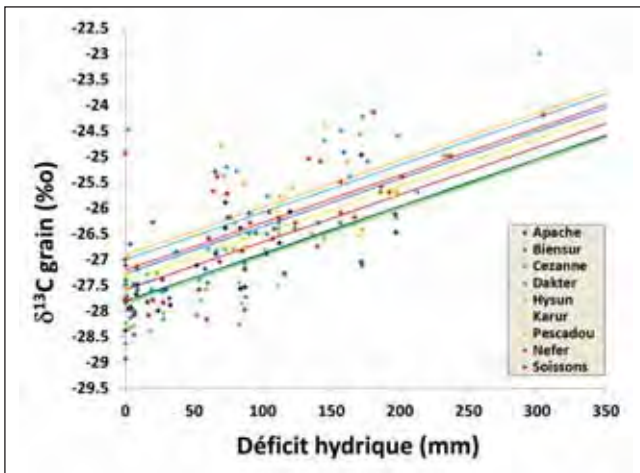


Figure 2 : Valeurs de $\delta^{13}C_{\text{grain}}$ mesurées et modèles estimés par variété

Le $\delta^{13}C$ a par ailleurs été mesuré sur différents organes, à différentes dates (sur feuille à floraison et courant remplissage, et sur grain à maturité). Les valeurs sont très significativement corrélées (r compris entre 0.52 et 0.80), avec néanmoins une dégradation de la corrélation lorsque les prélèvements sont fortement différés dans le temps (floraison et récolte par exemple). Notamment, dans le cas de stress temporaires, la relation entre les valeurs de $\delta^{13}C$ mesurées à différents moments, dans différents organes, semble se singulariser ; il est possible que cela traduise des phénomènes de remobilisation de sucres stockés dans les tiges, et porteurs d'une signature isotopique particulière.

Les essais du Magneraud ont permis de suivre plus finement la croissance et l'élaboration du rendement en situation de stress hydrique croissant (absence de précipitation depuis le stade 1 nœud) comparativement à un témoin bien irrigué. En particulier, l'évapo-transpiration des couverts au cours de la montaison et du remplissage a pu être quantifiée. Au cours de la campagne 2007-2008, trois variétés ont été suivies à pas de temps régulier (Figure 3) ; cependant, le nombre de répétitions limité ne permet pas de réaliser une analyse statistique fine. En 2008-2009, un dispositif différent a permis une meilleure quantification de l'évapo-transpiration sur toutes les variétés, entre Epi 1 cm et Récolte. En dépit d'hétérogénéités liées au dispositif expérimental, il a été possible de mettre en évidence des différences variétales significatives (Tableau 3). Cézanne, Pescadou et Soissons semblent consommer moins d'eau que Biensur et Hysun. Apache semble intermédiaire, mais est fortement concerné par l'interaction Bloc x Traitement x Variété.

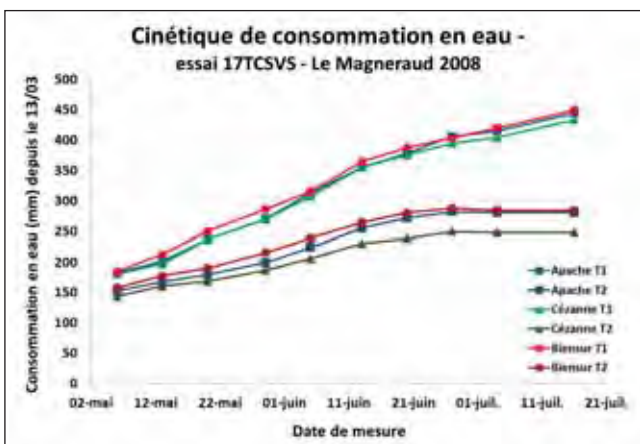


Figure 3 : Suivi des consommations en eau - essai du Magneraud 2008

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)	
Bloc	1138	1	7.61	0.008	**
Traitement	341871	1	2286.27	< 2.2e-16	***
Variété	4389	5	5.87	0.000	***
Bloc:Traitement	27	1	0.18	0.67	
Bloc:Variété	927	5	1.24	0.31	
Traitement:Variété	909	5	1.22	0.32	
Bloc:Traitement:Variété	4255	5	5.69	0.000	***
Residuals	7028	47			
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

Tableau 3 : Analyse de variance des mesures de consommation en eau de l'essai CSVS du Magneraud 2009

Les différentes variables mesurées dans l'essai ne présentent pas de fortes corrélations, y compris le DIC et l'efficacité de l'eau calculée à l'aide des mesures de transpiration. Il est cependant nécessaire de rappeler que la biomasse totale à la récolte n'a pas été mesurée ; ainsi, l'une des étapes-clés dans la constitution du rendement : l'indice de récolte, n'a pas été déterminé. De plus, la carence en azote décelée en 2008-2009 peut avoir eu un effet fort sur le comportement des cultures qui biaiserait l'analyse.

Parmi les 21 essais « Variétés Post-inscription » étudiés en 2008-2009, 11 variétés sont régulièrement représentées et permettent une analyse double : sur la variabilité génétique et environnementale du DIC d'une part, et sur la relation entre DIC et rendement d'autre part.

Les effets « essais » et « variétés » sont significatifs, mais l'évaluation de l'interaction GxE ne peut être réalisée faute de degrés de liberté suffisants.

En comparant l'effet site moyen pour DIC et le déficit hydrique calculé, il est possible de dresser une corrélation faible mais significative (Figure 4), avec néanmoins deux sites singuliers : Ouzouer-le-Marché et Yrouerre, qui ont fait l'objet d'une analyse critique. Dans le cas de l'essai d'Ouzouer-le-Marché, la réserve en eau initiale avait été évaluée à 200 mm, ce qui est très nettement supérieur aux valeurs généralement admises pour les sols de limon argileux de Beauce. Il est donc probable que le déficit hydrique calculé pour cet essai soit nettement sous-évalué, de l'ordre de 50 mm. Le cas d'Yrouerre est très différent : il s'agit de sols de type brun calcaire, superficiels, dont la réserve utile peut difficilement être fortement surévaluée (75 mm de réserve utile). Par contre, l'examen de la cinétique du bilan hydrique pour ce site indique une succession de périodes de stress hydriques modérés et d'épisodes pluvieux : les cultures ont donc vraisemblablement perçu un stress hydrique récurrent et mis en place une régulation stomatique qui a modifié le DIC.

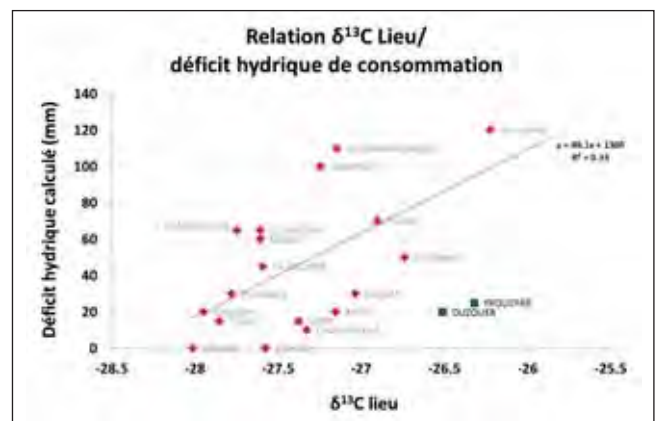


Figure 4 : Relation $\delta^{13}C$ - déficit hydrique calculé au sein du réseau d'essais Variétés 2009.

L'effet variétal sur le DIC a été confirmé sur ce panel variétal, avec notamment deux groupes variétaux distincts (Figure 5) : Apache, Hysun et Toison d'une part (DIC faible, faible efficacité intrinsèque de l'eau) et les huit autres variétés d'autre part (DIC forte, forte efficacité intrinsèque de l'eau). Il est à noter que le positionnement d'Apache et Hysun apparaît pleinement cohérent avec les résultats des essais CSVS ; par contre, Soissons apparaît dans ce réseau plus nettement différent d'Apache et Hysun que dans le réseau CSVS.

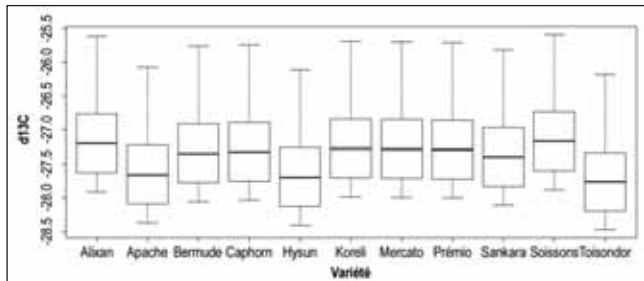


Figure 5 : Boxplot des effets variétaux sur $\delta^{13}\text{C}$; essais variétés 2009.

L'analyse directe de l'effet du DIC sur le rendement n'est évidemment pas concluante, comme on pouvait le craindre dans un réseau d'essais où différents facteurs limitants peuvent émerger, et avec des variétés aux caractéristiques très différentes (phénologie, résistance aux maladies, à la carence en azote). Nous avons donc plutôt essayé d'analyser l'effet du DIC sur l'interaction GxE (c'est-à-dire les variations du rendement entre environnements). Cette approche permettrait de vérifier les observations relevées dans la bibliographie : un effet différent du DIC selon le niveau de stress et donc le potentiel de rendement du milieu. Malheureusement, le faible nombre de variétés et leur ségrégation en deux groupes très distincts ne permettent pas d'aboutir à un résultat probant (Figure 6). L'intégration de la totalité des données de rendement et de DIC du réseau (28 variétés présentes sur les sites de Maule et Allonnes) conduit à des résultats très différents mais pas davantage significatifs ; ceci indique que ce type d'analyse statistique est sensible et nécessite un jeu de données plus complet et orthogonal que celui dont nous disposons ici.

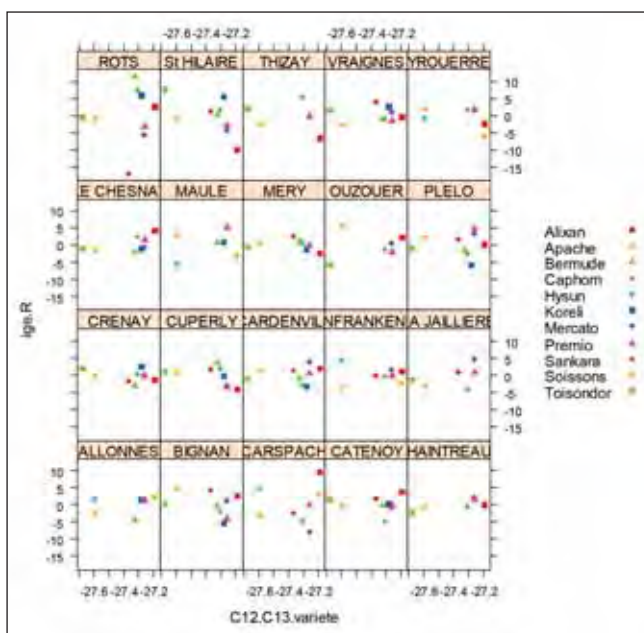


Figure 6 : relations entre $\delta^{13}\text{C}$ et l'interaction Génotype x Environnement du rendement, illustrée par essai et variété.

Afin d'évaluer si les listes variétales restreintes que nous avons suivies dans nos essais CSVS et Variétés Post-Inscription reflétaient la variabilité génétique existante au sein des cultivars commerciaux modernes, nous avons procédé à l'analyse de trois essais à liste variétale étendue : essais d'Allonnes et Maule en 2008-2009 (28 variétés présentes sur 2 sites), et essai d'Ouzouer-le-Marché en 2010-2011 (45 variétés, en modalités pluviales et irriguées). Ces jeux de données ne permettent pas de classer finement les variétés ni d'analyser les relations DIC-rendement, mais ils permettent de constater la variabilité génétique significative présente dans les variétés inscrites au catalogue (Figures 7 et 8), variabilité qui n'a pas été complètement explorée dans nos dispositifs à liste variétale plus courte.

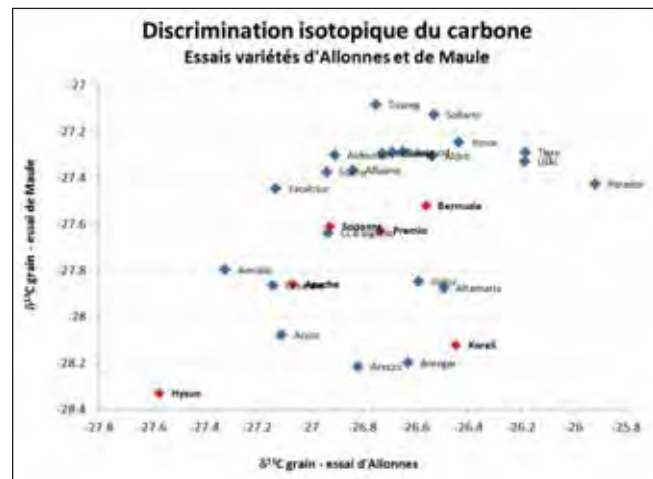


Figure 7 : relation entre les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ variétales mesurées sur les essais d'Allonnes et de Maule en 2009.

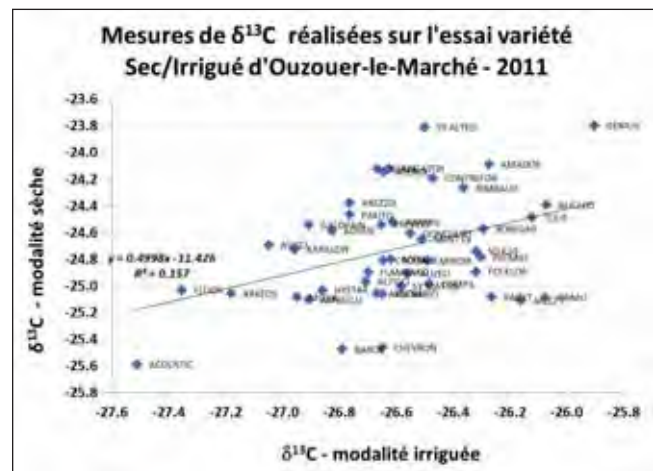


Figure 8 : relation entre les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ variétales mesurées dans les modalités pluviales et irriguées de l'essai d'Ouzouer-le-Marché en 2011.

► Effets d'une sécheresse édaphique sur le développement des grains de blé

Contrôle du potentiel hydrique foliaire

Les mesures indiquent que le potentiel hydrique foliaire de base moyen sur toute la période entre floraison et maturité des grains des épis témoins est de -0.47MPa alors qu'il est respectivement de -1.32, -1.60 et -1.46 MPa pour les traitements DH1, DH2 et DH12 (Figure 9). Le déficit hydrique a été suffisamment important pour entraîner une sénescence plus précoce des plantes soumises à la sécheresse en

particulier en phase précoce de développement du grain (données non montrées). Notons toutefois que nous n'avions pas accès à l'état hydrique du grain lui-même et que ce que nous avons enregistré est bien l'état hydrique de la plante.

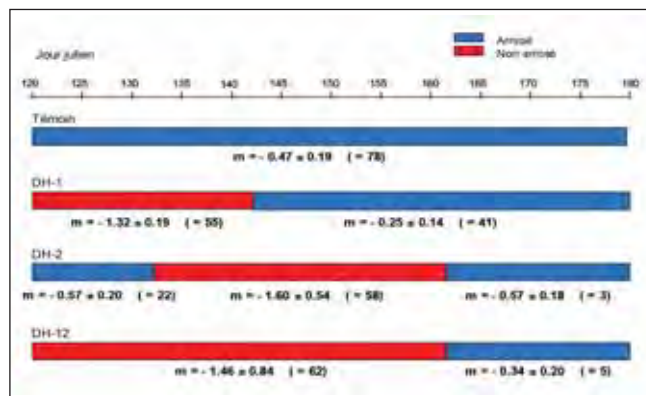


Figure 9 : Valeur moyenne du potentiel hydrique foliaire de base de plantes soumises aux 4 traitements pendant les périodes d'application de la contrainte. Les valeurs indiquées sont les moyennes \pm écart-type sur un nombre d'observations indiqué entre parenthèses.

► Effet des traitements hydriques sur les caractéristiques des épis à la récolte

Les valeurs finales des masses, longueur et nombre de grains des épis à la récolte ne présentent aucune différence significative entre traitement. Le déficit hydrique imposé en phase précoce de développement n'a donc pas réduit le nombre de grains. Ainsi, les traitements hydriques appliqués ont bien été conduits de manière à affecter potentiellement le développement des grains sans augmenter le taux d'avortement et réduire ainsi le nombre de grains. Par contre, le nombre de grains mal formés rapporté au nombre de grains

total par épi a été mesuré et une analyse des pourcentages fait apparaître un effet des traitements hydriques sur le mauvais développement des grains en comparaison des grains du traitement témoin; ce pourcentage est d'environ 1.5% pour le traitement témoin et d'environ 6% par rapport pour les traitements hydriques (confondus). Ces grains n'ont pas été pris en compte dans les analyses ultérieures.

► Evolution au cours du temps des masses et des volumes des grains des différents traitements - Evolution du nombre de cellules de l'albumen des grains

Les masses et volume des grains récoltés à maturité pour les différents traitements sont rapportés dans le Tableau 4.

Contrairement à toute attente, à l'échelle du grain individuel (grains basaux des épillets centraux des maitres-brins), les comparaisons de moyennes entre les différents traitements, des masses et dimensions des grains à maturité montrent qu'il n'y a pas de différence statistique entre les traitements. On peut constater toutefois deux tendances : d'une part, les valeurs des différentes variables sont légèrement plus faibles pour le traitement témoin que pour les autres traitements bien que non différentes statistiquement ; d'autre part la variabilité autour des moyennes observées est plus importante lorsque une sécheresse a été appliquée en phase précoce de développement et ce malgré le retrait des grains mal-formés ou mal remplis.

Afin de mieux comprendre comment ces valeurs à maturité ont été obtenues, les cinétiques de croissance en masses et en volume de grains individuels prélevés sur l'épillet central de chacun des épis ont été établies, ajustées par des fonctions de croissance et comparées statistiquement. Ces cinétiques sont reportées sur la Figure 10.

Traitement	Masse fraîche (mg)	Masse sèche (mg)	Masse d'eau (mg)	Teneur en eau (%)	Volume (mm ³)
C	30.9 \pm 3.3 a	28.8 \pm 3.3 a	3.4 \pm 0.4 a	10.5 \pm 0.3 a	38.2 \pm 7.0 a
DH1	39.5 \pm 11.4 a	36.2 \pm 10.3 a	4.3 \pm 0.9 a	10.7 \pm 1.3 a	45.0 \pm 10.4 a
DH2	36.3 \pm 3.5 a	33.5 \pm 3.5 a	3.8 \pm 0.3 a	10.1 \pm 0.5 a	41.8 \pm 6.7 a
DH12	36.0 \pm 10.8 a	35.4 \pm 5.6 a	4.1 \pm 0.7 a	10.4 \pm 0.5 a	42.3 \pm 9.2 a

Tableau 4. Masses et volumes à maturité des grains basaux des épillets centraux soumis aux différents traitements hydriques. Moyennes \pm écart-type (n=10). Par colonne, les moyennes suivies d'une même lettre ne diffèrent pas au seuil 5% (Test de Scheffe)

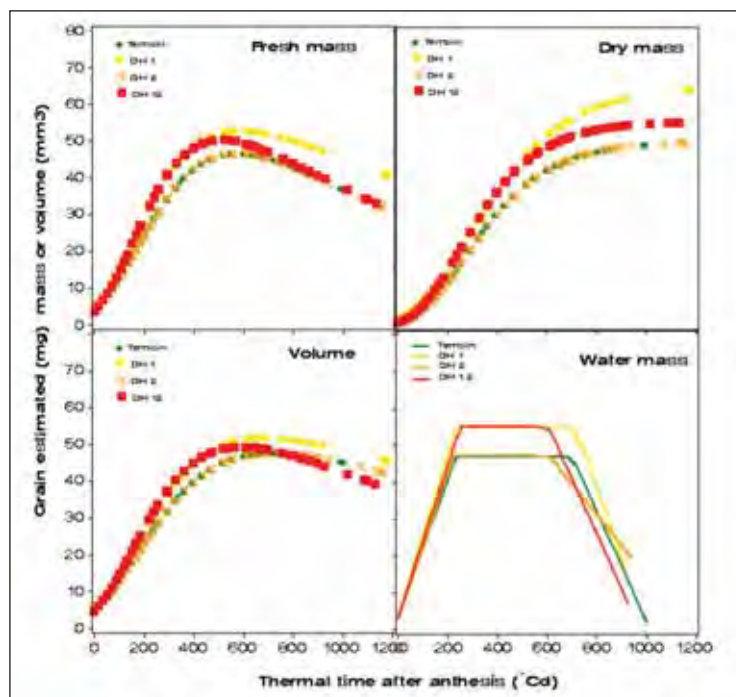


Figure 10 : Evolution au cours du temps des masses fraîches, sèches et d'eau ainsi que du volume des grains pour les 4 traitements hydriques. Les valeurs sont les valeurs estimées après ajustement des valeurs observées par des fonctions de croissance (Gompertz pour les masses fraîches et sèches ainsi que pour le volume; linéaire segmentée pour la quantité d'eau par grain). Ces ajustements permettent la comparaison des courbes des différents traitements entre elles et l'estimation de paramètres de croissance (durée, vitesse).

Quelle que soit la variable considérée (masses, volume), l'analyse comparative de courbes montre que l'application d'un déficit hydrique uniquement pendant la phase de remplissage ne modifie pas la cinétique d'accumulation de masse ou de croissance en volume des grains comparativement au témoin. Lorsque le déficit hydrique est appliqué en phase précoce de développement, les cinétiques de croissance en masse et dimensions sont différentes de celles enregistrées pour les traitements témoin C et DH2. Les traitements hydriques (DH1 et DH12) affectent différenciellement la durée moyenne de croissance et/ou la vitesse moyenne (Tableau 5) comparativement aux traitements témoin ou DH12. Un déficit hydrique appliqué en phase précoce de développement du grain, accompagné ou non d'un déficit en phase de remplissage entraîne une légère augmentation de la vitesse moyenne de croissance en dimension et en masse des grains individuels. La durée de croissance est peu ou faiblement diminuée contribuant ainsi à une tendance à l'augmentation des dimensions et masses finales des grains. Ce résultat concerne les grains du milieu de l'épi. Si ces grains constituent des puits prioritaires, il conviendrait de vérifier ces résultats pour des grains prélevés sur les autres niveaux de l'épi.

	Durée moyenne (°Cj) d'accumulation des masses ou de croissance en volume				Vitesse moyenne d'accumulation des masses (mg.°Cj-1) ou de croissance en volume (mg.°Cj-1)			
	C	DH1	DH2	DH12	C	DH1	DH2	DH12
Masse fraîche	576 a	587 a	576 a	512 b	0.055 b	0.073 a	0.055 b	0.074a
Masse sèche	689 b	771 a	689 b	654 c	0.043 c	0.048 b	0.043 c	0.051 a
Volume	715 a	684 b	715 a	594 c	0.055 b	0.065 a	0.055 b	0.066 a

Tableau 5. Effets des chocs thermiques sur les durées et vitesse d'accumulation des masses fraîches et sèches et de croissance en volume.

Le dénombrement des cellules dans l'albumen a été fait et les données des traitements C et DH2 d'une part et DH1 et DH12 d'autre part ont été poolées. Les nombres de cellules en fin de phase de division sont de 73212 ± 9313 et $85\ 237 \pm 10\ 723$ respectivement pour les traitements (C + DH2) et (DH1 + DH12). Ces moyennes ne sont pas différentes statistiquement et les cinétiques de multiplication des cellules non plus (la durée de multiplication cellulaire dans l'albumen a été estimée à environ 200°Cd). Ces données cellulaires sont cohérentes avec les données enregistrées à l'échelle des grains.

Trait.	Haut. (cm)	épis.m ⁻²	Gr.épi ⁻¹	grains.m ⁻²	Poids sec grain (mg)	% N par grain	N par grain (µg)	Rdt (q.ha ⁻¹)	Rdt N (kg.ha ⁻¹)
C	88	926	40.9	26262	28.0	1.98	554.3	73.4	146
CT1	79	990	40.1	28070	24.8	2.02	500.8	69.5	141
CT2	80	1022	40.1	29341	21.7	2.23	484.2	63.6	142
CT12	85	913	40.4	27216	22.8	2.30	525.0	62.1	143

Traitement	Masse fraîche (mg)	Masse sèche (mg)	Masse d'eau (mg)	Teneur en eau (%)	Volume (mm ³)
C	45.2 ± 5.6 a	42.6 ± 4.7 a	5.7 ± 0.9 a	11.8 ± 0.7 a	57.6 ± 7.1 a
CT1	43.7 ± 8.9 a	40.8 ± 7.3 a	5.6 ± 0.7 a	12.3 ± 1.2 a	54.6 ± 7.4 a
CT2	40.2 ± 5.9 a	36.1 ± 4.6 b	4.8 ± 0.9 a	11.7 ± 0.6 a	51.3 ± 5.1 a
CT12	42.0 ± 3.4 a	37.3 ± 3.5 b	4.6 ± 0.5 a	11.0 ± 0.6 a	52.0 ± 3.2 a

► Etude de températures élevées post floraison sur le poids de grains de blé

Application des chocs thermiques

L'enregistrement en continu des températures au niveau des grains a bien confirmé que l'élévation de température était transmise à l'intérieur des grains (température de 23 à 26°C enregistrée lors des phases de choc thermique, contre 19°C environ pour le témoin).

Composantes du rendement

A maturité, toutes les plantes restantes au sein de chaque bac ont été prélevées et les composantes de rendement ont été estimées par m². Les données sont rapportées dans le Tableau 6. Les couverts de blé à floraison étaient homogènes entre les traitements (pas de différence significative de hauteur de couvert et de nombres de plantes). A maturité, le nombre moyen de grains par épi (des maîtres-brins) n'est pas non plus diminué significativement (Anova, P=0.99) ; pour 10 épis prélevés au hasard et égrainés à la récolte, le nombre moyen de grains par épi est respectivement de : 40.9 ± 5.9 , 40.1 ± 2.6 , 40.1 ± 0.4 et 40.4 ± 1.2 pour les traitements C, CT1, CT2 et CT12. Il n'y a pas eu non plus d'effet significatif des traitements thermiques sur le nombre de grains avortés (données non montrées). La baisse de rendement consécutive à l'application de chocs thermiques post-floraison est due en priorité à une diminution de la masse moyenne des grains. Les chocs thermiques n'ont pas eu d'impact sur la quantité d'azote par grain. Les chocs thermiques appliqués pendant la phase de remplissage (avec ou sans application pendant la phase de division) ont été plus dommageables en termes de pertes de rendement que le choc thermique appliqué en phase de division. Notons que dans le cas d'une double application de choc thermique les diminutions de rendement atteignent 15.4% par rapport au traitement témoin (et -5.6% et -13.4% respectivement pour les traitements CT1 et CT2 par rapport au témoin).

► Evolution au cours du temps des masses et des volumes des grains des différents traitements - Evolution du nombre de cellules de l'albumen des grains

Afin d'approcher les mécanismes et les compartiments au sein des grains, touchés par les chocs thermiques, les deux grains basaux des épillets centraux ont été systématiquement prélevés au cours du temps et mesurés en dimensions et masses. Cette focalisation sur ces grains centraux permet de s'abstraire la variabilité de la taille des grains au sein d'un épi. Les résultats obtenus à maturité sont rapportés dans le Tableau 7.

Tableau 6. Composantes de rendement à la récolte pour les 4 traitements thermiques (C: control; CT1 : choc thermique en phase de division; CT2 : choc thermique en phase de remplissage; CT12 : choc thermique en phase de division et de remplissage).

Tableau 7. Masses et volumes à maturité des grains basaux des épillets centraux soumis aux différents traitements thermiques. Moyennes ± écart-type (n=10). Par colonne, les moyennes suivies d'une même lettre ne diffèrent pas au seuil 5% (Test de Scheffe)

Les chocs thermiques n'ont pas affecté de manière significative les teneurs en eau et le volume des grains à maturité ; par contre ils ont affecté la masse sèche finale. Les chocs thermiques en phase de remplissage (avec (CT12) ou sans (CT2) choc thermique en phase de division) ont entraîné des diminutions significatives de la masse sèche finale des grains. Ces baisses sont de 15% et de 12% respectivement pour les traitements CT2 et CT12. Un choc thermique appliqué en phase précoce de développement (CT1) n'a pas entraîné de diminution significative du poids sec final des grains par rapport au traitement témoin. Les effets des chocs thermiques sur les grains individuels (tab. 7) apparaissent moins dommageables que lorsque les effets sont observés à l'échelle de l'épi (tab. 6). Cela suggère que les grains des épillets centraux représentent des puits prioritaires pour l'eau et les assimilats et les effets observés pour ces grains sont probablement les effets minima pouvant être mesurés. Si ces résultats sont confirmés pour d'autres contraintes thermiques, ces résultats suggèrent que dans le cadre dans un screening pour la tolérance aux fortes températures, il serait intéressant d'utiliser ce type de grains pour mettre en évidence les effets minima pouvant être attendus pour une variété donnée, toutes choses étant égales par ailleurs. Cependant, en s'appuyant sur ces puits privilégiés, il est possible de ne pas détecter un effet pénalisant la production à l'échelle de la plante ou de la culture.

Les prélèvements effectués au cours du temps permettent de tracer les cinétiques de croissance en masse et en dimensions (volume) des grains. Afin de comparer statistiquement ces cinétiques, des ajustements des valeurs observées par des fonctions ont été effectués (Figure 11).

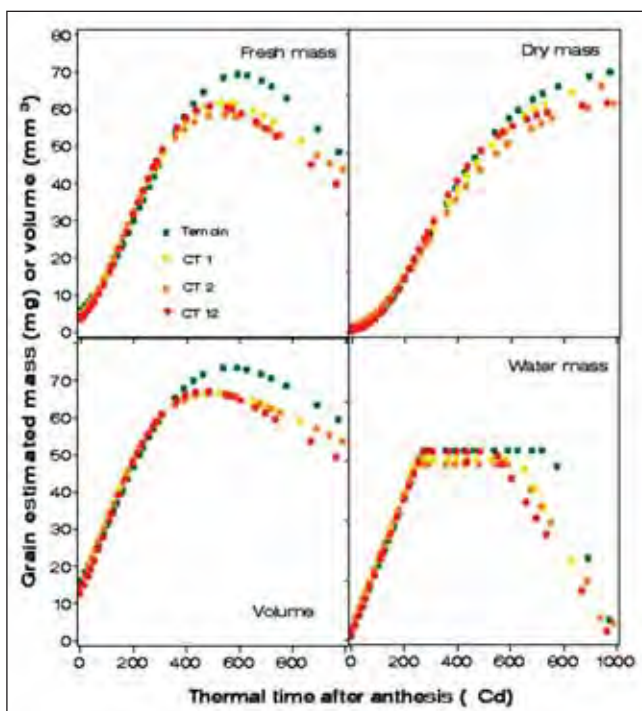


Figure 11 : Evolution au cours du temps des masses fraîches, sèches et d'eau ainsi que du volume des grains pour les 4 traitements. Les valeurs sont les valeurs estimées après ajustement des valeurs observées par des fonctions de croissance (Gompertz pour les masses fraîches et sèches ainsi que pour le volume; linéaire segmentée pour la quantité d'eau par grain). Ces ajustements permettent la comparaison des courbes des différents traitements entre elles et l'estimation de paramètres de croissance (durée, vitesse).

	Durée moyenne (°Cj) d'accumulation des masses ou de croissance en volume				Vitesse moyenne d'accumulation des masses (mg.°Cj-1) ou de croissance en volume (mg.°Cj-1)			
	C	CT1	CT2	CT12	C	CT1	CT2	CT12
Masse fraîche	596 a	542 b	528 c	506 d	0.051 d	0.068 c	0.080 a	0.077 b
Masse sèche	716 a	716 a	709 a	614 b	0.057 a	0.052 b	0.048 c	0.060 a
Volume	568 a	497 b	497 b	472 c	0.069 b	0.094 a	0.094 a	0.092 a

Tableau 8. Effets des chocs thermiques sur les durées et vitesse d'accumulation des masses fraîches et sèches et de croissance en volume.

Les effets les plus marqués des chocs thermiques concernent la durée du plateau hydrique (Fig. 5) qui est diminuée respectivement de -19%, -20% et -38% par les traitements CT1, CT2 et CT12. Si les vitesses d'accumulation d'eau dans le grain ne sont pas modifiées par des chocs thermiques, les vitesses de déshydratation du grain sont diminuées par l'application d'un choc thermique, quelle que soit la phase d'application.

La dissection des grains pour le comptage des cellules dans l'albumen a permis le suivi cinétique des trois compartiments principaux du grain : enveloppes, albumen, embryon. Les effets des chocs thermiques sont identiques sur les dimensions et masses de ces trois compartiments à ceux observés pour les grains entiers (données non montrées). Les relations reliant la croissance en masse et en volume des différents compartiments restent inchangées par l'application de chocs thermiques. Il faut noter en particulier, qu'un choc thermique en phase précoce de développement du grain, n'a pas restreint la croissance des enveloppes en comparaison des témoins, ne limitant pas ainsi le volume disponible pour la croissance de l'albumen.

Le nombre final de cellules dans l'albumen était de 86373, 54034, 76399 et 53537 pour les traitements C, CT1, CT2 et CT12 respectivement. Un choc thermique pendant la phase précoce de développement du grain (CT1 et CT12) a réduit de manière significative le nombre de cellules dans l'albumen de 37 et 38% respectivement par rapport au témoin. L'analyse en cinétique des courbes de multiplication cellulaire dans l'albumen montre que la diminution du nombre final de cellules est le résultat d'une diminution à la fois de la durée et de la vitesse de multiplication. La multiplication cellulaire s'arrête en moyenne vers $220 \pm 10^\circ\text{Cd}$ et $186 \pm 20^\circ\text{Cd}$ respectivement pour les traitements (C + CT2 confondus) et (CT1 + CT12 confondus).

Ainsi, malgré un nombre plus faible de cellules dans l'albumen en fin de phase de division, les grains du traitement CT1 n'ont pas une masse sèche finale significativement plus faible que celle des grains témoins. Dans ce cas de traitements thermiques, il n'y a pas de corrélation entre le nombre de cellules dans l'albumen en fin de phase de division et la taille finale des grains. Par ailleurs les grains de ces deux traitements ne montrant pas de différence de volume final, il est très probable qu'il y ait une compensation du plus faible nombre de cellules par une taille plus grande des cellules, les capacités d'accumulation n'ayant pas été modifiées. Ces résultats ont été obtenus sur les grains basaux de l'épillet central des épis. Il faudrait étudier si cette éventuelle compensation se fait au détriment des autres grains de l'épi, ceux-ci étant finalement plus pénalisés en n'ayant pas cette capacité compensatrice.

► Amélioration du paramétrage de STICS

Calcul du nombre de grains/m² en intégrant les effets d'une carence azotée et l'effet variétal sur le nombre de grains potentiels.

L'amélioration de la prédiction du nombre de grains et du rendement a été testée à l'aide de plusieurs formalismes ou modifications de paramètres :

- introduction d'un formalisme de type Azodyn qui calcule le nombre de grains à partir de l'état azoté de la plante avant la floraison (évalué à partir de l'indice de stress azoté)
- introduction d'un formalisme de type Sirius qui relie le nombre de grains au poids de l'épi à floraison (traduction des conditions de croissance qui précèdent la floraison et déterminent en partie la constitution de l'épi)
- définition d'un nombre de grains potentiel différencié par variété.
- Evaluation d'un paramétrage par variété de certains paramètres qui pilotent le rendement

Les résultats montrent que les formalismes d'AZODYN ou SIRIUS améliorent le niveau de prédiction du formalisme et paramétrage actuel du modèle. Par ailleurs, la différenciation de certains paramètres par variété (i.e. nombre de grains potentiels) augmente la qualité de prédiction du formalisme

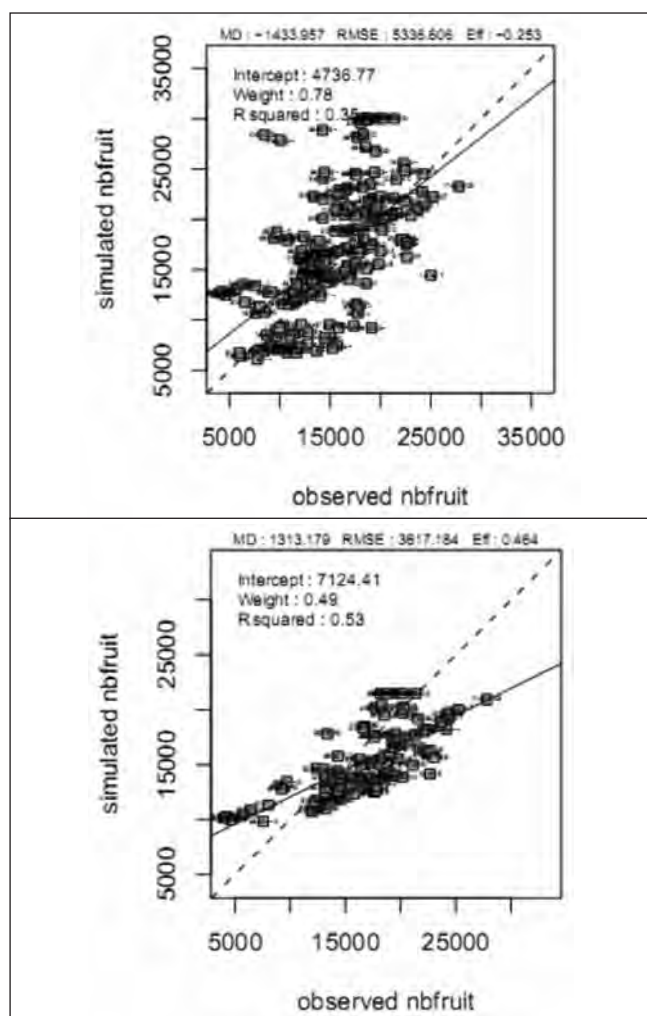


Figure 12a - 12b : Prédiction du nombre de grains par STICS sur blé tendre : a) Nombre de grains simulés vs nombre de grains observés avec le modèle d'origine ; b) Nombre de grains simulés vs nombre de grains observés avec le modèle intégrant un nombre de grains potentiel distinct par variétés.

actuel du modèle (Figure 12a et 12b) pour le nombre de grains, même si un certain biais persiste :

Ainsi, la modification des paramètres dans la version actuelle du formalisme a permis d'améliorer la qualité de prédiction du rendement grain (efficacité en hausse de 0.31 à 0.62) et surtout du nombre de grains (passage de -0.25 à 0.46). Ce travail a permis entre autres, d'identifier un certain nombre de paramètres variétaux qui contrôlent le rendement, et qui initialement étaient considérés comme spécifiques à l'espèce. Cependant, le nombre de données disponibles par variété dans des situations contrastées est assez réduit, ce qui a permis de faire seulement un travail exploratoire sur ces aspects.

Introduction de différentes courbes de réponse à la température pour le calcul du rendement

L'introduction de différentes lois de réponses à la température, notamment avec des distinctions sur l'effet des fortes températures ($T > 25^{\circ}\text{C}$), a été testée dans STICS. Trois approches ont été comparées :

- une première approche basée dans les trois températures moyennes cardinales de réponse de la plante à la température recueillis par Porter et Gawith (1999) ($T_1 = 9.2^{\circ}\text{C}$, $T_2 = 20.7^{\circ}\text{C}$, $T_3 = 31^{\circ}\text{C}$), où l'on définit une réponse maximale à la température à T_2 , nulle à T_1 et T_3 , et variant linéairement entre ces bornes
- une approche simplifiée de celle proposée par Arvalis (modèle PANORAMIX) qui donne des lois de réponses différentes pour les températures minimales et maximales : les températures maximales sont actives à partir de 0°C , avec une phase optimale entre 14 et 26°C et à partir de ce moment l'effet positif de la température diminue. La température minimale a un effet optimal jusqu'à 14°C qui diminue ensuite.
- le modèle existant dans STICS (Brisson *et al.*, 2009)

Une expérimentation par simulation de l'effet de ces trois formalismes sur le rendement a été réalisée pour 4 scénarios climatiques distincts : les récoltes 2002, 2003, 2008 et 2009. Les résultats et les dynamiques obtenus ont montré que le formalisme simplifié issu du modèle Panoramix était le plus pertinent pour prendre en compte les effets d'échaudage, contrairement aux deux autres formalismes testés.

L'intégration de ce nouveau formalisme dans STICS affecte légèrement le calcul du rendement sur le jeu de données testé (l'efficacité recule de 0.62 à 0.53).

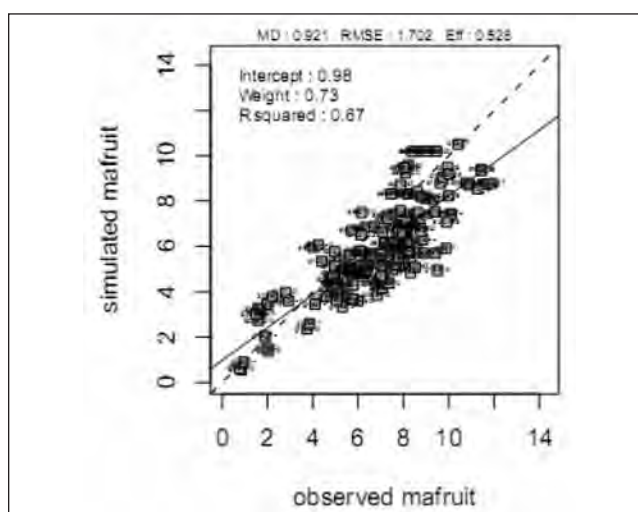


Figure 13 : Prédiction du rendement grains par STICS sur blé tendre après intégration de nouveaux paramètres thermiques.

4. Discussion

► Tolérance à la sécheresse : mesures de plein champ et valorisation de la discrimination isotopique du carbone photosynthétique.

La tolérance à la sécheresse des cultures et du blé tendre en particulier est la résultante d'un ensemble de mécanismes complexes, que l'on peut analyser à l'échelle du métabolisme, des cellules, des organes, des plantes ou du couvert. L'objectif ici a été de tester, dans des conditions climatiques représentatives des pédoclimats français, une méthode indirecte de caractérisation du comportement photosynthétique des plantes : la discrimination isotopique du carbone. Nous avons pu constater que, sous réserve d'un nombre suffisant de répétitions, il était possible de mettre en évidence des différences significatives entre variétés et conditions de cultures, et que l'interaction entre ces deux variables était faible ou nulle. D'un point de vue méthodologique, l'utilisation d'échantillons issus de conditions irriguées ou du moins non soumises à un stress hydrique permet de limiter la variabilité environnementale causée par des différences de propriétés des sols au sein d'un essai. L'analyse isotopique peut être réalisée sur feuilles ou sur grains, avec des objectifs différents : la mesure sur tissus foliaires reflète le comportement photosynthétique instantané et court-terme et offre donc un intérêt essentiellement analytique dans le fonctionnement de la plante, alors que la mesure sur grain est intégratrice de l'élaboration de la biomasse sur une longue période, incluant notamment des effets de réallocation de sucres au sein de la plante ou des contributions variables des différents organes (Hafsi *et al.*, 2001).

Le réseau d'essais dits « CSVS » mis en place pour analyser la relation entre cet indicateur de la tolérance à la sécheresse et le rendement a permis d'obtenir une grande diversité de scénarii de stress hydriques, tant par leur intensité que par leur dynamique. Si une caractérisation fine du sol et des conditions de culture peut permettre une évaluation de l'intensité du stress à l'aide d'un bilan hydrique, la dynamique du stress est par contre très difficile à valoriser comme covariable d'analyse. Néanmoins, le moment et la façon dont le stress va apparaître et éventuellement être levé sont primordiaux pour caractériser les conditions de croissance et appréhender les caractères physiologiques adaptés.

Ce réseau a permis d'apporter les éléments suivants (conformes aux travaux scientifiques internationaux) : une corrélation positive forte existe entre le déficit hydrique calculé et le $\delta^{13}\text{C}$ (résultat probable d'une régulation stomatique des plantes en conditions adverses) et d'autre part il a été possible de distinguer certaines variétés aux $\delta^{13}\text{C}$ extrêmes (faibles pour Hysun et Nefer, forte pour Claudio). De plus, aucune interaction variétale entre le niveau de déficit hydrique et le $\delta^{13}\text{C}$ n'a été décelée, ce qui indiquerait une bonne conservation du classement variétal sur une large gamme de stress hydriques.

La relation entre DIC et rendement n'a pu être correctement analysée, faute d'un panel variétal suffisamment étoffé et représentatif de la variabilité génétique. En effet, les travaux de recherche internationaux démontrent des corrélations significatives mais faibles entre rendement et DIC en s'appuyant sur des panels de cultivars larges (>30 cultivars).

Les essais du Magneraud n'ont pas permis de (re)démontrer des liens mécanistes simples entre éléments de la constitution

du rendement (transpiration, biomasse, indice de récolte), sans doute à cause de biais expérimentaux (milieu pas totalement homogène, indice de récolte et biomasse aérienne à maturité non mesurés, évaporation résiduelle du sol). Par contre, ils ont mis en évidence des différences génétiques de consommation en eau du sol entre quelques variétés commerciales.

► Tolérance à la sécheresse : mesures en conditions contrôlées sur la croissance des grains courant remplissage.

L'expérimentation visait à mesurer l'impact d'une sécheresse édaphique (potentiel hydrique du sol faible mais demande atmosphérique limitée) sur la croissance des grains à partir de la floraison. Des plantes-témoins ont permis de contrôler l'intensité du stress et de vérifier sa mise en place ou sa levée lors des phases phénologiques visées.

Les conséquences de la mise en place des stress édaphiques n'ont pas été significatives sur des caractéristiques de l'épi établies précocement : longueur, matière sèche, nombre de grains, de même que sur les caractéristiques des grains basaux des épillets centraux des maîtres-brins à maturité. Par contre, les mesures dynamiques de la croissance des grains semblent indiquer des différences concernant la durée et la vitesse moyennes d'accumulation des masses (MS ou MF). De même, le nombre de grains mal formés à maturité a progressé de 1.5% sur le témoin non stressé à environ 6% sur les modalités stressées. Il est donc vraisemblable qu'il y ait une allocation préférentielle des assimilats vers les puits principaux (grains basaux, épillets centraux, éventuellement maîtres-brins) lors de stress hydriques modérés. Ceci conduit à des caractéristiques inchangées voire améliorées pour ces grains prioritaires, au détriment de puits moindres (grains situés en haut et en bas des épis, ou moins à la base des épillets).

► Etude de températures élevées post floraison sur le poids de grains de blé

L'objectif de cette étude prospective de la réponse de la croissance des grains à des augmentations de température était de préciser les stades/compartiments/processus du développement des grains sensibles à ces modalités de contraintes environnementales qui pourraient s'avérer de plus en plus fréquentes suite au changement climatique.

A l'échelle du grain individuel, les diminutions de masses des grains les plus importantes ont été enregistrées en présence de chocs thermiques appliqués soit pendant la phase de remplissage seule soit pendant les phases de division et de remplissage. Toutefois, nos résultats montrent que la phase de division est également affectée par des variations des facteurs environnementaux et que le processus de multiplication cellulaire est sensible notamment à une augmentation de températures à l'intérieur du grain. Nos résultats suggèrent que des mécanismes de compensation à l'intérieur du grain interviennent pour compenser le nombre de cellules de l'albumen par leur taille, conduisant à l'absence d'effet sur la masse finale des grains lorsque la contrainte thermique a été appliquée en phase précoce de développement du grain et qu'elle n'est pas suivie pas d'autres contraintes. Cela souligne l'importance d'étudier cette phase de développement du grain malgré l'absence d'effet visible des contraintes appliquées à la récolte. Toutefois, les conditions de culture du couvert ont conduit à

la mise en place de densités de plantes, d'épis et de grains (respectivement 500, 950 et 28000 m⁻²) très supérieures à des valeurs couramment rencontrées en plein champ. Ainsi, compte-tenu du niveau de rendement finalement atteint, il est possible que l'accumulation de biomasse au sein des grains ait été limitée non pas (ou pas uniquement) par des facteurs en lien avec les grains eux-mêmes, mais plutôt par une source d'assimilats trop restreinte pour le nombre de grains ébauchés.

Nos résultats ont mis en évidence que les effets majeurs observés à l'échelle du grain reflètent essentiellement les effets sur l'albumen, ce qui n'est guère surprenant, ce compartiment représentant près de 80% en volume ou en masse du grain entier. La dissection des grains en trois compartiments et le suivi des masses et dimensions de ces trois compartiments a permis de constater que les relations de croissance ne sont pas modifiées par des fluctuations des facteurs environnementaux. La coordination et la synchronisation des processus entre les compartiments semblent être conservées. Cela soulève la question des signaux et des informations échangées entre les différents compartiments.

Enfin, nos études se sont focalisées sur les grains basaux prélevés sur les épillets centraux des épis, de manière à limiter la variabilité intra-épi et intra-épillet. Nos résultats suggèrent que ces grains seraient des organes puits prioritaires pour l'eau et les assimilats, conduisant à des effets minima des contraintes étudiées sur le grain. Il conviendrait de vérifier cette hypothèse en conduisant des études similaires sur des grains situés plus haut ou plus bas sur l'épi et étudier si des effets tels que la compensation taille/nombre de cellules dans l'albumen sont retrouvés dans ces grains-là. L'extension de ce type de connaissance à l'échelle de l'épi et de la plante pourrait mener à une meilleure compréhension des effets des stress thermiques sur des couverts et idéotypes aux caractéristiques d'élaboration du rendement différentes, de même qu'à des recommandations expérimentales d'organes à prélever préférentiellement pour tester les conséquences d'un stress abiotique.

► Amélioration d'un modèle de culture : STICS

L'intérêt d'un modèle de culture tel que STICS pour évaluer la pertinence de choix physiologiques dans la définition d'idéotypes en situation de changement climatique et de stress hydrique est double : évaluation de la disponibilité en eau au cours du cycle, pour permettre un choix judicieux de la stratégie à adopter vis-à-vis du déficit hydrique (stratégies « conservatrices » ou « opportunistes » citées précédemment), et évaluer plus globalement un type variétal dans de nombreuses conditions pédo-climatiques à partir d'extrapolations d'essais initiaux qui auront permis sa caractérisation fine.

Les travaux complémentaires réalisés dans le cadre de ce projet ont permis de renforcer la capacité prédictive de STICS sur l'élaboration des composantes du rendement, avec une prise en compte des caractéristiques variétales plus fines (i.e. nombre de grains potentiel).

La modification de la prise en compte des températures élevées permet de prendre en compte l'effet des fortes températures sur le rendement de manière plus réaliste. Néanmoins, le nouveau formalisme reste assez empirique, et donc des études plus approfondies sur les effets des fortes températures, tant dans la description des températures-

seuils (Porter and Gawith, 1999) que dans les fonctions d'impact ou dans l'éventuelle variabilité génétique de la réponse face à ce type de stress, sont nécessaires dans le futur.

► Conclusions générales et perspectives

Ce projet mené au sujet des stress abiotiques a mis en évidence la difficulté de trouver des réponses simples à des problématiques complexes. Vis-à-vis de la tolérance à la sécheresse comme celle aux stress thermiques, une compréhension plus fine des mécanismes en jeu est nécessaire, de même qu'une bonne prise en compte des phénomènes de compensation mobilisables à l'échelle de la plante et de la culture.

Dans l'optique d'un prolongement des travaux sur ces sujets, les enseignements suivants peuvent être retirés de ce projet :

- concernant la tolérance à la sécheresse, il est fait état dans la littérature de caractères alternativement favorables ou défavorables pour le rendement selon l'intensité et le moment du stress. C'est notamment le cas du caractère « économe » ou « dépensier » en eau reflété par les mesures de discrimination isotopique du carbone. Il faut donc veiller à représenter une large gamme d'environnements, avec et sans stress hydrique, pour s'assurer que les résultats des travaux soient transposables dans toutes les conditions normales de cultures françaises.
- La réponse à l'environnement, y compris à la sécheresse, est complexe en terme de déterminisme physiologique, et donc génétique ; il est donc possible d'atteindre un même niveau d'adaptation au milieu en mettant en œuvre des comportements physiologiques distincts. En particulier, en travaillant sur du matériel génétique inscrit au catalogue, on procède à une forme d'homogénéisation des potentiels de rendement, où les cultivars vont atteindre une réponse moyenne similaires malgré des caractéristiques différentes. Il est donc nécessaire de travailler sur un panel variétal large (>30 variétés) pour pouvoir évaluer le lien entre un caractère et la performance des variétés. Dans ce projet, le nombre de variétés était trop restreint, et certaines variétés trop extrêmes (Apache et Hysun par exemple).
- De nombreux caractères peuvent contribuer à un meilleur comportement en conditions sèches. Dans ce projet, nous nous sommes focalisé essentiellement sur un critère, travaillé en priorité par la communauté scientifique dans des conditions plus extrêmes. Il semble nécessaire d'avoir une approche moins focalisée sur un caractère particulier, et s'intéresser à un ensemble de mécanismes physiologiques potentiellement intéressants, et surtout cumulables : parmi ceux-ci, on peut lister : le fonctionnement photosynthétique (appréhendé par la double mesure des isotopes de carbone et d'oxygène), les prélèvements en eau du sol, la mise en réserve de sucres solubles, le maintien d'un couvert fonctionnel (photosynthétique) plus longtemps en fin de cycle.
- La problématique du phénotypage rapide, peu coûteux et transposable dans des schémas de sélection oblige à réfléchir à la fois aux caractères que l'on cherche à qualifier/quantifier, mais aussi à la façon d'acquérir facilement l'information. Les travaux méthodologiques menés en conditions contrôlées ou semi-contrôlées apportent des informations tant sur les mécanismes fins mis en œuvre à l'échelle du grain lors de stress hydriques ou thermiques, que sur les indicateurs à

observer pour déceler un effet. En particulier, on a pu constater que les grains basaux des épillets médians sont des puits prioritaires, et donc voient leur croissance vraisemblablement altérée en dernier, à l'opposé d'autres grains de rang inférieur. Ainsi, le choix méthodologique de l'organe à suivre doit permettre à la fois une réponse fiable mais aussi représentative d'un effet ressenti par l'ensemble du couvert. Une bonne compréhension des interactions entre les différentes échelles du végétal (cellule/organe/plante/culture) est donc indispensable.

- Les stress hydriques et thermiques sont fréquemment associés dans des conditions normales de culture, et il est vraisemblable qu'ils soient interactifs. Cependant, compte-

tenu des niveaux (imparfaits) de compréhension des mécanismes impliqués et des difficultés à identifier et sélectionner des variétés tolérantes aux uns et aux autres, il semble plus prudent de les analyser séparément dans un premier temps.

- Compte-tenu de la complexité des mécanismes impliqués dans les comportements de tolérance à la sécheresse, l'approche de modélisation semble incontournable pour explorer toute la variabilité environnementale à laquelle les cultures peuvent être exposées ; cependant, les modèles mécanistes actuels ne présentent pas systématiquement la précision nécessaire, et peuvent manquer de souplesse dans leurs formalismes ou leur paramétrage.

Références bibliographiques

Arvalis-Institut du végétal. (2012). Irrigation des céréales - blé tendre, blé dur, orge de printemps. Arvalis-Institut du végétal.

Bacon M.A. (2004) Water use efficiency in plant biology. In Bacon M.A. (ed.), Water use efficiency in plant biology. Blackwell Pub. ; CRC Press.

Bancal M-O., and Gate P. (2010) Changement climatique et culture du blé: l'essentiel des impacts. p. 155-168. In Changement climatique, agriculture et forêt en France: simulations d'impacts sur les principales espèces. Le Livre Vert du projet CLIMATOR (2007-2010). ADEME, Angers.

Blum A. (2005) Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential- are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? Australian Journal of Agricultural Research 56: 1159-1168.

Blum A. (2006) Drought adaptation in cereal crops: a prologue. p. 3-15. In Ribaut, J.-M. (ed.), Drought adaptation in cereals. Haworth, New-York.

Brisson N., Mary B., Ripoche D., Jeuffroy M., Ruget F., Nicoullaud B., Gate P., Devienne-Barret F., Antonioletti R., Durr C., Richard G., Beaudoin N., Recous S., Tayot X., Plenet D., Cellier P., Machet J., Meynard J., and Delecolle R. (1998) STICS: a generic model for the simulation of crops and their water and nitrogen balances. I. Theory and parameterization applied to wheat and corn. Agronomie 18(5-6): 311-346.

Chapman S., Cooper M., Podlich D., and Hammer G. (2003) Evaluating Plant Breeding Strategies by Simulating Gene Action and Dryland Environment Effects. 95(1): 99-113.

Condon A.G., Richards R.A., Rebetzke G.J., and Farquhar G.D. (2004) Breeding for high water-use efficiency. Journal of Experimental Botany 55(407): 2447-2460.

Ehleringer J.R., Farquhar G.D., and Hall A.E. (1993) Stable isotopes and plant carbon-water relations. Academic Press Inc., San Diego.

Farquhar G.D., Ehleringer J.R., and Hubick K.T. (1989) Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 40: 503-537.

Farquhar G.D., and Richards R.A. (1984) Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. Australian journal of plant physiology 11: 539-552.

Gate P. (1995) Ecophysiologie du blé. Technique et Documentation Lavoisier.

Hafsi M., Monneveux P., Merah O., and Djekoune A. (2001) Discrimination isotopique du carbone et rendement du blé dur dans les hautes plaines sétifiennes, Algérie. Science et changements planétaires / Sécheresse 12(1): 37-43.

Hall A.E., Mutters R.G., and Farquhar G.D. (1992) Genotypic and Drought-induced differences in carbon Isotope discrimination and gas exchange of Cowpea. Crop Science 32(1): 1-6.

Hubick K.T., Farquhar G.D., and Shorter R. (1986) Correlation between Water-use efficiency and carbon isotope discrimination in diverse peanut (*Arachis*) germplasm. Australian journal of plant physiology 13: 803-816.

Ismail A.M., and Hall A.E. (1992) Correlation between Water-Use Efficiency and Carbon Isotope Discrimination in Diverse Cowpea Genotypes and Isogenic Lines. Crop Science 32: 7-12.

Lawlor D.W. (2012) Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. Journal of Experimental Botany 64(1): 83-108.

Long S.P., Ainsworth E.A., Leakey A.D.B., Nösberger J., and Ort D.R. (2006) Food for Thought: Lower-Than-Expected Crop Yield Stimulation with Rising CO₂ Concentrations. Science 312(5782): 1918-1921.

Ludlow M.M., and Muchow R.C. (1990) A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. Advances in agronomy 43: 107-153.

Morison J.I., Baker N., Mullineaux P., and Davies W. (2008) Improving water use in crop production. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 363(1491): 639-658.

Nicolas M.E., Gleadow R.M., and Dalling M.J. (1984) Effects of Drought and High Temperature on Grain Growth in Wheat. 11(6): 553-566.

Nicolas M.E., Gleadow R.M., and Dalling M.J. (1985) Effect of Post-anthesis Drought on Cell Division and Starch Accumulation in Developing Wheat Grains. 55(3): 433-444.

Passioura J.B. (2005) Increasing crop productivity when water is scarce- from breeding to field management. Agricultural water management in press Available at file:///M:/%5CProjects%5CAT%5CAT0120%5CArabidopsis%5CJCD%5CBibliography%5CPassioura2005_review.pdf.

Rebetzke G.J., Condon A.G., Richards R.A., and Farquhar G.D. (2002) Selection for Reduced Carbon Isotope Discrimination Increases Aerial Biomass and Grain Yield of Rainfed Bread Wheat. Crop Science 42(3): 739-745.

Richards R.A. (2005) Physiological traits used in the breeding of new cultivars for water-scarce environments. Agricultural water management in press Available at file:///M:/%5CProjects%5CAT%5CAT0120%5CArabidopsis%5CJCD%5CBibliography%5CRichards2005_review.pdf.

Références bibliographiques (suite)

Richards R.A. (2006) Physiological traits used in the breeding of new cultivars for water-scarce environments. *Agricultural Water Management* 80(1â€³): 197-211.

Richards R.A., Rebetzke G.J., Condon A.G., and Van Herwaarden A.F. (2002) Breeding Opportunities for Increasing the Efficiency of Water Use and Crop Yield in Temperate Cereals. *Crop Science* 42(1): 111-121.

Scheidegger Y., Saurer M., Bahn M., and Siegwolf R. (2000) Linking stable oxygen and carbon isotopes with stomatal conductance and photosynthetic capacity: a conceptual model. *Oecologia* 125(3): 350-357.

Semenov M.A., Martre P., and Jamieson P.D. (2009) Quantifying effects of simple wheat traits on yield in water-limited environments using a modelling approach. *Agricultural and Forest Meteorology* 149(6-7): 1095-1104.

Specht J.E., Chase K., Macrander M., Graef G.L., Chung J., Markwell J.P., Germann M., Orf J.H., and Lark K.G. (2001) Soybean Response to Water: A QTL Analysis of Drought Tolerance. *Crop Science* 41(2): 493-509.

Stone P.J., and Nicolas M.E. (1995) Effect of Timing of Heat Stress During Grain Filling on Two Wheat Varieties Differing in Heat Tolerance. I. Grain Growth. *22(6)*: 927-934.

Tardieu F. (2003) Virtual plants: modelling as a tool for the genomics of tolerance to water deficit. *Trends in Plant Science* 8(1): 9-14.

Turner N.C. (1997) Further progress in crop relations. *Advances in agronomy* 58: 293-338.

Wardlaw I.F. (1971) The early stages of grain development in wheat : response to water stress in single variety. *Australian Journal of Biological Sciences* 24(4): 1047-1055.

Développement d'un outil d'optimisation des réseaux d'essais et de caractérisation des variétés

Arnaud GAUFFRETEAU¹, Valérie CADOT², Aurélie MAILLIARD^{*2}, Marie-Hélène JEUFFROY¹, Aurélie LUCIANI², Marianne CERF¹, Marie Noël MISTOU^{*1}, Lorène PROST¹, Axel OLIVIER³, Pierre RIGOLLE³, Thierry BEBIN⁴, Denis BEGHIN⁴, Thierry DEMARQUET⁴, Philippe LONNET⁴, Odile VION⁴, Jean-bruno BEAUFUME⁵, Céline DUQUE⁵, Laure DUCHALAIS⁶, Eric MARGALE⁶, Marcel MEAUSOONE⁶, Jean-Michel MOREAU⁶, Sébastien CAIVEAU⁷, Patrice SENELLART⁷, Lamia BELKACEM³, Caroline DIZIEN¹, Sabrina MARQUES², Céline ROBERT^{2,3}

* Coordinateur : Aurélie MAILLIARD, Marie Noël MISTOU

- 1 - INRA - Bâtiment EGER - Campus de l'AgroParisTech, 78850 THIVERVAL-GRIGNON
- 2 - GEVES - 25, rue Georges Morel CS 90024, Beaucauzé Cedex
- 3 - GIE Club 5 - 83, avenue de la Grande Armée, 75782 Paris Cedex 16
- 4 - Maison Florimond Desprez - BP 41, 59242 Cappelle en Pévèle
- 5 - Limagrain Verneuil Holding - Ferme de l'Etang - BP 3 - 77390 Verneuil l'Etang
- 6 - Serasem - 60, rue Léon Beauchamp BP 45, 59933 La Chapelle d'Armentières
- 7 - Syngenta Seeds - rue de Moyencourt, 78910 Orgerus

1. Introduction

L'évolution climatique et la réduction des intrants en grandes cultures conduisent à une diversification des milieux de cultures avec une plus grande expression des stress biotiques et abiotiques. Les variétés cultivées sont donc soumises à des facteurs limitants de leur rendement plus variés et selon des gammes d'intensité plus larges (e.g. David *et al.*, 2005). Dans ce contexte, le choix variétal prend une importance toute particulière. Il devra prendre en compte non seulement la valeur agronomique intrinsèque de la variété, mais aussi sa capacité à maintenir cette valeur agronomique dans des milieux plus ou moins stressants. Pour pouvoir adapter le choix variétal à l'environnement de la culture, la connaissance des valeurs agronomiques moyennes des variétés sur un réseau d'essais contrastés ne suffit plus. Il est nécessaire d'explicitier la variabilité du comportement des variétés entre les différents essais du réseau par la différence de sensibilité variétale aux stress environnementaux qui s'y expriment. Ce changement de posture impose d'être capable d'analyser finement l'interaction génotype (variété) x environnement (IGE) dans les réseaux d'essais variétaux. Pour ce faire, Lecomte (2005) et Prost (2008) ont proposé une démarche fonctionnant en deux grandes étapes. La première étape de cette démarche consiste à décrire les milieux expérimentaux par la nature des facteurs limitants et par leur contribution aux pertes de rendement évaluées sur des génotypes révélateurs. Cette étape permet d'identifier les facteurs limitants majeurs à l'échelle du réseau d'essai et de structurer le réseau d'essais en fonction des ces facteurs limitants. La seconde étape consiste à évaluer la tolérance/sensibilité des variétés testées à chacun des facteurs limitants identifiés par la première étape. Pour ce faire, l'IGE est décomposée en une somme d'interactions génotype X facteurs limitants.

Cependant, un certain nombre de problèmes restent à résoudre, sur le recueil et le traitement des données expérimentales pour alimenter l'outil, sur l'étape de diagnostic agronomique dont la stabilité des résultats doit être améliorée et qui peut être enrichie par des outils d'optimisation des réseaux, sur l'étape de caractérisation variétale dont les performances doivent être améliorées et

validées. Ce projet a donc comme vocation de faire progresser la méthode sur chacun de ces points et de fournir aux partenaires un outil informatique opérationnel.

2. Faire évoluer le recueil et le traitement des données expérimentales pour permettre la caractérisation des réseaux d'essais variétaux

► Estimation du stade Epi 1 cm

L'identification de la date de réalisation du stade épi 1 cm n'est pas très fréquente chez les acteurs de l'évaluation, la mesure étant destructive et jugée fastidieuse. C'est pourtant une donnée importante pour le diagnostic agronomique qui est actuellement estimée dans l'outil DIAGVAR par une relation linéaire en fonction de la somme de température à épiaison. Plusieurs pistes ont été explorées pour prédire le stade épi 1 cm en limitant au maximum les mesures nécessaires à l'échelle de l'essai et du réseau d'essais.

Pour limiter le nombre de mesures à réaliser sur chaque variété et dans chaque essai, nous avons testé deux relations liant la taille de l'épi et le temps thermique entre le stade épi 1 cm et la date d'observation : une relation exponentielle (Gate, 1995) [A], une relation linéaire supposant une croissance d'épi d'un mm par jour [B]. Les pistes A et B ont été testées sur une base de données regroupant 5 années, 3 lieux (Versailles, Grignon et Premesques) et une centaine de variétés.

Pour limiter le nombre de mesures à réaliser à l'échelle du réseau d'essais, nous avons testé la possibilité d'extrapoler les mesures réalisées sur un environnement à d'autres environnements. Ainsi, nous avons tenté d'extrapoler à l'ensemble des autres essais des sommes de températures entre épi 1 cm et épiaison [C] ainsi que des rapports entre somme de température à épi 1 cm et somme de température à épiaison [D] observés sur un essai seulement.

Enfin, dans le cas où aucune mesure du stade épi 1 cm n'est réalisable dans le réseau d'essais, nous avons évalué la qualité prédictive d'une relation linéaire liant la somme de

température entre semis et épi 1 cm et la somme de températures entre semis et épiaison (relation actuellement utilisée dans DIAGVAR) [E]. Le fait d'intégrer la période hivernale pouvant dégrader la relation précédente, nous avons aussi testé la possibilité de prédire la somme de température entre le 1 mars et le stade épi 1 cm à partir d'une somme de température entre le 1 mars et l'épiaison [F].

Les pistes C à F ont été testées sur un jeu de données regroupant des stades épi 1 cm et épiaison relevés entre 1988 et 1999 sur 7 lieux (Dijon, La Minière, Le Moulon, Mons, Clermont-Ferrand, Rennes et Toulouse).

Pistes	RMSEP
A	<20°j pour des tailles d'épi comprises entre 0.7 et 2 cm
B	<20°j pour des tailles d'épi comprises entre 0.7 et 1.7 cm
C	Entre 54 et 153°j selon l'essai considéré comme référence, 88°j en moyenne
D	Entre 53 et 163°j selon l'essai considéré comme référence, 89°j en moyenne
E	72°j
F	79°j

Tableau 1 : RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction) calculées pour chaque piste explorée

La somme de Températures entre le semis et le stade épi 1 cm dépend fortement de l'environnement, elle est donc difficilement extrapolable d'un environnement à un autre. Ainsi les pistes C et D sont en moyenne moins efficaces que les pistes E et F qui ne nécessitent aucune mesure du stade épi 1 cm. Il semble donc qu'il soit nécessaire de mesurer ce stade sur chaque environnement et pour chaque gamme de précocité variétale si on envisage d'établir le stade épi 1 cm avec une précision inférieure à la semaine. Par contre le nombre de mesures peut être abaissé en utilisant la relation de Gate pour extrapoler la date du stade épi 1 cm à partir de mesures réalisées entre épi 7 mm et épi 2 cm.

► Estimation d'un indice de nutrition azoté à partir de mesures SPAD

Des travaux antérieurs au projet ont montré l'intérêt de disposer d'une caractérisation de la nutrition azotée des variétés révélatrices pour mesurer la disponibilité en azote des essais (Prost, 2008). Ces travaux ont également pointé l'impossibilité de mesurer l'indicateur recommandé (indice de nutrition azotée (INN) à floraison), cette mesure étant lourde et destructive. D'autres modes de mesures du statut azoté de la plante notamment les mesures SPAD ont donc été évaluées. Nous avons testé dans cette étude sur une plus grande gamme d'environnements la relation obtenue par Prost et Jeuffroy (2007) entre l'INN et l'index SPAD (rapport entre une mesure SPAD et une valeur de référence correspondant à une mesure

SPAD sur la même variété bien alimentée en azote). Nous avons aussi étudié la possibilité de remplacer la conduite surfertilisée nécessaire au calcul de l'index SPAD par une conduite intensive classiquement réalisée dans les essais GEVES et pré-com du GIE-C5.

Les données utilisées sont issues d'essais réalisés au sein du réseau CTPS sur 4 lieux en 2009 et 11 lieux en 2010. Sur chaque lieu d'essai, une conduite bas niveau d'intrants (BNI) intégrant notamment une réduction de la dose d'azote apportée a été ajoutée aux conduites classiques du GEVES (Traitee (T) et non traitée (NT) pour les fongicides). Des mesures SPAD ont été réalisées sur les 4 variétés témoins (Caphorn, Soissons, Orvantis, Charger, Andalous selon l'essai) dans les conduites BNI, T ainsi que sur une conduite surfertilisée (S) ajoutée en bordure des essais. Des mesures d'INN ont été réalisées sur ces mêmes variétés en conduite BNI.

Nous avons évalué la capacité de modèles à prédire l'INN des plantes en BNI à partir de mesures SPAD et d'index SPAD calculés soit sur conduite T (indexT) soit sur conduite S (indexS). La relation testée est la suivante : $INN = \alpha \cdot \exp^{\beta \cdot X}$ où X est une mesure SPAD, un indexT ou un indexS.

Dans un premier temps, nous avons testé l'impact de la variété testée et de l'environnement (année x lieu) sur les paramètres du modèle (α et β). Nous avons ainsi pu montrer que dans le cas d'un modèle liant l'INN au SPAD, le paramètre β dépend de la variété ($pc=0.07$) et le paramètre α dépend de l'environnement ($pc<10^{-4}$). L'utilisation d'index (indexT ou indexS) à la place du SPAD rend la relation indépendante de la variété considérée. Cependant, le paramètre α reste très dépendant de l'environnement ($pc<10^{-4}$).

Dans un second temps, nous avons évalué par validation croisée la capacité des modèles à prédire un INN en conduite BNI à partir de mesures SPAD, d'indexS et d'indexT. Nous remarquons sur la Figure 1 que l'utilisation d'index SPAD améliore très légèrement les prédictions et que l'indexT est plus efficace que l'indexS. Ce dernier point peut s'expliquer par un plus grand nombre de mesures SPAD faites en conduite T et par le fait que la conduite S soit menée en bordure d'essai. De manière générale, les erreurs de prédictions restent très importantes puisqu'elles sont de l'ordre de grandeur de l'écart-type des INN observés en BNI ($sd=0.0889$). Nous voyons clairement sur les graphiques que les prédictions d'INN n'explorent pas la gamme d'INN observée sur le réseau d'essais.

Nous concluons de cette étude que si les mesures SPAD sont de bons outils de pilotage de l'azote au sein d'un environnement, elles ne permettent pas de comparer le statut azoté de plantes cultivées dans des environnements différents et ne permettent donc pas de réaliser un diagnostic des stress azotés sur un réseau d'essais.

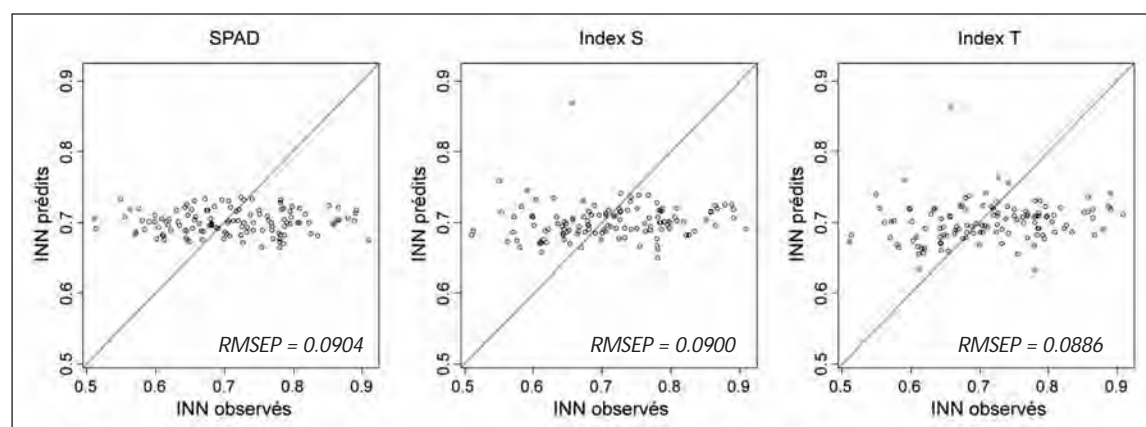


Figure 1 : INN Prédits par les modèles SPAD, IndexS et IndexT en fonction des INN mesurés

► **Homogénéisation des pratiques de notation des maladies et mise au point d'un indicateur fiable pour leur quantification**

Une étude a été réalisée pour analyser les pratiques de notation maladies dans les réseaux d'essais d'évaluation variétale, à partir d'enquêtes et d'observations au sein des structures membres du projet (GIE Club 5 et GEVES), dans le but de proposer des solutions d'ajustement entre la pratique expérimentale et l'utilisation de ces données dans l'outil DIAGVAR.

Suite à cette étude, le GEVES a poursuivi ce travail méthodologique sur l'amélioration de l'homogénéité des notations dans le réseau d'inscription variétale CTPS. Pour cela, plusieurs pistes ont été explorées et discutées avec les expérimentateurs du GIE Club 5 lors d'entretiens, autour de deux thèmes principaux : la formation à la notation et l'évaluation de la pression de maladie dans les essais.

Harmonisation des pratiques de notation des maladies :

L'étude des pratiques de notation dans les réseaux d'évaluation variétale a montré que les outils actuels de formation ne permettaient pas de rendre compte de toute la complexité des situations de notation.

Pour améliorer l'homogénéité des pratiques, et donc des notes, au sein du réseau CTPS, **trois actions ont été réalisées :**

- 1 - **La mise au point de 3 didacticiels** par le GEVES, en relation avec le réseau INRA PIC à Dijon, pour entraîner les expérimentateurs du réseau VATE à se recaler sur une même échelle de notation à trois maladies du blé :
 - **Septoriose (*Septoria tritici*)** : 227 prises de vues avec 92 questions test,
 - **Rouille brune** : 187 prises de vues avec 117 questions tests,
 - **Rouille jaune** : 136 prises de vues avec 49 questions tests.

Les photos sélectionnées correspondent à une note CTPS officielle mise au champ par un ou plusieurs expérimentateurs. Pour chaque variété à évaluer, un groupe de 3 ou 4 photos est présenté, issue de la même parcelle. Accès sur le site web Quantipest (Figures 2 et 3) :

http://194.94.61.13/quantipest/quantipest/quantipest_utilisateur/index_appli.php?portail=Agrescience&produit=quantipest&main=63&ssrub1=93&ssrub2=94&ssrub3=339&id_fiche=134

- 2 - **Des notations collectives**, permettant aux expérimentateurs de se recaler entre eux ainsi qu'une formation sur l'identification des pathogènes ont été réalisés au GEVES en 2012. Ces journées expérimentateurs, organisées par le GEVES, ont lieu tous les 2 à 3 ans.

- 3 - **Une réflexion sur le rôle des régionaux GEVES pour le recalage des notateurs.**

Mise au point d'un indicateur fiable de la pression maladie :

Cette étude, réalisée par le GEVES en relation avec l'UMR SAD-APT de l'INRA de Grignon, avait pour objet d'identifier un indicateur fiable et homogène de la pression biotique, pour faciliter le diagnostic agronomique et affiner les sorties de DIAGVAR, en évaluant plus finement l'impact du facteur limitant Bioagresseur sur les pertes de rendement. Jusqu'à présent, la pression des maladies dans DIAGVAR était mesurée par les notes établies sur des variétés sensibles mais les précédents travaux réalisés par l'INRA avaient montré les limites d'un tel indicateur.



Figure 2 : Page d'accueil de Quantipest



Figure 3 : Exemple de page d'entraînement à la notation

Cette étude a été réalisée, à partir des notes CTPS de sensibilité variétale du blé tendre à 4 maladies majeures : **la septoriose (*Mycosphaerella graminicola*), la rouille brune, l'oïdium et la rouille jaune**. En tout, 5 indicateurs ont été évalués (cf. Tableau 2).

Indicateurs testés
11 = Moyenne des notes d'attaque sur l'ensemble des variétés de l'essai
12 = Moyenne des notes d'attaque des témoins de l'essai
13 = Note d'attaque maximale sur l'essai
14 = 5 + (note de sensibilité du témoin sensible dans l'essai - note de sensibilité théorique du témoin sensible)
15 = Moyenne des notes d'attaques sur le quart des variétés les plus attaquées de l'essai

Tableau 2 : Liste des indicateurs de pression maladie testés

Le travail a consisté à identifier l'indicateur de pression maladie le plus fiable, en étudiant :

- les avantages et inconvénients de chaque indicateur (facilité d'obtention, moindre dépendance par rapport aux génotypes présents, finesse des résultats)
- les corrélations de Spearman entre ces indicateurs et la distribution des notes de ces 4 maladies,

- la valeur prédictive de chaque indicateur :
 - par une méthode de validation croisée, sur les données de 2007-2011, en calculant le coefficient de corrélation de Pearson entre l'indicateur I (n-X1) et la note X1 ainsi que le % significativité (cf. Tableau 3).
 - la corrélation entre les indicateurs et les pressions réelles définies à partir des revues « Choisir et Décider, Céréales 2
 - la comparaison des cartographies des indicateurs I1 et I5, sur les données 2004-2011, avec les pressions réelles, en discrétisant les données qualitatives en classes de pression d'après la méthode de Jenks (Cf. Figure 4 : cas de la rouille brune).

Concernant la septoriose et la rouille brune, les résultats des 3 méthodes d'évaluation des différents indicateurs convergent pour définir I1, comme l'indicateur le plus fiable pour décrire la pression maladie d'un essai. Pour l'oïdium et la rouille jaune, I1 s'avère le plus prédictif avec la méthode de validation croisée mais I5 est plus performant selon l'étude de la cartographie : I5 permet de mieux appréhender la distribution asymétrique des notes de ces deux maladies, avec une plus grande proportion de variétés résistantes. Néanmoins l'étude de la cartographie des pressions réelles issues de Choisir demanderait à être complétée par des données du BSV ; c'est pourquoi, pour des questions de facilité de mise en oeuvre, nous avons retenu I1 pour toutes les maladies.

Suite à cette étude, l'indicateur retenu vis-à-vis des quatre bioagresseurs étudiés pour intégration dans DIAGVAR est l'indicateur I1, moyenne des notes d'attaque sur l'ensemble des variétés de l'essai.

Deux autres perspectives d'utilisation de cet indicateur de pression maladie sont envisagées :

- évaluer plus finement la sensibilité d'une variété à une maladie en fonction de la covariable pression biotique de l'essai,
- servir d'outil de caractérisation des réseaux d'évaluation variétale, en terme de pressions en bioagresseurs notamment pour le réseau CTPS, et ce à différentes échelles (nationale, régionale et locale) afin de permettre l'optimisation de ce réseau.

Bioagresseurs	Méthode de validation croisée	I1	I2	I3	I5
Septoriose	Coefficient corr. Pearson	0.76	0.74	0.67	0.73
	% corrél. significatives	77,1	72,8	65,8	71,3
Rouille brune	Coefficient corr. Pearson	0.77	0.73	0.61	0.72
	% corrél. significatives	81,3	80,1	63,1	78,8
Oïdium	Coefficient corr. Pearson	0.72	0.69	0.54	0.68
	% corrél. significatives	49,4	44,5	25,8	43,3
Rouille jaune	Coefficient corr. Pearson	0.57	0.49	0.28	0.52
	% corrél. significatives	35,3	35,6	10,8	32,8

Tableau 3 : Coefficients de corrélations de Pearson issus de la méthode de validation croisée sur les données CTPS 2007-2011, et pourcentage de leurs significativités - meilleures corrélations en rouge

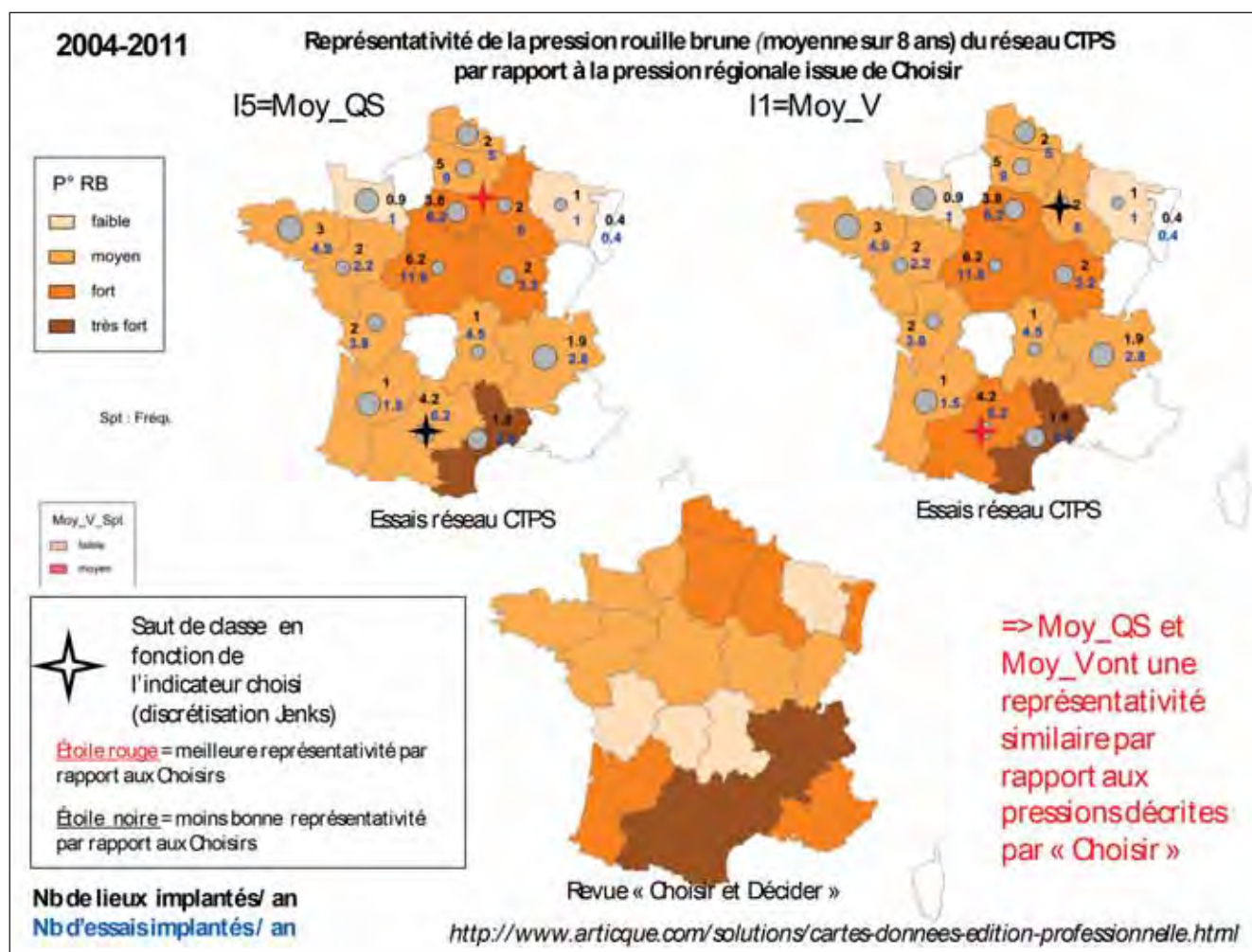


Figure 4 : Représentativité des pressions régionales CTPS rouille brune par rapport aux pressions régionales réelles en fonction des indicateurs I1 et I5

► Analyse spécifique de l'effet de certains facteurs limitants par régression quantile

Les facteurs abiotiques ont généralement une action sur le rendement qui dépend de leur niveau. Pour bon nombre de facteurs limitants calculés dans DIAGVAR, les seuils au-delà desquels ils impactent significativement le rendement ont été déterminés de manière arbitraire faute de méthodologie efficace pour mieux les établir. Déterminer le seuil d'action d'un facteur limitant nécessite de connaître la courbe de réponse du rendement à ce facteur limitant. Cette courbe d'action est généralement difficile à établir à partir d'essais « non factoriels » car de nombreux facteurs limitants agissent conjointement sur le rendement. Pour palier ce problème au moins partiellement, nous avons utilisé la régression quantile. Plutôt que de chercher à estimer l'évolution du rendement moyen en fonction du facteur limitant d'intérêt comme dans le cas d'une estimation par les moindres carrés par exemple, nous cherchons à estimer l'évolution de quantiles élevés (0.8, 0.85 et 0.9) pour le rendement. Ce faisant, nous avons moins de chance d'avoir une confusion entre l'effet du facteur limitant d'intérêt sur le rendement et l'effet d'autres facteurs limitants. Cette méthode a été proposée et testée par Makowski *et al* (2007) dans le cas du diagnostic agronomique.

Dans le cadre de cette étude, la régression quantile a été testée sur l'indicateur « stress haute température » à montaison et remplissage. La bibliographie propose un seuil de 25°C au-delà duquel une augmentation de température impacterait négativement le fonctionnement de la plante. Nous avons tenté de valider ce seuil sur un jeu de données regroupant des essais menés sur plus de 200 environnements contrastés entre 1999 et 2008 et impliquant une dizaine de variétés soit en tout 552 situations (combinaison environnement x variétés). Pour pouvoir utiliser conjointement les données issues des différentes variétés, nous avons exprimé les rendements en pourcentage du rendement potentiel de chaque variété. Nous avons analysé les données de la façon suivante :

- Nous avons comptabilisé, sur les phases de montaison et remplissage, le nombre de jours où la température maximale est comprise entre 19 et 20°C, entre 21 et 22°C, entre 23 et 24°C, entre 25 et 26°C.
- Pour chacun de ces 4 intervalles, nous avons réalisé une régression quantile sur modèle linéaire en considérant les quantiles $\tau=0.80$, $\tau=0.85$ et $\tau=0.90$.
- Si nous obtenons une pente négative dont l'intervalle de confiance à 95% ne contient pas 0 pour un intervalle de température donné, nous supposons que le seuil au-delà duquel la température impacte le rendement se trouve dans cet intervalle.

La Figure 5 montre que dans le cas d'un stress haute température à montaison, quelque soit le quantile considéré, le seuil au-delà duquel une augmentation de température impacte significativement et négativement le rendement est compris entre 23 et 24°C. L'impact semble cependant plus important et plus stable pour des températures supérieures

à 25°C. Les mêmes résultats sont observés durant le remplissage. La méthode semble donc être efficace, elle donne des résultats cohérents avec ceux de la bibliographie.

3. Mise au point d'une méthode opérationnelle d'analyse de l'interaction GxE

► Test de méthodes statistiques pour le diagnostic agronomique

Le diagnostic agronomique dans DIAGVAR utilise une méthode statistique sélective, la régression stepwise bidirectionnelle. Cette méthode consiste à introduire successivement dans le modèle les variables expliquant le plus les variations de rendement. A chaque étape, les variables déjà introduites dont l'effet sur le rendement n'est plus significatif sont retirées. La procédure s'arrête quand toute nouvelle introduction de variable n'améliore pas significativement le modèle. Dans le cadre de DIAGVAR, comme les variables explicatives ont été construites pour abaisser le rendement, elles ne sont introduites dans le modèle que si leur effet sur le rendement est négatif.

Lors des tests, les acteurs ont constaté qu'une faible variation de la combinaison des milieux en entrée ou une très légère modification des données d'un milieu pouvait aboutir à des résultats très différents en termes d'identification des facteurs limitants explicatifs des pertes de rendement (Prost, 2008). Cette instabilité des résultats du diagnostic agronomique est largement due aux corrélations nombreuses qui existent entre les indicateurs de facteurs limitants explicatifs du rendement et par la mauvaise capacité des méthodes sélectives comme la stepwise à gérer ces corrélations. Nous avons testé dans cette étude une méthode de diagnostic agronomique alternative basée sur l'utilisation de la régression PLS (Wold, 1983). La régression PLS consiste à régresser le rendement sur des composantes orthogonales, combinaisons linéaires des variables explicatives, établies de manière à maximiser la covariance avec le rendement. La méthode est bien adaptée à l'utilisation de variables explicatives corrélées. Le nombre de composantes à considérer peut être défini par validation croisée. L'indicateur VIP associé à chaque variable explicative permet de juger de sa capacité à expliquer le rendement. Dans notre cas, pour identifier les variables les plus explicatives du rendement tout en conservant la contrainte de signe, nous avons retiré successivement les variables ayant un effet positif sur le rendement, puis nous avons sélectionné parmi les variables restantes celles qui présentaient un VIP supérieur à 0.8.

Pour comparer les deux méthodes de diagnostic agronomique nous avons utilisé des rendements mesurés pour la variété Caphorn cultivée selon une conduite intensive et une conduite intégrée en 2007 et 2008 à Toulouse, Clermont, Le Moulon, Mons, Rennes, Cappelle, Orgerus, Premesques et Verneuil. Les environnements sont décrits par 38 indicateurs de stress environnementaux.

	$\tau = 0.8$			$\tau = 0.85$			$\tau = 0.9$		
	Coef.	Borne inf.	Borne sup.	Coef.	Borne inf.	Borne sup.	Coef.	Borne inf.	Borne sup.
19-20°C	-0.45	-0.84	0.03	-0.65	-1.36	0.14	-1.34	-1.77	0.81
21-22°C	1.19	0.35	1.48	0.59	0.22	1.79	0.88	-0.66	1.31
23-24°C	-3.23	-3.70	-1.04	-2.46	-4.49	-0.63	-2.34	-6.79	-0.50
25-26°C	-3.83	-4.34	-3.33	-4.61	-5.11	-1.58	-3.91	-7.43	-1.08

Figure 5 : Pentes estimées sur la phase de montaison pour chaque intervalle de températures et chaque quantile (τ). Les bornes des intervalles de confiance à 95% associés sont présentés dans les colonnes Borne inf. (borne inférieure) et Borne sup. (borne supérieure)

Pour juger de la stabilité des résultats obtenus par les deux méthodes testées, nous avons généré à partir de la base de données initiale (32 situations en tout), 1000 jeux de données de 32 situations chacun par tirage aléatoire avec remise (bootstrap non paramétrique). Pour chaque jeu de données produit, nous avons réalisé un diagnostic agronomique selon chacune des deux méthodes. À partir des 1000 résultats obtenus, nous avons calculé pour chaque indicateur de stress une fréquence de sélection et une estimation moyenne de son effet accompagnée de son écart-type.

Plus la fréquence de sélection des variables s'éloigne de 50%, plus nous pouvons considérer que la méthode statistique est stable quant au résultat de sélection qu'elle fournit. Ainsi, si une variable est sélectionnée dans 40 à 60% des cas, nous pouvons considérer que le résultat du diagnostic est instable pour cette variable (classe 1). Au contraire, si une variable est sélectionnée dans moins de 20% ou plus de 80% des cas, nous pouvons considérer que le diagnostic pour cette variable est stable (classe 2). Avec 74% des variables en classe 2 et seulement 5% en classe 1, nous pouvons considérer que la PLS associée au critère VIP donne des résultats de sélection plus stables que la stepwise qui place 61% des covariables en classe 2 et 11% en classe 1.

Les écart-types associés aux estimations fournis par la PLS sont toujours plus faibles que ceux issus de la stepwise. De plus, le rapport entre ces écart-types et les estimations moyennes (généralement plus élevées dans le cas de la stepwise) est plus faible avec la PLS dans 66% des cas. Nous pouvons donc en conclure que la PLS identifie les stress environnementaux majeurs et estime leurs effets avec plus

de stabilité que la stepwise qui a tendance à surestimer l'effet des stress sélectionnés (biais de sélection).

► Adapter une analyse des milieux d'essais

Suite au diagnostic agronomique, chaque environnement d'essai est caractérisé par les pertes de rendements des variétés révélatrices occasionnés par chacun des stress sélectionnés par le diagnostic agronomique. Cette caractérisation permet de structurer le réseau d'essais. Pour ce faire Christophe Lecomte propose d'utiliser une classification ascendante hiérarchique qui regroupe successivement les environnements ou groupes d'environnements les plus proches jusqu'à ne former qu'un seul groupe. Cependant, différentes méthodes existent pour choisir les environnements à regrouper à chaque étape et calculer les distances entre les groupes créés. Nous avons exploré les différentes méthodes de regroupement des environnements d'essais proposées par la fonction hclust du logiciel statistique R et avons finalement sélectionné la méthode dite de « Ward ». Cette dernière explique plus de variabilité environnementale avec un nombre réduit de groupes.

Pour faciliter l'interprétation des groupes créés, nous avons ajouté dans l'outil un ensemble de tests issus de la librairie R FactoMineR permettant, pour chaque groupe d'environnements créé, d'identifier les stress environnementaux qui ont un effet moyen au sein du groupe significativement différent (supérieur ou inférieur) de leur effet moyen sur le réseau d'essais. La Figure 6 donne un exemple de représentation graphique obtenue sur un réseau INRA 2001-2002.

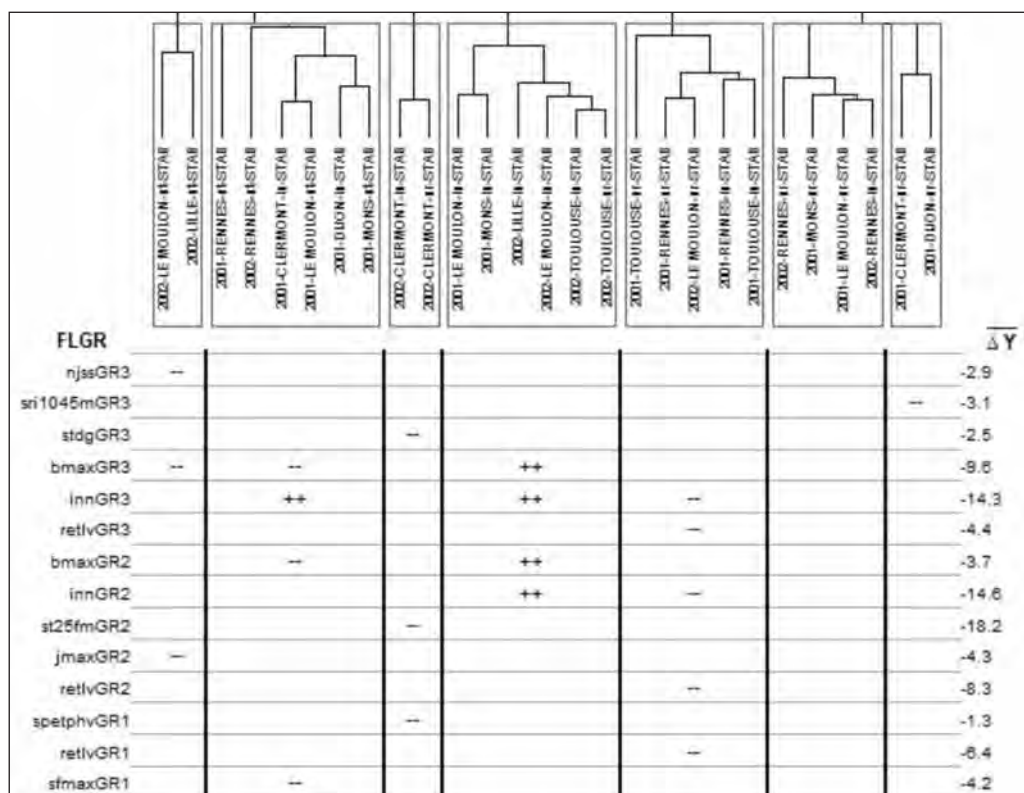


Figure 6 : Table présentant pour chaque groupe l'impact des indicateurs de stress sur le rendement de trois variétés révélatrices (GR1 : Isengrain, GR2 : Récital, GR3 : Soissons) en fonction de leur impact moyen à l'échelle du réseau d'essais. Seules les indicateurs qui ont un impact sur le rendement d'une des variétés révélatrices significativement différent de la moyenne dans au moins un groupe sont présentés à gauche (FLGR). L'impact moyen de chaque indicateur sur le rendement de la variété révélatrice à l'échelle du réseau d'essais est donné à droite (ΔY). La notation -- signifie que l'impact de l'indicateur de stress sur le rendement de la variété révélatrice au sein du groupe est inférieure à la moyenne. Inversement la notation ++ signifie que l'impact de l'indicateur au sein du groupe est supérieure à la moyenne. Les cases vides signifient que l'impact de l'indicateur au sein du groupe n'est pas significativement différent de la moyenne.

► Mise au point d'une méthode opérationnelle de caractérisation des variétés

L'étape de caractérisation variétale de l'outil DIAGVAR permet, par une analyse de l'interaction GxE (IGE), d'évaluer la résistance de variétés testées aux principaux stress environnementaux identifiés par le diagnostic agronomique. Cette étape n'ayant pas fait l'objet d'une évaluation poussée par les utilisateurs avant le projet, l'objectif de cette étude était d'évaluer sa qualité prédictive.

Différentes méthodes d'analyse de l'IGE ont été testées dans cette étude, parmi elles : (i) une régression factorielle avec et sans contrainte de signe sur l'effet des stress environnementaux (méthode originelle dans DIAGVAR), (ii) une méthode en deux étapes couplant un modèle mixte pour estimer le rendement moyen des variétés et une régression PLS sur la matrice d'interaction avec ou sans sélection sur les indicateurs de stress introduits dans le modèle.

Le réseau d'essais utilisé dans cette étude est le même que celui brièvement présenté dans le paragraphe II.1 (2 Années, 9 Lieux, 16 combinaisons Année x Lieu et 2 conduites). Les variétés en essai sont Apache, Arche, Caphorn, Charger, Koreli, Mendel, Recital, Sankara et Soissons. Toutes les variétés ne sont pas présentes partout, le plan d'expérimentation est donc très déséquilibré comme le sont la majorité des réseaux d'essais variétaux. 14 indicateurs de stress préalablement sélectionnés par le diagnostic agronomique ont été utilisés comme covariables environnementales dans les analyses.

Nous avons réalisé une validation croisée sur les combinaisons Lieu x Année. Ainsi pour chacune des 16 combinaisons Lieu x Année, nous estimons nos modèles sur l'ensemble des données sauf celles collectées sur la combinaison considérée, et nous prédisons le rendement de chaque variété dans chacune des 2 conduites pour cette dernière combinaison à partir du modèle établi.

Pour chaque environnement (combinaison Lieu x Année x ITK), nous avons réalisé l'ensemble des couples de variétés possibles et pour chacun nous avons calculé 2 critères de qualité des modèles :

- Critère 1 : différence entre l'écart de rendements observé entre les deux variétés et l'écart de rendement prédit : capacité des modèles à estimer un écart de rendement entre variétés ;
- Critère 2 : différence entre le rendement observé de la variété choisie par l'expérimentation et le rendement observé de la variété choisie par chaque modèle (0 si le modèle identifie la meilleure variété, l'écart de rendements observé si ce n'est pas le cas) : capacité du modèle à identifier la meilleure variété.

Nous considérons que les méthodes d'analyse testées présentent une valeur ajoutée si les choix variétaux qu'elles proposent sont meilleurs que ceux fournis par une simple estimation de l'effet variétal sur le jeu de données de calibration. Cette valeur a servi de référence par la suite.

Nous voyons sur le Tableau 4 que les approches associant modèles mixtes et régression PLS semblent présenter une plus-value tant pour prédire des différences de rendement entre variétés que pour faire de la préconisation variétale. Ce n'est apparemment pas le cas de la régression factorielle dont les résultats sont moins bons que la valeur de référence quelque soit l'indicateur considéré. Remarquons cependant que les résultats sont encore plus mauvais sans contrainte de signe pour l'introduction des covariables dans le modèle.

Enfin, les méthodes de sélection associées à la régression PLS n'ont pas montré un grand intérêt. Ceci peut sembler logique dans notre cas puisque les covariables avaient déjà fait l'objet d'une sélection par le diagnostic agronomique.

Méthode d'analyse	Critère 1	Critère 2
Référence	5.74	1.22
Régression factorielle	37.47	2.35
Régression factorielle + contrainte de signe	6.96	1.26
Modèle mixte + PLS	5.15	0.98
Modèle mixte + PLS sélective	5.18	1

Tableau 3 : Coefficients de corrélations de Pearson issus de la méthode de validation croisée sur les données CTPS 2007-2011, et pourcentage de leurs significativités - meilleures corrélations en rouge

4. Développement d'un outil informatique sous R

Avant le projet, l'outil DIAGVAR existait dans différents langages informatiques. Dans sa version sous SAS, l'outil était très peu ergonomique et son utilisation par une personne non initiée était impossible. Dans sa version sous C++, l'outil était plus ergonomique mais sa maintenance et son amélioration par le concepteur était devenue difficile. Dans le cadre de ce projet, nous avons choisi de travailler sous R (version 2.12.2 - <http://cran.r-project.org/>), logiciel gratuit dont le langage est accessible pour le concepteur non informaticien et qui permet de réaliser une grande diversité d'analyses statistiques et de représentations graphiques.

Ainsi le calcul des indicateurs de stress environnementaux, l'ensemble des techniques statistiques et des graphiques qui constituent la méthode DIAGVAR telle que décrite par Lecomte (2005) et Prost (2008) a été reprogrammé sous R. Les différentes méthodes statistiques testées dans la partie II pour le diagnostic agronomique (régression PLS avec et sans contrainte de signe) et la structuration du réseau d'essais (classification ascendante hiérarchique selon la méthode de Ward et comparaison des groupes produits selon le niveau des stress environnementaux qui s'y expriment) ont été ajoutés dans l'outil. Seule la méthode de caractérisation variétale basée sur l'utilisation conjointe d'un modèle mixte et d'une régression PLS n'a pas encore pu être incorporée dans l'outil. À la demande des utilisateurs, un ensemble de graphiques nouveaux ont été produits :

- Avant toute analyse, des matrices de corrélation entre indicateurs de stress environnementaux ainsi que des graphiques présentant la distribution des indicateurs sur le réseau d'essais (Figure 7) offrent à l'utilisateur une première image de son réseau d'essais.
- Suite au diagnostic agronomique, une représentation conjointe des résidus et des erreurs de validation croisée permet de repérer les environnements mal représentés par le modèle établi (forts résidus) et ceux qui impactent fortement la valeur des paramètres (faibles résidus et fortes erreurs de prédiction). Une représentation de la distribution des pertes de rendement estimées pour chacun des stress environnementaux sélectionnés donne à l'utilisateur une nouvelle image de son réseau d'essais où le niveau des stress est pondéré par leur effet sur le rendement (Figure 8).

- Suite à la caractérisation des variétés, un Tableau récapitulatif, pour chaque variété testée, ses niveaux de productivité et de résistances aux stress sélectionnés permet à l'utilisateur de comparer rapidement ses profils variétaux (Figure 9).

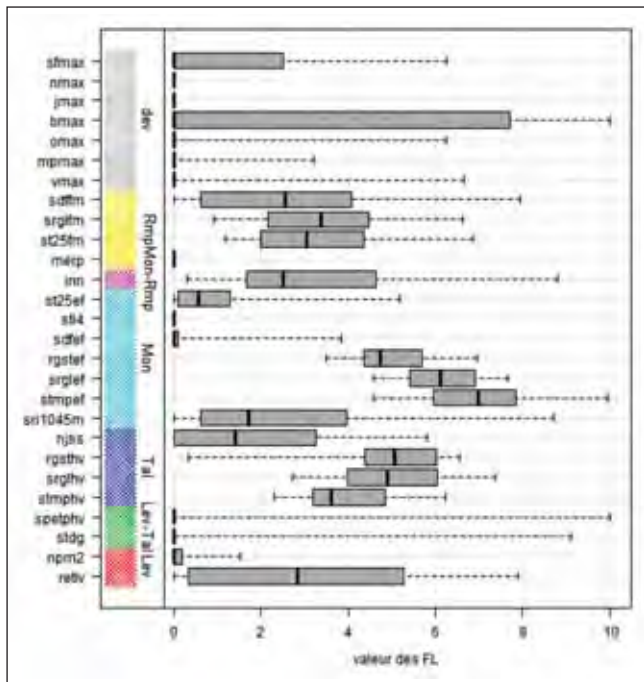


Figure 7 : Distribution des indicateurs de stress environnementaux (en ordonnée) observés sur le réseau d'essais pour la variété Soissons

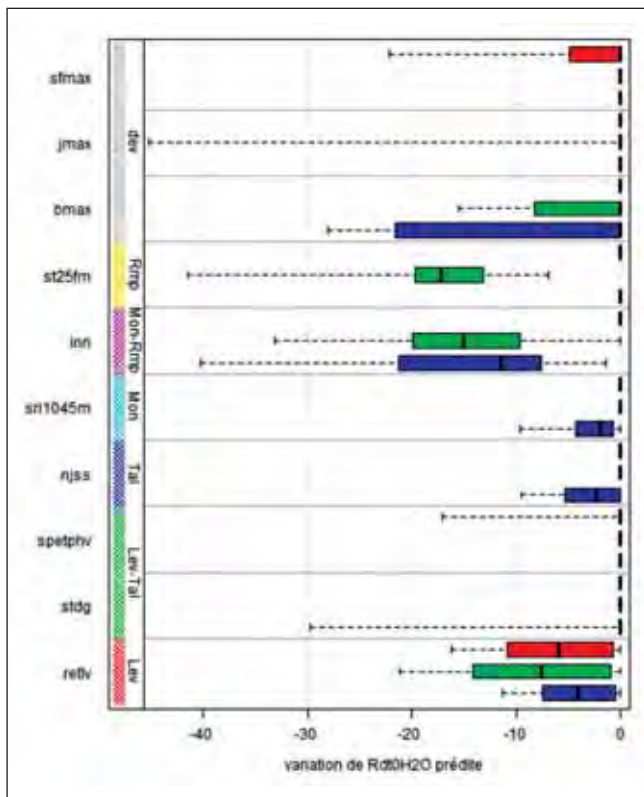


Figure 8 : Pertes de rendements estimées pour les indicateurs sélectionnés par le diagnostic sur les variétés Camprémy (rouge), Récital (vert) et Soissons (bleu)

	intercept	bmax	bmax_HP	inn	inn_HP	relv	sflmax	sflmax_HP	sr1045m	stdg	NS
SENGRAN	0.79	-1.24	0.28	1.71	-0.35	0.18	1.8	5.83	-0.19	-0.07	
HYNGRÉCA	0.88	1.31	0.29	0.38	-0.11	-0.22	-0.88	-0.06	0.47	0.1	
ORATORIO	4.1	0.28	1.27	-1.21	-0.8	-0.22	-0.68	-1.88	0.27	-0.88	
ARCHE	0.1	-0.24	1.42	0.18	-0.44	-0.85	-0.13	0.84	-0.1	0.18	
RUMBA	1.44	0.71	0.84	0.42	-0.05	0.84	-2.88	-1.81	0.78	0.11	st25flm
SOISSONS	-0.46	-1.86	-0.9	-1.71	-0.38	0.59	1.12	0.28	-0.23	-0.69	
SENAI	-4.91	2.88	1.47	1.2	0.49	-2.18	0.88	0.37	0.28	0.48	
CAMPREMY	0.88	0.51	-1.18	1.2	0.48	0.82	0.88	0.38	0.11	0.88	
RECITAL	-0.77	0.38	-0.48	0.81	1	-0.8	2.22	0.48	-0.89	0.07	

Figure 9 : Tableau de caractérisation des variétés. L'intercept donne la productivité moyenne de chaque variété, les autres colonnes en couleur donnent les notes de tolérance des variétés aux stress sélectionnés. Les colonnes où l'indicateur de stress est suivi de la notation HP donnent les notes de tolérances variétales corrigées de l'effet de la précocité. Les cases sont en vert lorsque l'estimation dépasse 0 de plus d'un écart-type, elles sont en rouge lorsque l'estimation est inférieure à 0 de plus d'un écart-type, elles sont en orange lorsque la valeur absolue de l'estimation est inférieure à un écart-type. La colonne NS donnent les indicateurs pour lesquelles les tolérances variétales sont similaires.

L'outil fourni n'est pas un outil interfacé type « clique bouton ». Cependant, il a été pensé de manière à permettre son utilisation par des personnes peu familières du logiciel R. Ainsi, une fois la fonction DIAGVAR lancée sous R, de nombreuses boîtes de dialogue guident l'utilisateur tout au long de la démarche et l'ensemble des tables et graphiques produits sont exportés.

L'outil DIAGVAR est constitué d'un ensemble de 34 fonctions R. La structure compartimentée du programme facilite l'insertion de nouvelles fonctions et rend possible l'adaptation de l'outil à de nouvelles espèces et à des fichiers d'entrées non issus du calcul par DIAGVAR. Ce format devrait faciliter l'appropriation de l'outil par les partenaires et son adaptation à leurs organisations de données.

5. Conclusion

Ce projet a permis de faire progresser chaque étape de la démarche DIAGVAR. Des connaissances ont été produites pour faciliter et homogénéiser le suivi des essais et ainsi améliorer la caractérisation de l'environnement rencontré par la culture tout au long de son cycle cultural. De nouvelles méthodes d'analyse statistique plus performantes ont été testées et incorporées dans l'outil. Les sorties de l'outil (tables et graphiques) ont été complétées pour faciliter l'interprétation des résultats.

L'outil a été éprouvé par les partenaires du projet sur des jeux de données externes mis à disposition dans le cadre d'une formation collective de 2 jours sur l'outil, puis individuellement sur leurs propres jeux de données.

L'ensemble des codes nécessaires au fonctionnement de l'outil ainsi que des bases de données d'entraînement ont été fournis aux partenaires du projet accompagnés d'une notice d'utilisation. Cette notice décrit chaque étape de la démarche d'un point de vue théorique (modes de calcul et méthodes statistiques utilisées), opérationnel (présentation et clés de lecture des tables et graphiques produits) et informatique (tables d'entrées nécessaires et structure du programme).

Références bibliographiques

David C., Jeuffroy M.H., Henning J., Meynard J.M. (2005) Yield variation in organic winter wheat: a diagnostic study in the Southeast of France. *Agronomy for Sustainable Development*, 25, 213-223

Gate P. (1995) *Ecophysiologie du blé. De la plante à la culture.* Lavoisier, Tec and Doc, Paris, 430p.

Lecomte C. (2005) L'évaluation expérimentale des innovations variétales. Proposition d'outils d'analyse de l'interaction génotype - milieu adaptés à la diversité des besoins et des contraintes des acteurs de la filière semences. Thèse de Docteur-Ingénieur de l'INAPG, 174p. + annexes

Makowski D., Doré T., Monod H. (2007) A new method to analyse relationships between yield components with boundary lines, *Agronomy for Sustainable Development*, 27, 119-128

Prost L. (2008) Modéliser en agronomie et concevoir des outils en interaction avec de futurs utilisateurs : le cas de la modélisation des interactions génotype-environnement et de l'outil Diagvar. Thèse de Doctorat, AgroParisTech, Paris (France)

Prost L., Jeuffroy M.H. (2007) Replacing the nitrogen nutrition index by the chlorophyll meter to assess wheat N status, *Agronomy for Sustainable Development*, 27, 321-330

Prost L., Makowski D., Jeuffroy M.H. (2008) Comparison of stepwise selection and Bayesian model averaging for yield gap analysis. *Ecological Modelling*, 219, 66-76.

Wold S., Alabano C., Dunn III W.J., Esbensen K., Hellberg S., Johansson E., Sjöström H. (1983) Pattern recognition : Finding and Using Regularities in Multivariate Data. in Proc. IUFOST Conf. "Food Research and Data Analysis", Martens J. (Ed), Applied Science Publications, London

Caractérisation du rythme de développement du blé tendre pour des variétés adaptées aux risques climatiques

François-Xavier OURY*¹, Michel ROUSSET*², Emmanuel HEUMEZ³, Jérôme AUZANNEAU⁴, Jean-Michel DELHAYE⁵, Sébastien DESHAYES⁶, Sylvie DUTRIEZ⁷, David GOUACHE⁸, Pascal GIRAUDEAU⁹, Christophe MICHELET¹⁰, Philippe LEREBOUR¹¹, Jayne STRAGLIATI⁶, Stephen SUNDERWIRTH¹²

* **Coordinateur** : Michel ROUSSET (mrousset@moulon.inra.fr) et François-Xavier OURY (fxoury@clermont.inra.fr)

- 1 - INRA UMR GDEC - 234 avenue du Brézat, 63100 Clermont-Ferrand
- 2 - INRA UMR GV - Ferme du Moulon, 91190 Gif-sur-Yvette
- 3 - INRA UMR SADV - Estrées-Mons, 80203 Péronne
- 4 - Agri-Obtentions - Chemin de la petite Minière, 78041 Guyancourt
- 5 - Lemaire-Deffontaines - Auchy-les-Orchies, 59310 Orchies
- 6 - Limagrain - 5 rue de l'Egalité, 28130 Chartainvilliers
- 7 - Caussade Semences - 82300 Caussade
- 8 - Arvalis-Institut du Végétal - 3, rue Joseph et Marie Hackin, 75116 Paris
- 9 - Secobra Recherches - centre de Bois Henry, 78580 Maule
- 10 - R2n - route d'Epiney, 28150 Louville-la-Chenard
- 11 - Unisigma - 2 rue du petit Sorri, 60480 Froissy
- 12 - SARL Adrien Momont - RN154, 28150 Allones

1. Introduction

Le blé se caractérise par une grande capacité d'adaptation à diverses conditions environnementales. Son rythme de développement, qui dépend des conditions de milieu et du génotype, peut permettre à la plante d'échapper à des stress biotiques et abiotiques.

C'est ainsi, par exemple, que :

- les blés de type "hiver" nécessitent une longue période de températures froides avant que les primordia floraux ne se développent. Ce processus, la vernalisation, limite les risques de dégâts de froid sur des méristèmes fragiles qui apparaîtraient prématurément en hiver.
- les blés sensibles à la photopériode nécessitent une période de jours longs pour permettre la transition de l'état végétatif vers l'état reproducteur de l'apex de la plante. Ces besoins en jours longs à la sortie de l'hiver retardent les stades de la différenciation des pièces florales et de la méiose, qui constituent des étapes de très grande sensibilité de la plante à des froids tardifs en sortie d'hiver, ou à des déficits énergétiques.
- les blés à forte précocité intrinsèque et peu exigeants en longueur de jour peuvent fleurir de manière précoce et éviter ainsi les sécheresses de fin de cycle et/ou les périodes de stress thermique au cours du remplissage du grain.

En France, la hausse des températures due au changement climatique a conduit à un avancement des stades des cultures de l'ordre d'une semaine au cours des 25 dernières années (Gate *et al*, 2008). Pourtant, des études récentes (Brisson *et al*, 2010 ; Oury *et al*, 2012) ont montré que ce même changement climatique était la cause principale de la stagnation des rendements observée depuis le milieu des années 90. Cela signifie que l'évitement naturel des stress de fin de cycle permis par l'avancement des stades de végétation, n'a pas été suffisant pour compenser complètement l'accroissement de ces stress.

Cependant, des simulations réalisées sur la base d'un modèle de phénologie du blé tendre et de différents

scénarios climatiques, ont montré que l'utilisation de génotypes très précoces pouvait être une voie efficace face à l'augmentation des risques climatiques (Gouache *et al*, 2012). Dans ce cadre, une meilleure connaissance du déterminisme génétique de la précocité pourrait permettre de mieux piloter, dans les programmes de sélection, ce type de stratégie d'évitement.

L'objectif de notre projet était d'essayer de mieux comprendre la variabilité de la précocité, au sein d'un ensemble de lignées adaptées aux conditions de l'agriculture française, et d'étudier l'effet de certains gènes ou combinaisons de gènes dans le contrôle de ces mécanismes d'adaptation environnementale du blé tendre. Pour cela, une large collection de génotypes (126 lignées et variétés) a été étudiée au cours des campagnes 2008-2009 et 2009-2010, et ce matériel a fait l'objet :

- d'une caractérisation phénotypique portant sur la précocité à la montaison (stade épi 1 cm), ainsi que sur la précocité à l'épiaison et ses 3 composantes (besoins en vernalisation / sensibilité à la photopériode / précocité intrinsèque).
- d'une caractérisation génotypique, au travers de la diversité allélique observée pour des gènes connus pour être impliqués dans le rythme de développement du blé tendre (Rousset *et al*, 2011 ; Le Gouis *et al*, 2012).

2. Matériel et méthodes

► Matériel végétal

Une collection de 126 lignées et variétés présentant une large gamme de précocité et des rythmes de développement contrastés, a été constituée par les différents partenaires du projet.

Le nombre de génotypes fournis a été de 35 pour l'INRA et Agri-Obtentions, 9 pour Caussade Semences, 10 pour Lemaire-Deffontaines, 15 pour Limagrain, 12 pour Momont, 15 pour R2n, 17 pour Secobra et 13 pour Unisigma.

► Caractérisation phénotypique

Différents dispositifs expérimentaux multi-locaux, de type « pépinière » ou « essai micro-parcelles », ont permis d'évaluer la précocité à la montaison (stade épi 1 cm) et la précocité à l'épiaison des 126 génotypes. Le poids de 1000 grains a également été mesuré sur la plupart de ces expérimentations, et les dispositifs de type « essai » ont de plus permis une évaluation du rendement des lignées.

Des pépinières à semis décalés (4 dates de semis, dont 2 au printemps), implantées en 2009 et en 2010 dans les stations INRA de Clermont-Ferrand et Mons, ont permis d'évaluer les besoins en vernalisation des 126 génotypes.

La serre photopériodique de l'INRA de Mons a été utilisée en 2009 pour évaluer la sensibilité à la photopériode (plantes vernalisées repiquées le 30 décembre 2008 et conduites en jours courts), et la précocité intrinsèque (plantes vernalisées repiquées le 30 décembre 2008 et conduites en jours longs).

Le Tableau 1 récapitule les différentes expérimentations qui ont été réalisées au cours des 2 premières années du projet.

► Caractérisation génotypique

Le marquage moléculaire réalisé au cours de la première année du projet a porté sur le gène de sensibilité à la photopériode *Ppd-1* situé sur le chromosome 2D, et les gènes *Vrn-1* (chromosomes 5A, 5B et 5D) et *FT* (chromosomes 7A et 7D ; aussi nommés *Vrn-3*) impliqués dans les besoins en vernalisation. Les protocoles de marquage moléculaire sont décrits dans Rhoné *et al.* (2008) et Rousset *et al.* (2011) pour *Vrn-1* et *Vrn-3* et dans Beales *et al.* (2007) pour *Ppd-1*.

Pour *Vrn-1* du chromosome 5A, 2 marqueurs étaient disponibles (un dans le promoteur et un dans l'exon 7), alors que pour *Vrn-1* du 5B et *Vrn-1* du 5D, un seul marqueur (situé dans l'intron 1 de ces 2 gènes) a été utilisé.

Année	Site	Sigle	Type d'expérimentation	Date de semis	Caractères évalués			
					Précocité montaison (épi 1 cm)	Précocité épiaison	Rendement	Poids 1000 grains
2009	INRA Clermont-Fd (63)	CF	Essai Semis 1 (2 reps) Semis 2 (1 rep)	12/11/2008 5/1/2009	X	X X	X	X
			Pépinière Semis 1 Semis 2 Semis 3 Semis 4	20/11/2008 5/1/2008 25/2/2009 20/3/2009		X X X X		
	INRA Estrées-Mons (80)	EM	Essai (2 reps) micro-parcelles 3m ²	20/10/2008	X	X		X
			Pépinière Semis 1 Semis 2 Semis 3 Semis 4	20/10/2008 24/12/2009 16/3/2009 14/4/2009		X X X X		X X X X
			Serre photopériodique: Jours courts (10h) Jours longs (20h)	repiquage des plantes vernalisées 30/12/2008		X X X		
	INRA - Le Moulon (91)	LM	Pépinière			X		
	Agri-Obtentions La Minière (91)	AO	Essai (1rep)	12/12/2008	X	X	X	X
	Arvalis Villiers-le-Bâcle (91)	AR	Essai (2 reps)	23/10/2008	X	X	X	X
	Limagrain - Montroy (17)	LVH	Essai (2 reps)	29/10/2008	X	X	X	X
	Momont - Allonnes (28)	MH	Pépinière	17/10/2008	X	X		X
Unisigma - Froissy (60)	UNI	Pépinière	30/10/2008	X	X		X	
2010	INRA Clermont-Fd (63)	CF	Essai Semis 1 (1 rep) Semis 2 (1 rep)	28/10/2009 14/12/2009	X	X X	X X	X X
			Pépinière Semis 1 Semis 2 Semis 3 Semis 4	29/10/2009 15/12/2009 23/2/2010 24/3/2010		X X X X		
	INRA Estrées-Mons (80)	EM	Essai (2 reps)	23/10/2009	X	X		X
			Pépinière Semis 1 Semis 2 Semis 3 Semis 4	23/10/2009 Non réalisé 4/3/2010 27/4/2010		X X X X		X X X X
			Agri-Obtentions La Minière (91)	AO	Essai (1rep)	30/10/2009	X	X
	Arvalis Villiers-le-Bâcle (91)	AR	Essai (1 rep + 35 numéros 2 reps)	25/11/2009	X	X	X	X
	Caussade Semences Caussade (82)	CAU	Pépinière	29/10/2009	X	X		X
	Secobra - Maule (78)	MAU	Pépinière	29/10/2009	X	X		X
R2n - Louville (28)	LOU	Pépinière	28/10/2009	X	X		X	

Tableau 1 : expérimentations réalisées au cours des campagnes 2008-2009 et 2009-2010.

En bleu : date de semis voisine du solstice d'hiver. En rouge : semis de printemps.

► Méthodes statistiques

L'effet des allèles des gènes impliqués dans le rythme de développement a été étudié à travers des arbres de segmentation. Cette méthode statistique permet d'expliquer une variable quantitative (ici la précocité à la montaison, ou la précocité à l'épiaison ainsi que ses composantes) par des variables qualitatives (ici les compositions alléliques aux marqueurs des gènes *Vrn-1*, *FT* et *Ppd-1*).

Les arbres de segmentation sont construits par partition binaire, le nœud de la première ramification étant appelé la racine, et les ramifications terminales les feuilles de l'arbre. Le choix d'une dichotomie est basé sur des calculs de sommes de carrés d'écart à la moyenne (SCEM) pour la variable expliquée (ce critère est également appelé "déviante") : l'algorithme recherche, parmi toutes les subdivisions en 2 classes réalisables sur l'une ou l'autre des variables explicatives, celle permettant que la somme des SCEM des 2 classes soit la plus petite possible par rapport à la SCEM du nœud de la ramification.

Un modèle de segmentation est d'autant plus pertinent qu'il permet une forte réduction de la déviante totale. Cette réduction de déviante due au modèle s'obtient par le calcul suivant :

$$1 - (\text{somme des SCEM des feuilles} / \text{SCEM de la racine})$$

Nous avons également utilisé la régression PLS (Partial Least Square), pour essayer d'expliquer la précocité en fonction de la composition allélique aux gènes de développement. Cette régression aux moindres carrés partiels permet d'éviter les problèmes observés en régression multiple lorsqu'il y a multicollinéarité des variables explicatives et/ou lorsque le nombre de variables explicatives est élevé par rapport au nombre d'observations. L'objectif est donc le même qu'avec les arbres de segmentation (d'une manière générale, ces 2 méthodes mettent en évidence des résultats assez similaires, mais avec une présentation très différente), cependant la régression PLS conduit à une équation qui permet de faire directement de la prédiction.

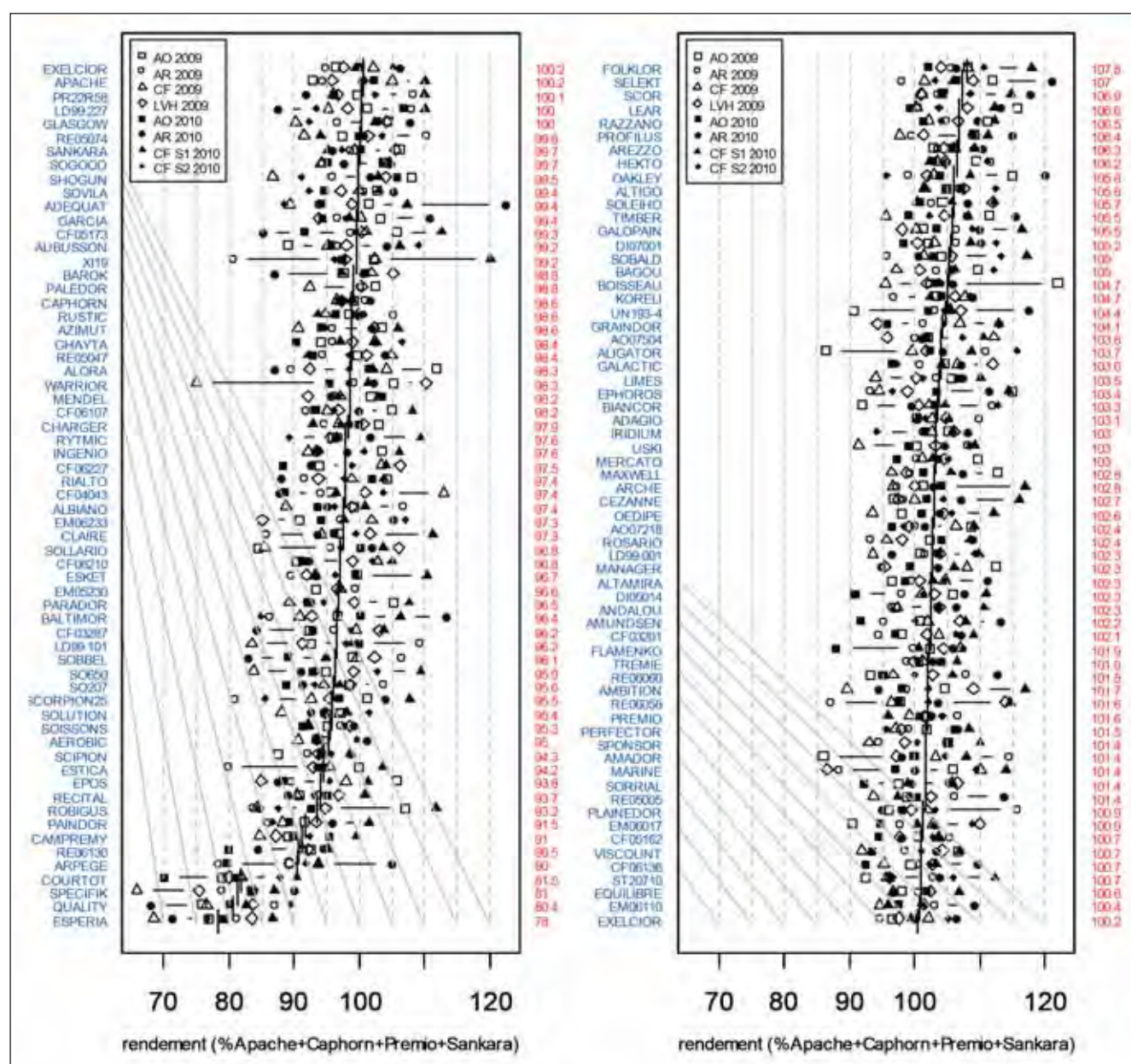


Figure 1 : productivité des 126 lignées, exprimée en pourcentage des témoins (Apache, Caphorn, Premio, Sankara), dans les dispositifs de type « essai micro-parcelles » des campagnes 2008-2009 et 2009-2010.

3. Résultats et discussion

► Validité des dispositifs de type « essai micro-parcelles »

Les essais rendement à 2 répétitions mis en place en 2009 à Clermont (CV = 3.7 ; ETR = 3.4 ; moyenne générale = 93.2q/ha), Montroy (CV = 4.7 ; ETR = 3.9 ; moyenne générale = 82.5q/ha) et Villiers-le-Bâcle (CV = 4.6 ; ETR = 5 ; moyenne générale = 107.9q/ha) ont été de bonne qualité.

Par contre, les essais rendement à une seule répétition mis en place en 2009 sur le site de La Minière (semis au solstice d'hiver), et sur les différents sites d'essai de 2010 (La Minière - semis date normale - ; Villiers-le-Bâcle - semis au solstice d'hiver - ; Clermont - 2 dates de semis -), n'ont permis qu'une estimation assez peu précise de la productivité des lignées.

La Figure 1 récapitule néanmoins les rendements obtenus par les différents génotypes sur l'ensemble des dispositifs de type « essai micro-parcelles ».

► Composition allélique aux marqueurs des gènes de la voie florale

Le Tableau 2 récapitule les résultats du marquage moléculaire réalisé au cours de la première année du projet.

Au niveau des fréquences alléliques, on peut remarquer que :

- pour *Ppd-1* le panel est équilibré pour les allèles *Ppd-D1* (qui confère la sensibilité à la photopériode) et *Ppd-D1a* (qui conduit à une insensibilité à la photopériode).
- pour *Vrn-1A_{prom}* le panel variétal est essentiellement constitué des allèles « hiver » 2 et 3 tandis que les allèles 1, 4 et 5 sont en très faible proportion (et à l'état hétérozygote pour ce qui concerne les allèles 1 et 4).
- Pour *Vrn-1A_{ex7}* il y a une large majorité d'allèle 1 qui confère le type « hiver », mais l'allèle 2 (type « printemps ») est quand même présent de manière significative.
- pour *Vrn-1B_{int1}* le panel variétal est essentiellement constitué de l'allèle « hiver » (1) tandis que l'allèle « printemps » (2) n'est présent que dans 3 lignées.
- pour *Vrn-1D_{int1}* le panel est exclusivement constitué de l'allèle « hiver » 1.
- pour *FT=Vrn3-7A* le panel est assez équilibré pour les allèles 1 et 2.
- pour *FT=Vrn3-7D* le panel est très déséquilibré, avec seulement 7 génotypes portant l'allèle 2 (dont 1 hétérozygote).

Gène	Chromosome	Sigle utilisé pour les graphiques	Marqueur	Allèles	Fréquences Alléliques
<i>Ppd-1</i>	2D	<i>Ppd2D</i>	<i>Ppd-D1</i>	<i>Ppd-D1</i> = 1 <i>Ppd-D1a</i> = 2	D1 = 75 D1a = 51
<i>Vrn-1</i>	5A	<i>Vrn5A</i>	<i>Vrn-1A_{prom}</i>	1, 2, 3, 4, 5	1 = (3) 2 = 109 + (4) 3 = 10 + (1) 4 = (2) 5 = 2
<i>Vrn-1</i>	5A	<i>Vrnex5A</i>	<i>Vrn-1A_{ex7}</i>	1, 2	1 = 101 + (6) 2 = 19 + (6)
<i>Vrn-1</i>	5B	<i>Vrn5B</i>	<i>Vrn-1B_{int1}</i>	1, 2	1 = 123 2 = 3
<i>Vrn-1</i>	5D	<i>Vrn5D</i>	<i>Vrn-1D_{int1}</i>	1, 2	1 = 126 2 = 0
FT = <i>Vrn-3</i>	7A	<i>Ft7A</i>	<i>Vrn-3A_{int2}</i> = Hd3 gA MIC 1	FTA (TG)8 = 1 FTA (TG)9 = 2	1 = 46 2 = 78 NA = 2
FT = <i>Vrn-3</i>	7D	<i>Ft7D</i>	<i>Vrn-3D_{ex3}</i> = Hd3 gD	FTD (G)3 = 1 FTD (G)4 = 2	1 = 112 + (1) 2 = 6 + (1) NA = 7

Tableau 2 : synthèse du marquage moléculaire réalisé au cours de la première année du projet. Les valeurs entre parenthèses indiquent des situations d'hétérozygotie (NA = donnée manquante).

	Ppd1 2D	Vrn1 5A	Vrn1ex7 5A	Vrn1 5B	FT 7A	FT 7D
AO07504	2	2	1	1	2	1
AO07218	2	2	1	1	1	1
CF03201	1	2	1	1	2	1
CF03287	1	2	1	1	2	1
CF04043	1	2	1	1	1	1
FLAMENKO	2	2	1	1	1	1
CF05162	1	2	1	1	1	1
CF05173	1	2	1	1	1	1
CF06107	1	2	1	1	2	1
CF06136	2	2	1	1	1	1
GHAYTA	1	2	1	1	2	1
CF06210	1	2	1	1	2	1
CF06227	1	2	1	1	2	1
COURTOT	1	5	2	1	1	1
DI05014	1	2	1	1	1	1
DI07001	2	2	1	1	1	1
BAROK	1	3	1	1	1	1
EM05230	1	2	1	1	1	1
EM06017	1	2	1	1	1	2
EM06110	2	2	1	1	1	1
EM06233	1	2	1	1	1	1
KORELI	1	2	1	1	2	1
RE05005	1	2	1	1	2	1
FOLKLOR	1	2	1	1	2	1
RE05047	1	2	1	1	1	1
RE05074	1	2	2	1	2	1
RE06058	1	2	1	1	1	1
RE06060	2	2	1	1	1	1
RE06130	2	3	1	1	1	1
RYTMIC	1	2	1	1	1	NA
SORRIAL	2	2	1	1	2	1
SOLLARIO	2	2	1	1	1	1
SO650	2	2	1	1	2	1
SOBBEL	2	3	1	1	2	1
SOVILA	2	2	2	1	1	1
SOBALD	2	2	1	1	2	1
SOLUTION	1	2	1	1	2	1
SOGOOD	1	2	1	1	2	1
SO207	2	3	1	1	2	1
ADEQUAT	1	2	1	1	2	1
EQUILIBRE	1	2	1	1	2	1
ALBIANO	2	3	1	1	2	1
AEROBIC	2	2	1	1	2	1
SPECIFIK	1	1/3/4	2	2	2	2
LD99.227	1	2	1	1	1	1/2
GLASGOW	1	2	2	1	2	1
MAXWELL	1	2	1	1	2	1
LD99.101	2	2	1/2	1	1	1
LD99.001	2	2	1	1	1	1
APACHE	2	2	1	1	1	1
AUBUSSON	1	2	1	1	2	2
AZIMUT	2	2	1	1	1	1
CEZANNE	2	2	1	1	1	1
ESTICA	1	2	1	1	1	1
XI19	1	1/2	2	1	2	1
ARCHE	1	5	2	1	1	1
ALTAMIRA	2	2	1	2	NA	1
ALTIGO	1	2	1	1	2	1
LEAR	1	2	2	1	2	1
CLAIRE	1	2	1/2	1	2	1
LIMES	1	2	1	1	2	1
RECITAL	2	2	1	1	1	1
AMUNDSEN	1	2	1	1	2	NA
SELEKT	1	2	1	1	2	1

	Ppd1 2D	Vrn1 5A	Vrn1ex7 5A	Vrn1 5B	FT 7A	FT 7D
RUSTIC	2	2	1	1	2	1
SOLEIHO	2	2	1	1	1	NA
USKI	2	2	1	1	2	1
ROBIGUS	1	2	2	1	2	1
OAKLEY	1	2	1	1	2	1
VISCOUNT	1	2	1	1	2	1
IRIDIUM	1	2	1	1	1	1
ANDALOU	2	2	1	1	2	1
QUALITY	2	2	1	1	2	1
ESPERIA	2	2	1	1	2	1
MARINE	1	2	2	1	2	2
ST20710	2	2	1	1	2	1
ADAGIO	2	2	1	1	2	1
AREZZO	2	2	1	1	2	NA
MERCATO	2	2	1	1	1	1
MENDEL	1	3	1	1	2	1
HEKTO	2	2	1	1	2	1
PREMIO	2	3	1	1	2	NA
CAPHORN	2	2	1	1	2	1
CHARGER	1	2	1	1	2	1
SANKARA	1	3	1	1	2	1
SHOGUN	1	2	1	1	2	1
PROFILUS	1	2	1	1	2	1
ESKET	1	2	1	1	2	1
WARRIOR	1	2	1/2	1	2	1
RAZZANO	1	2	1	1	2	1
AMBITION	1	2	1	1	2	NA
SCIPION	2	2	1	1	2	1
GARCIA	2	2	1	1	2	1
ROSARIO	1	2	1	1	2	1
PALEDOR	2	2	1/2	1	1	1
OEDIPE	1	2	2	1	1	1
GALACTIC	2	3	1	1	2	1
GALOPAIN	2	3	2	1	2	1
PARADOR	1	2	1	1	1	1
PR22R58	2	2	2	1	1	1
INGENIO	2	2	1	1	1	1
MANAGER	1	1/2	1	1	1	1
EPOS	1	2	1/2	1	2	2
ALORA	1	2	2	2	2	2
BAGOU	1	2	2	1	2	1
BOISSEAU	1	2	2	1	2	1
TIMBER	1	2	2	1	2	1
SPONSOR	1	2	2	1	2	1
GRAINDOR	2	2	1	1	2	1
PAINDOR	1	2	1	1	NA	1
BALTIMOR	1	2	1	1	2	NA
EXELCIOR	2	2	1	1	2	1
CAMPREMY	1	2	1	1	2	1
PERFECTOR	1	2	1	1	1	1
UN193-4	1	2	1	1	2	1
AMADOR	2	2	1	1	2	1
BIANCOR	1	2	1	1	1	1
ALIGATOR	2	2/4	1	1	1	1
SCOR	1	2	1	1	1	1
PLAINEDOR	2	2	1	1	1	1
ARPEGE	2	2	2	1	1	1
TREMIE	1	2	1	1	2	1
RIALTO	1	2	1	1	2	1
SOISSONS	2	2	1	1	2	1
EPHOROS	1	2	1	1	2	1
SCORPION25	1	1/2	1/2	1	2	1

Tableau 3 : allèles aux marqueurs des gènes Ppd-1 (chromosome 2D), Vrn-1 (chromosomes 5A et 5B) et FT (chromosomes 7A et 7D).

Le Tableau 3 donne les résultats du marquage moléculaire pour chacun des 126 génotypes, pour les différents gènes étudiés (sauf *Vrn1-5D*, pour lequel il n'y avait pas de polymorphisme).

► Etude des composantes de la précocité à l'épiaison

La Figure 2 présente les distributions des précocités à l'épiaison obtenues pour les 126 génotypes dans les différents dispositifs à semis décalés (pépinières avec 3 ou 4 dates de semis de Clermont-Ferrand et Estrées-Mons, en 2009 et 2010), ainsi que dans la serre photopériodique d'Estrées-Mons en 2009. Ce sont ces dispositifs qui permettent d'approcher les 3 composantes de la précocité.

► Précocité intrinsèque

La précocité intrinsèque est obtenue grâce à la conduite "jours longs" de la serre photopériodique, qui se caractérise

par l'absence de facteur limitant aussi bien en terme de vernalisation (plantes repiquées après vernalisation), qu'en terme de photopériode (jours longs).

La Figure 3 montre qu'il y a plus de 400°C.jour entre les 2 lignées intrinsèquement les plus précoces (QUALITY et ESPERIA), dont l'épiaison en serre photopériodique « jours longs » est obtenue au bout de 1012°C.jour, et les 2 lignées intrinsèquement les plus tardives (LIMES et CAPHORN), dont l'épiaison se réalise respectivement en 1439 et 1465 °C.jour.

La Figure 4 montre que le jeu de marqueurs utilisé ne permet pas d'expliquer la précocité intrinsèque (la réduction de déviance permise n'est que de 15.5%). Ce résultat était attendu puisque la précocité intrinsèque est par définition indépendante des besoins en vernalisation et en photopériode : il est donc normal de constater un très faible effet des gènes *Vrn-1*, *Ppd-1* et *FT*.

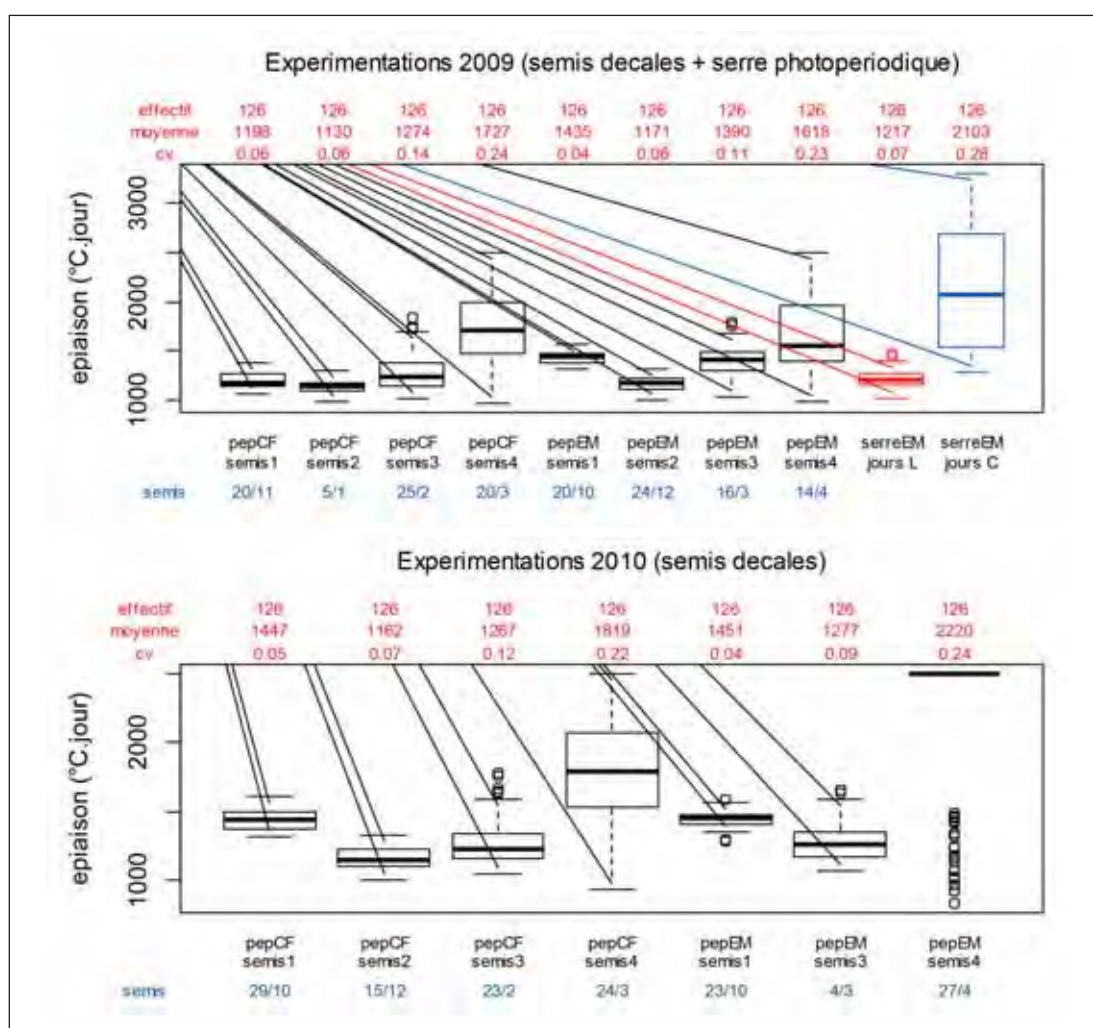


Figure 2 : distributions des valeurs de précocité à l'épiaison pour les pépinières à 3 ou 4 dates de semis (CF et EM, années 2009 et 2010), et pour la serre photopériodique (EM, année 2009) avec conduites "jours longs" (en rouge) et "jours courts" (en bleu).

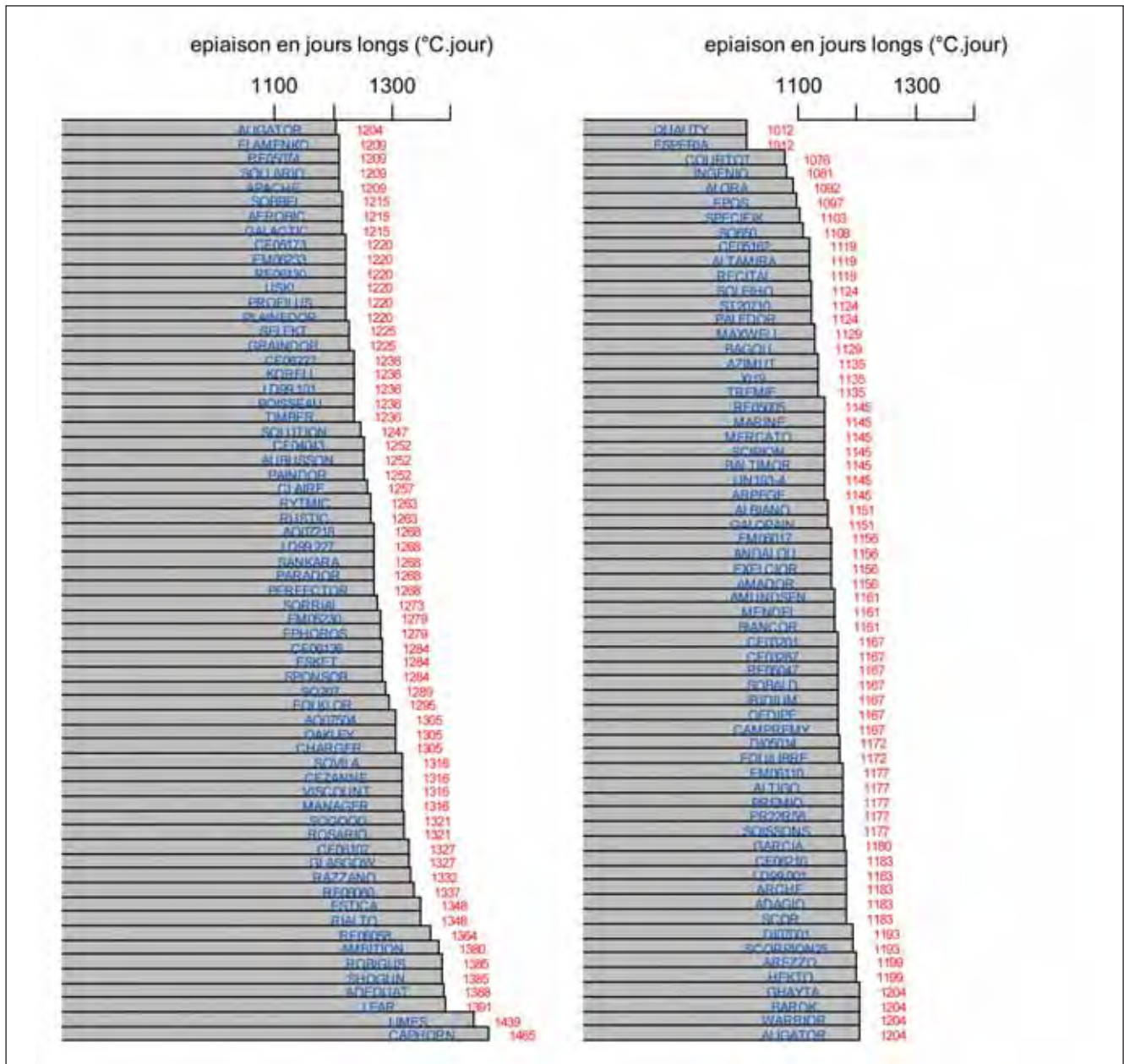


Figure 3 : précocité à l'épiaison en serre photopériodique (conduite "jours longs") pour les 126 génotypes.

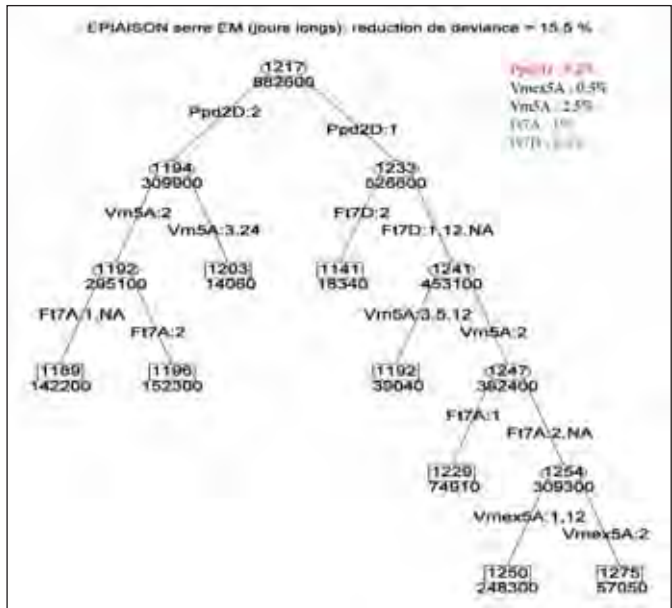


Figure 4 : arbre de segmentation pour la précocité intrinsèque, et pourcentage de déviance absorbé par chacun des marqueurs.

► Sensibilité à la photopériode

La sensibilité à la photopériode est donnée par l'épiaison en conduite "jours courts" de la serre photopériodique (pas de contrainte pour la vernalisation, mais forte contrainte de longueur de jour), à laquelle on retranche la valeur de précocité intrinsèque.

La Figure 5 fait apparaître 2 groupes de lignées. Dans le premier groupe, les valeurs augmentent de manière continue de 123 (USKI) à 555 (EQUILIBRE). Dans le deuxième groupe, les valeurs augmentent de manière continue de 747 (RIALTO) à 1973 (CF06107). Avec une valeur de 640, SHOGUN occupe une position intermédiaire entre les 2 groupes.

Le premier groupe (lignées insensibles à la photopériode) correspond presque exactement aux génotypes porteurs de l'allèle 2 de *Ppd1-2D* (seuls TREMIE, BAGOU, UN193-4, UN177-7-1 et EQUILIBRE sont porteurs de l'allèle 1). Il reste cependant une grande variabilité intra-groupe, qui n'est pas expliquée par *Ppd1-2D*.

Par segmentation sur les allèles des gènes *Vrn-1*, *Ppd-1* et *FT*, on obtient une réduction de 77% de la déviance totale : les

marqueurs actuellement disponibles permettent donc de prendre en compte plus des 3/4 de la déviance totale (Figure 6).

La dichotomie sur les allèles 1 et 2 de *Ppd1-2D* absorbe, à elle seule, 73% de cette déviance totale :

$$1 - \frac{336000 + 10270000}{39340000} = 0.73$$

Pour la sensibilité à la photopériode, une grande partie du phénotype est donc expliquée par le génotype au gène *Ppd1-2D*, avec un petit effet complémentaire de *FT-7A*, *FT-7D* et *Vrn1-5A*.

► Besoins en vernalisation

Les besoins en vernalisation sont obtenus à partir des épiaisons observées pour les 2 dates de semis les plus tardives des pépinières à 4 dates de semis (lieux CF et EM). En effet, on a dans ce cas peu ou pas de contrainte de photopériode (pour les semis 3 et surtout 4, le développement des plantes se fait en jours longs).

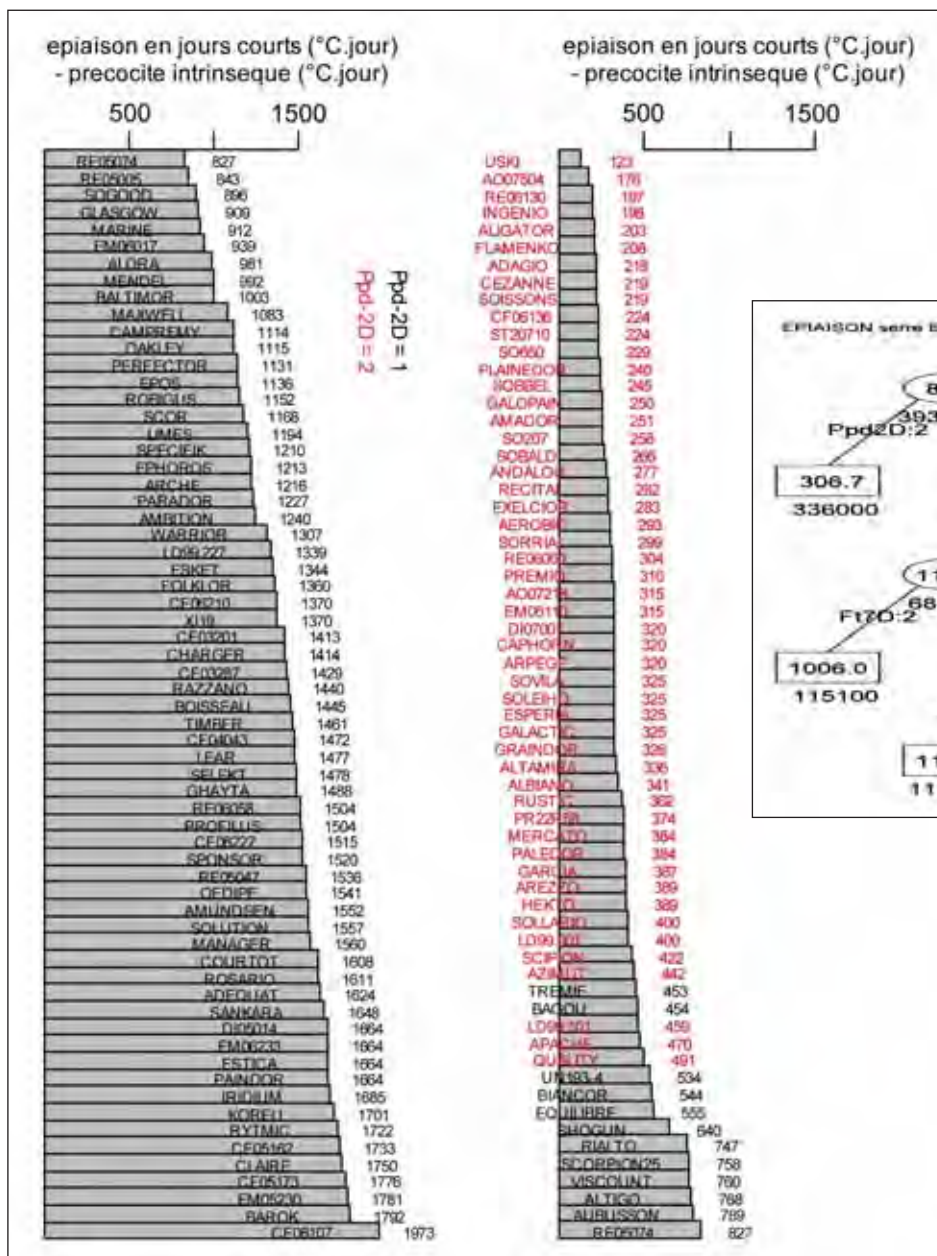


Figure 5 : sensibilité à la photopériode des 126 génotypes (les lignées portant l'allèle 2 de *Ppd-2D* sont figurées en rouge).

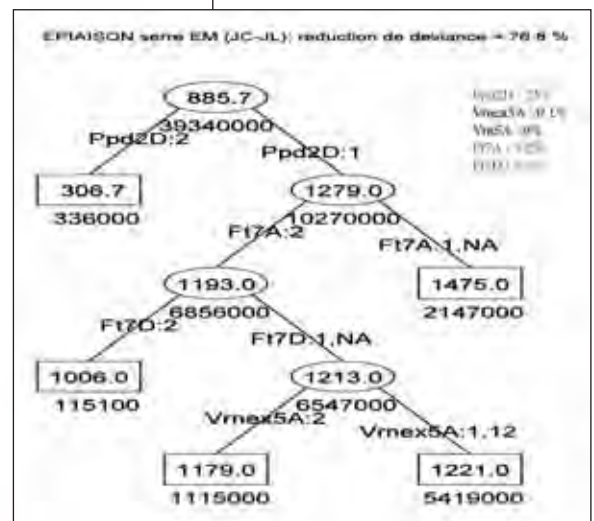


Figure 6 : arbre de segmentation pour la sensibilité à la photopériode, et pourcentage de déviance absorbé par chacun des marqueurs.

La Figure 7 représente, pour les 2 années d'expérimentation, la moyenne des valeurs d'épiaison obtenues par les 126 géotypes pour les 2 semis de printemps de chacun des 2 lieux CF et EM (cependant, en 2010, le semis 4 du lieu EM n'a pas été pris en compte pour le calcul de cette moyenne, car seulement une trentaine de géotypes ont atteint l'épiaison).

Ce graphique ne permet pas de distinguer des classes, car l'évolution des valeurs d'épiaison apparaît quasiment continue. On constate cependant que les géotypes les plus "printemps" portent souvent l'allèle 2 de *Vrn1-5B*, et/ou l'allèle 2 pour l'exon 7 de *Vrn1-5A*, que ce soit à l'état homozygote ou hétérozygote.

On peut voir sur la Figure 7 que les estimations des besoins en vernalisation réalisées sur les 2 années sont tout à fait cohérentes : les valeurs obtenues en 2009 et en 2010 sont très fortement corrélées ($R^2 = 0.81$).

Pour les besoins en vernalisation, la segmentation sur les allèles des gènes *Vrn-1*, *Ppd-1* et *FT* permet une réduction d'environ 50% de la déviance totale, en 2009 et en 2010 (Figure 8). La dichotomie entre les géotypes qui ont l'allèle 1 pour l'exon 7 de *Vrn1-5A*, et ceux qui ont l'allèle 2 (à l'état homozygote ou hétérozygote) absorbe de l'ordre de 35% de cette déviance totale, ce qui indique un effet complémentaire significatif des autres gènes (surtout *Ppd1-2D* et *FT-7A*).

Il faut noter que Rousset *et al* (2011), dans une étude des besoins en vernalisation sur une collection représentative de la diversité génétique mondiale, ont mis en évidence un effet prépondérant des allèles au promoteur de *Vrn1-5A* (type « hiver » pour les allèles 2, 3 et 4, type « printemps » pour les allèles 1 et 5), qui masquait complètement l'effet du polymorphisme à l'exon 7 de *Vrn1-5A*. Notre étude a révélé un effet inattendu des allèles de *Vrn1ex7-5A*, qui

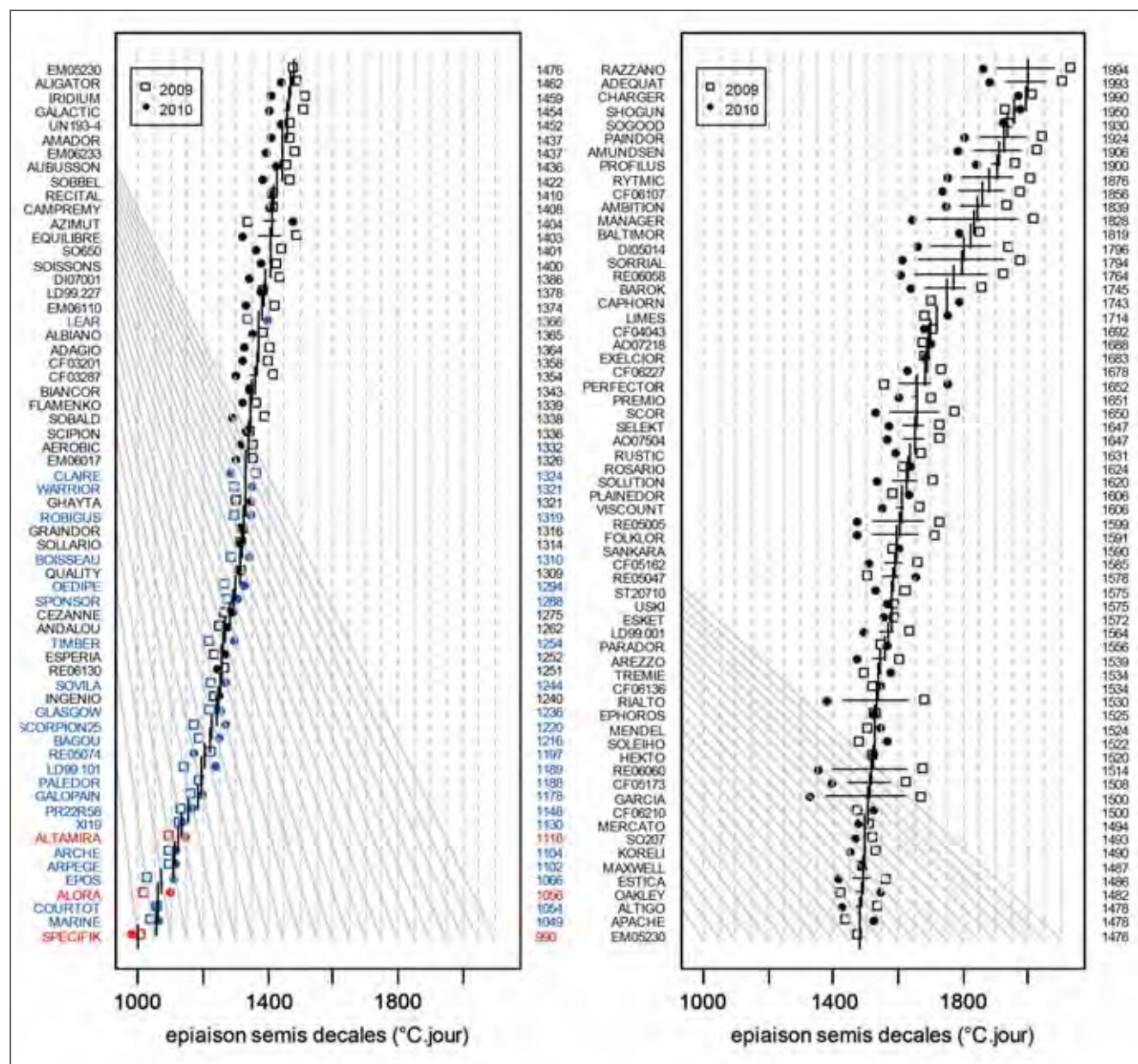


Figure 7 : précocité à l'épiaison des 126 géotypes en semis décalés pour les 2 années (en 2009, moyenne des valeurs obtenues pour les semis 3 et 4 de CF et EM ; en 2010, moyenne des valeurs obtenues pour les semis 3 et 4 de CF, et le semis 3 de EM). Les lignes portant l'allèle 2 de *Vrn1-5B* sont figurées en rouge, et les lignes portant l'allèle 2 de *Vrn1ex7-5A* sont figurées en bleu.



Figure 8 : arbre de segmentation pour les besoins en vernalisation (moyenne des années 2009 et 2010), et pourcentage de déviance absorbé par chacun des marqueurs.

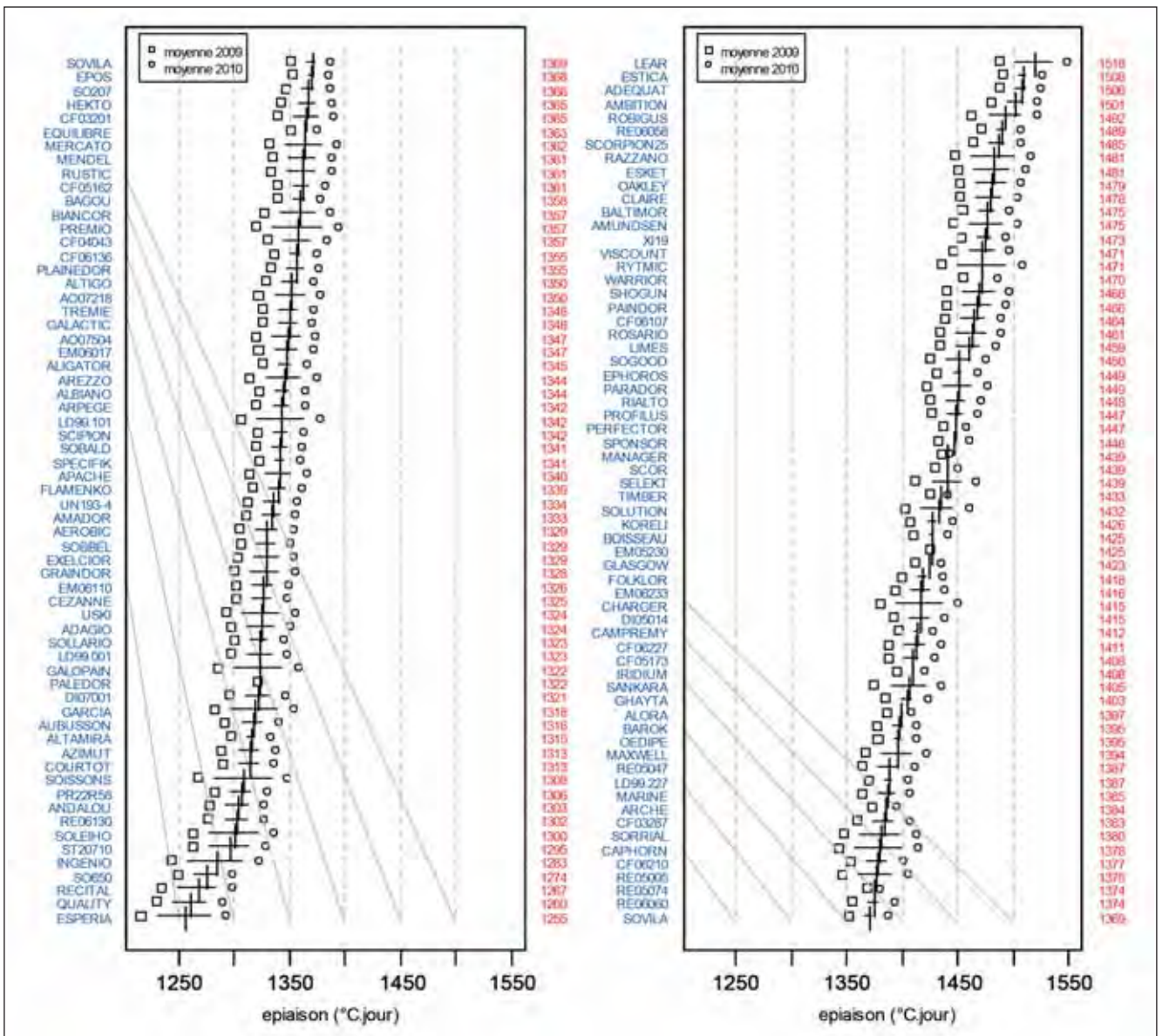
apparaissent déterminants pour la définition des types « hiver » et « printemps » dans le cas du matériel adapté aux conditions de l'agriculture française.

► Etude de la précocité à l'épiaison

La figure 9 présente les valeurs moyennes des précocités à l'épiaison obtenues par les 126 géotypes dans les différentes expérimentations semées du début de l'automne jusqu'au solstice d'hiver, en 2009 et en 2010. On peut voir qu'il y a un peu plus de 260°C.jour entre l'épiaison du géotype le plus précoce (ESPERIA) et l'épiaison du géotype le plus tardif (LEAR).

On peut noter que les valeurs moyennes obtenues en 2009 et en 2010 sont très fortement corrélées ($R^2 = 0.95$), ce qui indique un faible niveau d'interaction « géotype x année », et confirme ainsi le fort déterminisme génétique de la précocité à l'épiaison. Par contre, il y a quand même un effet « année » qui joue sur ce caractère, puisque les moyennes de 2009 sont systématiquement plus faibles que les moyennes 2010 (différence de l'ordre de 50°C.jour).

Figure 9 : valeurs moyennes des précocités à l'épiaison, en 2009 et en 2010, pour les pépinières et essais semés du début de l'automne au solstice.



La Figure 10 présente les distributions des valeurs d'épiaison obtenues, en 2009 et en 2010, pour tous les semis ayant eu lieu du début de l'automne au solstice (les box-plots sont classés dans l'ordre des dates de semis, et pour chaque expérimentation on distingue les génotypes sensibles à la longueur du jour des génotypes insensibles). Ces distributions correspondent à des précocités réalisées dans des conditions agroclimatiques variées mais avec vernalisation naturelle pendant l'hiver.

Pour ces épiaisons exprimées en °C.jour, plus le semis devient tardif, plus les distributions se décalent vers le bas du graphique. Ce phénomène est vraisemblablement dû à des effets photopériodiques, qui correspondent sans doute principalement à l'effet des freins vernalo-photothermiques décrits dans le modèle phénologique de Weir *et al* (1984). En effet, dans le cadre de ce modèle, la durée entre la levée et le stade épi 1 cm est définie par une somme de températures modifiée par des freins. Ces freins (qui prennent des valeurs comprises entre 0 et 1), ralentissent le cumul des températures en fonction de la photopériode et du degré d'avancement de la vernalisation (Gouache *et al*, 2012). La durée entre le stade épi 1 cm et l'épiaison est également concernée, car pendant cette période le frein photopériodique continue à jouer.

Sur la Figure 10, il apparaît que les freins vernalo-photothermiques fonctionnent de la même façon pour les lignées sensibles à la longueur du jour (*Ppd1-2D* = 1), que pour les lignées insensibles (*Ppd1-2D* = 2). En effet, le décalage entre les distributions correspondant à ces 2 catégories reste sensiblement le même quelle que soit la date de semis.

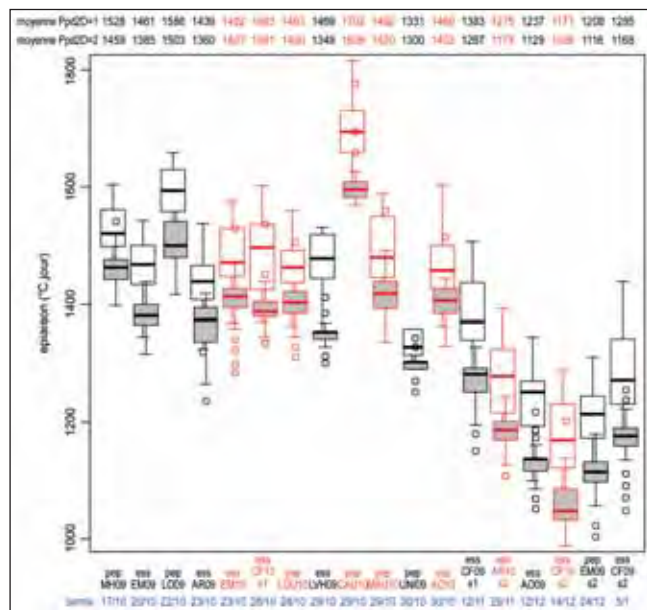


Figure 10 : distributions des valeurs de précocité à l'épiaison pour les pépinières et essais semés du début de l'automne au solstice, dans le cas des lignées sensibles à la longueur du jour (boxplots en blanc), et des lignées insensibles (boxplots en grisé). Les expérimentations de 2009 apparaissent en noir, et celles de 2010 en rouge.

La Figure 11 montre que la segmentation sur les allèles des gènes *Vrn-1*, *Ppd-1* et *FT* permet une réduction de près des 2/3 de la déviance totale. L'effet majeur vient du gène *Ppd1-2D* puisque la dichotomie sur les allèles 1 et 2 de ce gène absorbe, à elle seule, de l'ordre de 50% de cette déviance totale. Pour cette précocité à l'épiaison, qui dépend des 3 composantes "sensibilité à la photopériode", "besoins en vernalisation" et "précocité intrinsèque", on peut noter que les différents gènes (*Ppd1-2D*, *Vrn1-5A*, *FT-7A* et *FT-7D*) apparaissent tous dans

l'arbre de segmentation. Seul *Vrn1-5B*, dont le polymorphisme est trop déséquilibré dans notre échantillon de génotypes (seulement 3 lignées sur 126 ont l'allèle qui confère le type "printemps"), n'apparaît pas.

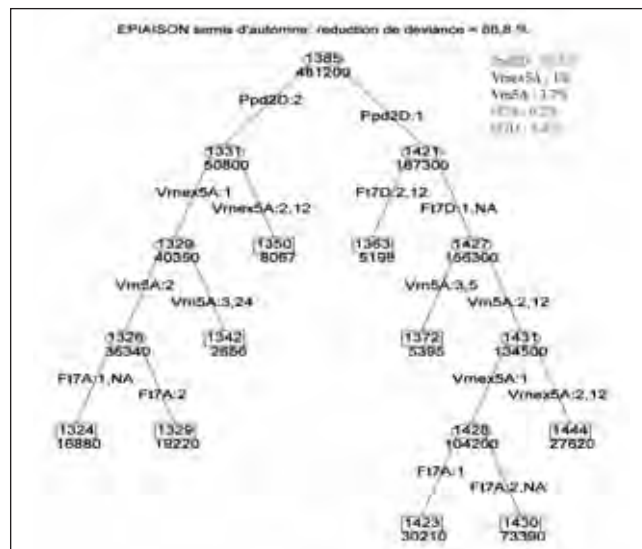


Figure 11 : arbre de segmentation pour la précocité à l'épiaison (moyenne des années 2009 et 2010), et pourcentage de déviance absorbé par les différents marqueurs.

► Prédiction de la précocité à l'épiaison

La régression PLS a été utilisée pour voir s'il était possible d'obtenir des équations de prédiction correctes pour la précocité à l'épiaison.

Lorsqu'on utilise comme variables explicatives les différents allèles des gènes *Vrn-1*, *Ppd-1* et *FT* (codage sous forme de présence = 1, absence = 0), le niveau d'explication du modèle s'avère insuffisant (R^2 de l'ordre de 60% pour les épiaisons moyennes de 2009, ainsi que pour les épiaisons moyennes de 2010).

Par contre, lorsqu'on rajoute la précocité intrinsèque comme variable explicative (Figure 12), on atteint des niveaux d'explication (R^2 de l'ordre de 80% pour 2009 et pour 2010) qui se rapprochent de ce qui serait nécessaire pour avoir des modèles de prédiction intéressants. Malheureusement, la précocité intrinsèque n'est pas un caractère très simple à mesurer, et mettre en œuvre des équations de prédiction qui font appel à cette variable n'est donc pas aisé.

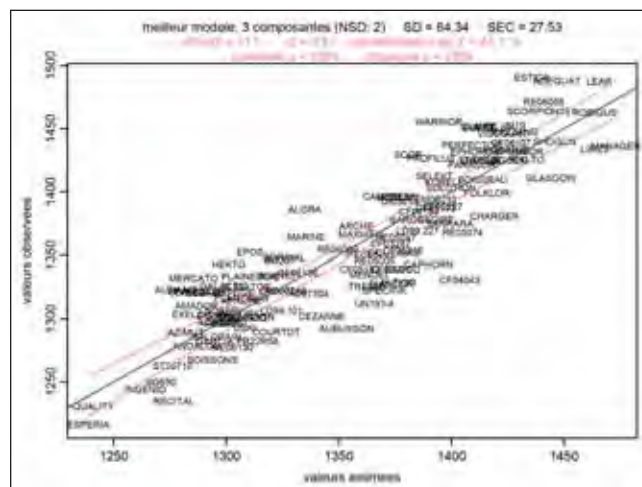


Figure 12 : régression PLS pour expliquer les valeurs moyennes d'épiaison 2009 en prenant comme variables explicatives les allèles aux gènes *Vrn1*, *Ppd* et *Ft*, et la précocité intrinsèque.

► Etude de la précocité à la montaison

Mise au point d'une méthode d'estimation du stade épi 1 cm à partir des mesures de longueur d'épi réalisées au voisinage du stade

La Figure 13 montre les distributions des mesures de longueur d'épi effectuées dans les différents lieux en 2009 et 2010 pour déterminer le stade épi 1 cm. Il apparaît qu'une proportion non négligeable de mesures de longueur d'épi étaient en dehors de la fourchette 0.7 cm - 1.3 cm, à l'intérieur de laquelle Arvalis propose une correction de 10 °C.jour par mm d'écart par rapport à la longueur de référence de 1 cm. Nous avons donc essayé de trouver une méthode de correction plus générale, afin de pouvoir estimer le stade épi 1 cm à partir des mesures de longueur d'épi couramment obtenues lorsqu'on fait des prélèvements au voisinage du stade pour une série de génotypes dont on ne connaît pas la phénologie a priori (soit des mesures qui, comme c'est le cas ici, s'échelonnent entre 0.3 cm et plus de 3 cm).

Pour cela, nous avons récapitulé, sur les 2 années 2009 et 2010, l'ensemble des régressions entre « longueur de l'épi » et « temps en °C.jour », pour chacun des génotypes pour lesquels on disposait d'au moins 4 mesures (2 répétitions x 2 dates) de longueur d'épi à proximité du stade épi 1 cm.

La Figure 14 présente 3 de ces régressions pour des génotypes de précocité contrastée. Elle montre que si la correction proposée par Arvalis est effectivement valable dans l'intervalle 0.7 cm - 1.3 cm (cas de APACHE, pour lequel on a une pente de 0.011 cm par °C.jour, donc très voisine de 1 mm pour 10°C.jour, pour des longueurs d'épi comprises entre 0.5

et 1.6 cm), par contre la correction doit être différente lorsque les longueurs d'épi sont plus faibles (cas de RYTMIC, pour lequel la pente n'est que de 0.007 cm par °C.jour pour un intervalle de mesures allant de 0.3 à 1 cm), ou lorsque les longueurs d'épi sont plus fortes (cas de RE06130, pour lequel la pente est de 0.024 cm par °C.jour, pour des longueurs d'épi comprises entre 0.8 et 2 cm).

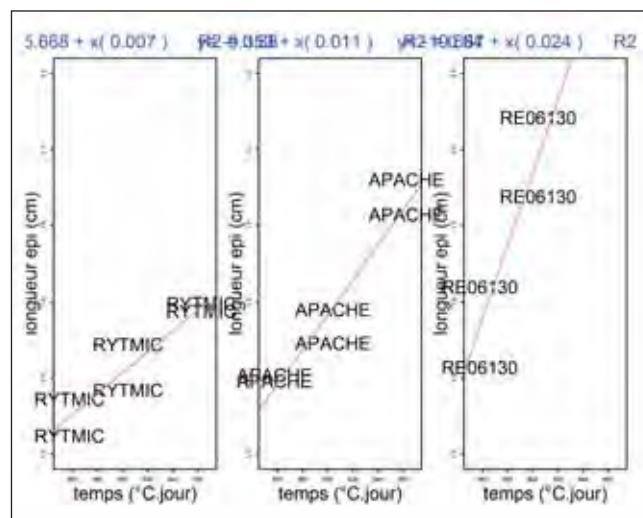


Figure 14 : trois cas contrastés montrant des différences de pente pour la relation entre la longueur de l'épi et le temps, selon que les longueurs mesurées sont faibles (cas de RYTMIC, génotype très tardif), moyennes (cas d'APACHE, génotype assez précoce), ou élevées (cas de RE06130, génotype très précoce). Mesures réalisées sur l'essai LVH 2009.

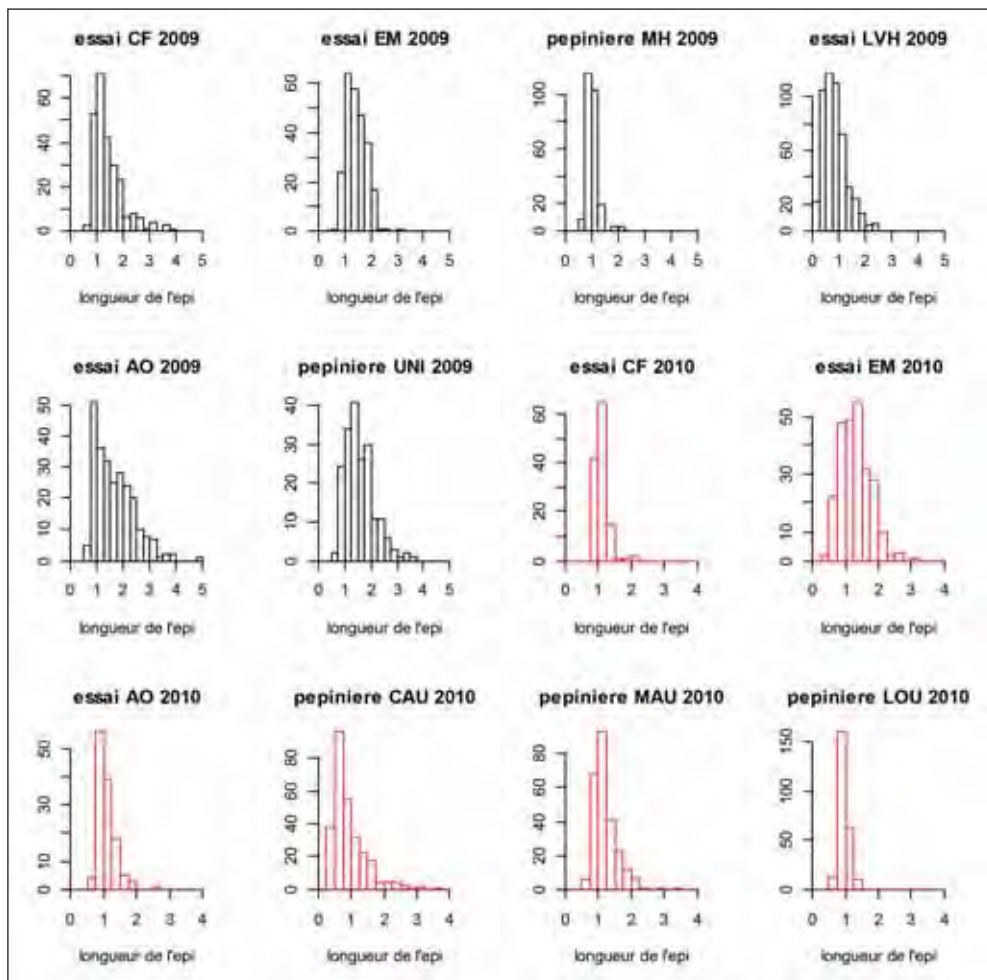


Figure 13 : distribution des longueurs d'épi mesurées au voisinage du stade épi 1 cm en 2009 (histogrammes noirs) et en 2010 (histogrammes rouges).

Nous avons alors, à partir de l'ensemble des régressions disponibles génotype par génotype, représenté la pente de ces régressions en fonction de la longueur maximale de l'épi mesurée sur ces génotypes (Figure 15). Des courbes obtenues par lissage représentent les tendances qui passent au mieux par les différents ensembles de points du graphique (points 2009, points 2010, et total des points).

On voit, sur la Figure 15, que les lissages sur les points des années 2009 et 2010 sont très similaires, ce qui est rassurant par rapport à la méthode de correction proposée. Par contre, il y a quand même une dispersion assez importante des points autour des courbes de lissage (et cela d'autant plus que les mesures de longueur d'épi prennent des valeurs élevées), et il faut donc garder à l'esprit que la méthode de correction proposée ne peut conduire qu'à des estimations de stade épi 1 cm pas très précises.

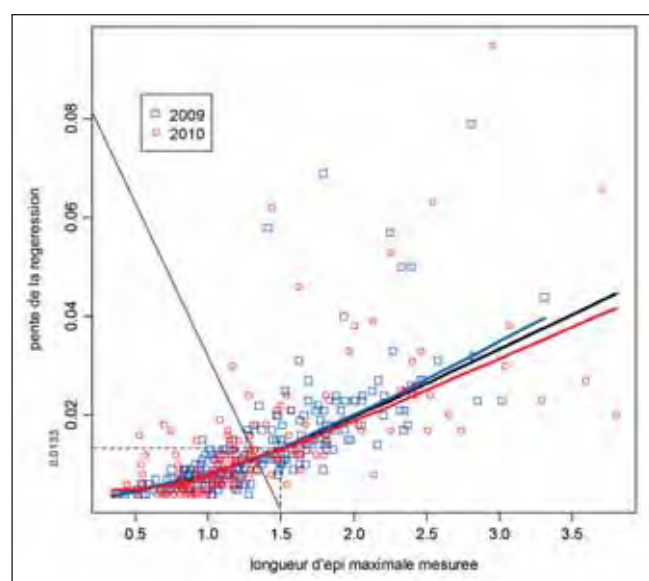


Figure 15 : évolution de la pente des régressions entre « mesures de longueurs d'épi » et « temps en °C.jour » (régressions calculées génotype par génotype sur l'ensemble des données disponibles en 2009 et 2010), en fonction de la mesure de longueur d'épi la plus élevée pour chacun de ces génotypes. La courbe bleue correspond au lissage sur les points 2009, la courbe rouge au lissage sur les points 2010, et la courbe noire au lissage sur l'ensemble des points.

En définitive, les corrections pour estimer les stades épi 1 cm des expérimentations de 2009 et de 2010, ont été basées sur la courbe noire de la Figure 10 (lissage sur l'ensemble des données). Par exemple, une lignée dont la longueur de l'épi aura été mesurée à 1.5 cm, lors d'un prélèvement réalisé à 850 °C.jour, aura une estimation de stade "épi 1 cm" $E1dj$ donnée par :

$$\frac{1.5 - 1}{850 - E1dj} = 0.0133$$

où 0.0133 est la valeur de pente correspondant à une longueur d'épi de 1.5 cm.

Soit $E1dj = 850 - \frac{1.5 - 1}{0.0133} = 812.4$ °C.jour

Le Tableau 4 donne une table des valeurs de pente à utiliser pour avoir une estimation de la précocité à la montaison en °C.jour, à partir de mesures de longueur d'épi pouvant s'échelonner entre 0.344 cm et 3.8 cm. Il faut bien sûr disposer également de la somme de °C.jour au moment où la longueur de l'épi a été mesurée pour pouvoir faire le calcul (voir formule ci-dessus).

Caractérisation phénotypique de la précocité à la montaison

La Figure 16 récapitule les estimations des stades épi 1 cm obtenues en 2009 et en 2010 sur les 126 génotypes. En moyenne, il y a plus de 140°C.jour entre la lignée la plus précoce à la montaison (SO650) et la lignée la plus tardive à la montaison (SCORPION25).

Les valeurs de stade épi 1 cm obtenues en 2009 et en 2010 par les 126 génotypes, apparaissent très fortement corrélées ($R^2 = 0.89$), ce qui indique un faible niveau d'interaction « génotype x année », et montre que la précocité à la montaison, tout comme la précocité à l'épiaison, est fortement déterminée par la génétique. Il apparaît également un fort effet « année », avec des valeurs moyennes pour l'année 2009 systématiquement inférieures à celles obtenues en 2010 (différence supérieure à 50°C.jour). Cet effet « année », que nous avons déjà mis en évidence pour la précocité à l'épiaison (Figure 9), est probablement dû aux freins vernal-photothermiques, dont l'effet est différent selon la séquence climatique annuelle.

Correspondance entre longueur d'épi et pente																					
L épi	pente	L épi	pente	L épi	pente	L épi	pente	L épi	pente	L épi	pente	L épi	pente	L épi	pente	L épi	pente	L épi	pente		
0.344	0.0037	0.680	0.0057	0.815	0.0066	0.975	0.0077	1.110	0.0091	1.250	0.0106	1.460	0.0129	1.640	0.0151	1.820	0.0174	2.135	0.0214	2.480	0.0261
0.370	0.0038	0.690	0.0058	0.820	0.0066	0.980	0.0078	1.115	0.0091	1.260	0.0107	1.465	0.0129	1.645	0.0151	1.830	0.0175	2.160	0.0218	2.510	0.0265
0.420	0.0041	0.695	0.0058	0.825	0.0067	0.990	0.0079	1.120	0.0092	1.270	0.0108	1.470	0.0130	1.660	0.0153	1.840	0.0176	2.170	0.0219	2.520	0.0267
0.430	0.0042	0.700	0.0058	0.830	0.0067	1.000	0.0080	1.130	0.0093	1.280	0.0109	1.480	0.0131	1.665	0.0154	1.860	0.0179	2.200	0.0223	2.540	0.0270
0.440	0.0042	0.705	0.0059	0.840	0.0068	1.010	0.0081	1.135	0.0093	1.290	0.0110	1.485	0.0132	1.670	0.0155	1.870	0.0180	2.210	0.0224	2.580	0.0275
0.442	0.0042	0.710	0.0059	0.845	0.0068	1.020	0.0081	1.140	0.0094	1.310	0.0112	1.490	0.0132	1.675	0.0155	1.880	0.0181	2.250	0.0229	2.650	0.0285
0.510	0.0046	0.715	0.0059	0.850	0.0068	1.025	0.0082	1.145	0.0094	1.315	0.0113	1.495	0.0133	1.680	0.0156	1.910	0.0185	2.270	0.0232	2.735	0.0297
0.520	0.0047	0.720	0.0060	0.860	0.0069	1.030	0.0082	1.150	0.0095	1.320	0.0113	1.500	0.0133	1.690	0.0157	1.930	0.0188	2.320	0.0239	2.810	0.0307
0.530	0.0048	0.740	0.0061	0.865	0.0069	1.040	0.0083	1.155	0.0096	1.330	0.0114	1.510	0.0135	1.695	0.0158	1.940	0.0189	2.330	0.0240	2.850	0.0313
0.540	0.0048	0.745	0.0061	0.870	0.0070	1.045	0.0084	1.170	0.0097	1.340	0.0115	1.520	0.0136	1.730	0.0162	1.960	0.0192	2.340	0.0242	2.950	0.0327
0.550	0.0049	0.750	0.0062	0.880	0.0070	1.050	0.0084	1.175	0.0098	1.350	0.0116	1.530	0.0137	1.740	0.0163	1.970	0.0193	2.350	0.0243	3.020	0.0337
0.565	0.0050	0.765	0.0063	0.900	0.0072	1.060	0.0086	1.180	0.0098	1.370	0.0119	1.540	0.0138	1.750	0.0165	1.980	0.0194	2.355	0.0244	3.040	0.0339
0.570	0.0050	0.770	0.0063	0.910	0.0072	1.063	0.0086	1.190	0.0099	1.380	0.0120	1.550	0.0139	1.760	0.0166	2.000	0.0197	2.360	0.0244	3.070	0.0344
0.590	0.0051	0.780	0.0064	0.920	0.0073	1.065	0.0086	1.200	0.0101	1.395	0.0121	1.570	0.0142	1.770	0.0167	2.005	0.0198	2.370	0.0246	3.290	0.0374
0.600	0.0052	0.785	0.0064	0.925	0.0073	1.070	0.0087	1.205	0.0101	1.400	0.0122	1.580	0.0143	1.790	0.0170	2.010	0.0198	2.390	0.0249	3.310	0.0377
0.630	0.0054	0.790	0.0064	0.930	0.0074	1.080	0.0088	1.210	0.0102	1.410	0.0123	1.600	0.0146	1.795	0.0170	2.030	0.0201	2.400	0.0250	3.595	0.0417
0.640	0.0055	0.795	0.0065	0.950	0.0075	1.090	0.0089	1.220	0.0103	1.420	0.0124	1.620	0.0148	1.800	0.0171	2.050	0.0204	2.420	0.0253	3.700	0.0432
0.650	0.0055	0.800	0.0065	0.960	0.0076	1.095	0.0089	1.230	0.0104	1.430	0.0125	1.630	0.0149	1.810	0.0172	2.060	0.0205	2.430	0.0254	3.800	0.0446
0.670	0.0056	0.810	0.0066	0.970	0.0077	1.100	0.0090	1.240	0.0105	1.440	0.0126	1.635	0.0150	1.815	0.0173	2.130	0.0214	2.460	0.0258	-	-

Tableau 4 : correspondance entre longueur de l'épi mesurée au voisinage du stade épi 1 cm et valeur de pente à utiliser pour avoir une estimation de la précocité à la montaison en °C.jour.

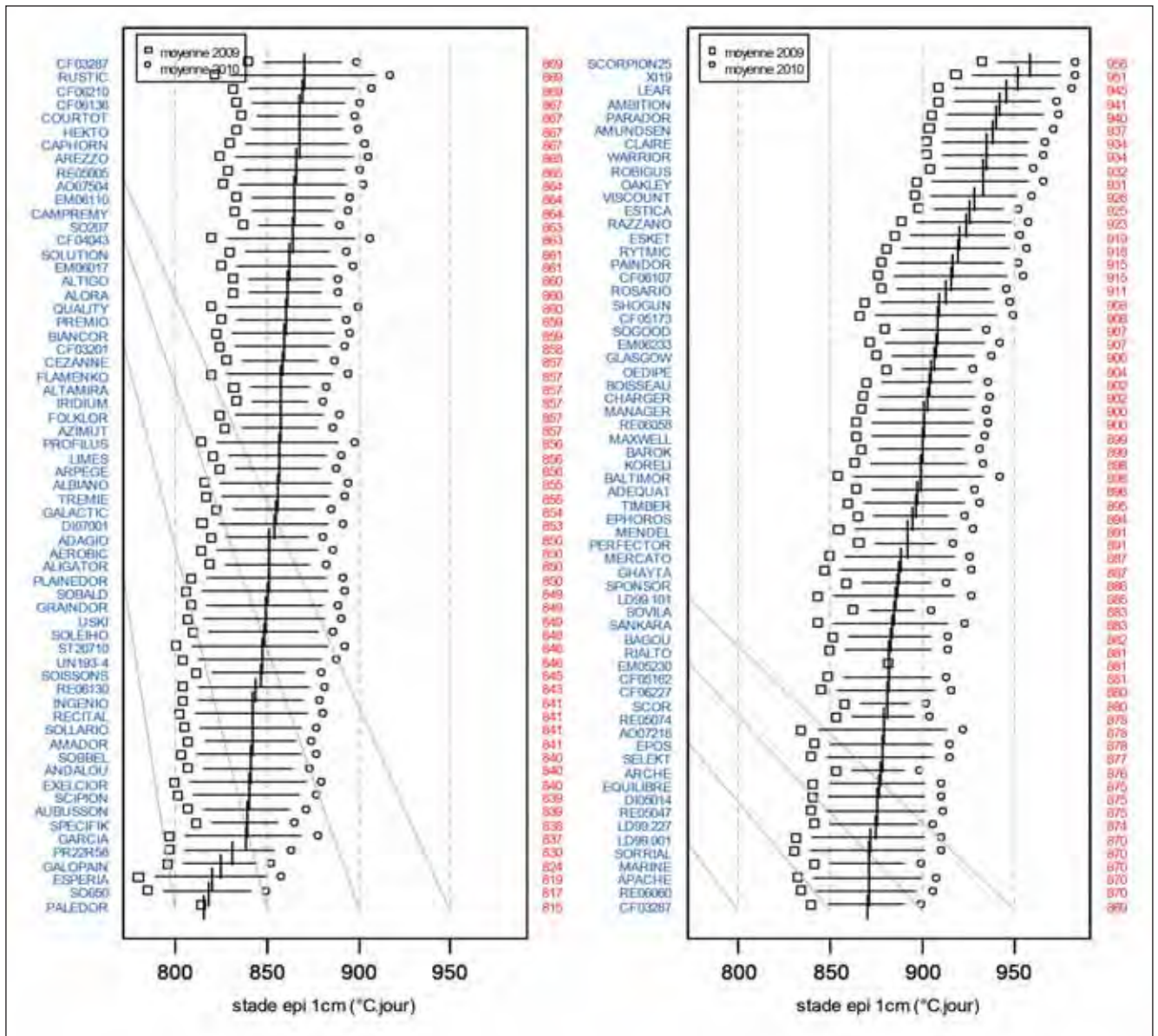


Figure 16 : estimations du stade épi 1 cm pour les 126 génotypes (valeurs moyennes pour les expérimentations de 2009 et pour les expérimentations de 2010).

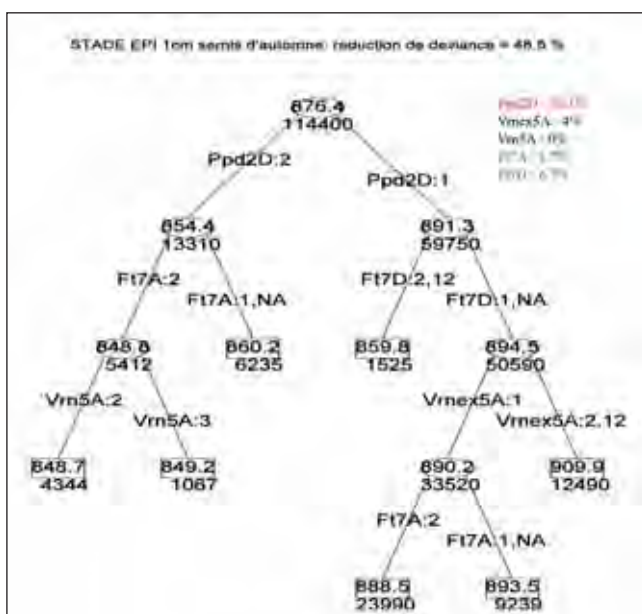


Figure 17 : arbre de segmentation pour la précocité à la montaison (moyenne des années 2009 et 2010), et pourcentage de déviance absorbé par chacun des marqueurs.

Relation entre phénotype et génotype pour la précocité à la montaison

La segmentation sur les allèles des gènes *Vrn-1*, *Ppd-1* et *FT* (Figure 17), permet une réduction de l'ordre de 50% de la déviance totale, moins forte que pour la précocité à l'épiaison (ce qui peut être dû, au moins en partie, à l'imprécision sur la mesure du stade épi 1 cm).

L'effet majeur vient là encore du gène *Ppd1-2D*, puisque la dichotomie sur les allèles 1 et 2 de ce gène absorbe environ 35% de cette déviance totale. Pour la précocité à la montaison, comme pour la précocité à l'épiaison, tous les gènes de développement disponibles (à l'exception de *Vrn1-5B*, au polymorphisme trop déséquilibré), apparaissent dans l'arbre de segmentation.

Relation entre précocité à la montaison et précocité à l'épiaison

La Figure 18 montre que la précocité à la montaison et la précocité à la floraison sont fortement corrélées ($R^2 > 0.7$). Sur la Figure, on remarque aussi qu'il y a un groupe de lignées qui se situent au dessus de la régression : ces génotypes, pour des valeurs de précocité à la montaison analogues, obtiennent des valeurs de précocité à l'épiaison plus élevées que les génotypes situés à proximité de la droite de régression, et se caractérisent donc par une durée « stade épi 1 cm - épiaison » plus importante. Il apparaît que ces lignées (LIMES, PROFILUS, ADEQUAT, etc...), sont les mêmes en 2009 et en 2010.

De la même manière, il y a un groupe de génotypes qui se situent en-dessous de la régression, et qui sont donc caractérisés par une durée « stade épi 1 cm - épiaison » plus faible que les génotypes situés à proximité de la régression. Là aussi, on constate que ce sont les mêmes en 2009 et en 2010 (RECITAL, QUALITY, COURTOT, etc...).

La durée « stade épi 1 cm - épiaison » semble donc être une caractéristique assez fortement déterminée par la génétique.

La Figure 19 donne les valeurs obtenues par les 126 génotypes pour la durée « stade épi 1 cm - épiaison ». Cette durée est inférieure à 480°C.jour pour QUALITY, RECITAL, ESPERIA, COURTOT, INGENIO et ST20710 ; et supérieure à 600°C.jour pour ADEQUAT, LIMES, PROFILUS, RE06058 et ESTICA. La

corrélation entre les valeurs de 2009 et de 2010 est très forte ($R^2 = 0.88$), ce qui indique un faible niveau d'interaction « génotype x année », et montre bien que cette durée a un fort déterminisme génétique. De plus, il n'apparaît pas d'effet « année », puisque les 2 points d'un même génotype sont presque toujours très proches.

4. Conclusion

Au cours des deux années d'expérimentation du projet, nous avons réuni un jeu de données particulièrement conséquent. Celui-ci a permis :

- de mettre au point une méthode de correction pour pouvoir estimer la précocité à la montaison à partir de mesures de longueur d'épi pouvant aller de 0.3 cm à 3 cm, ce qui est souvent le cas lorsqu'on réalise des prélèvements d'épis au voisinage du stade épi 1 cm sur des génotypes à la phénologie inconnue.
- de montrer que la durée « stade épi 1 cm - épiaison » est un caractère fortement dépendant du génotype. Si on arrivait à trouver de bons marqueurs de ce caractère, le problème de la détermination du stade épi 1 cm pourrait être en partie résolu puisqu'on pourrait alors l'estimer à partir de la date d'épiaison.
- de confirmer le fort déterminisme génétique de la précocité à la montaison et de la précocité à l'épiaison,

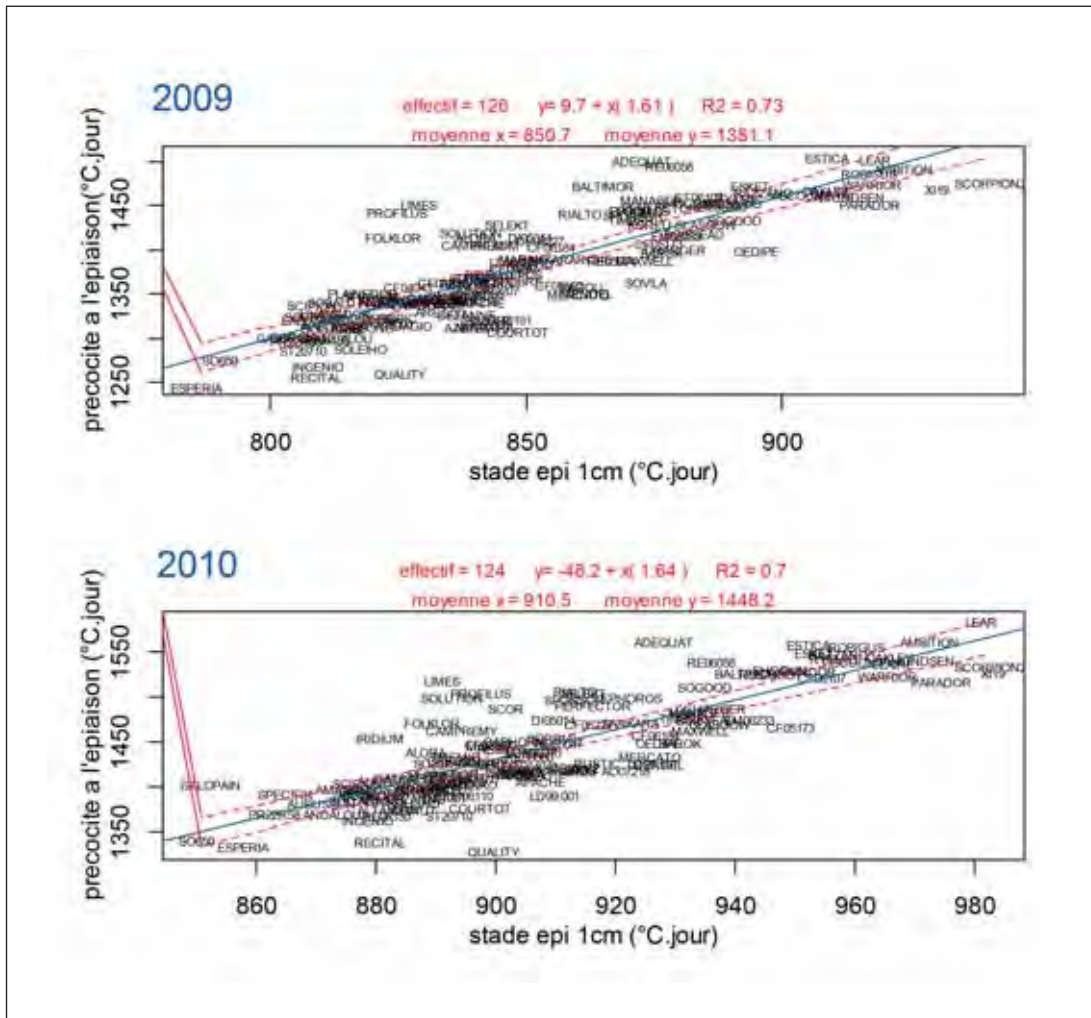


Figure 18 : relation entre précocité à la montaison et précocité à l'épiaison. Régressions calculées sur les valeurs moyennes obtenues en 2009 (graphique du haut), et en 2010 (graphique du bas).

et de montrer qu'avec un faible nombre de marqueurs aux gènes *Ppd-1*, *Vrn-1* et *FT*, on peut expliquer une part importante de la variabilité de ces caractères. Il serait maintenant intéressant de compléter ce travail de marquage avec d'autres gènes impliqués dans le déterminisme de la précocité, comme les gènes *Luminidependens* (*LD*) et *Gigantea* (*G*) situés sur le groupe 3, *Reduced height* (*Rht*) situé sur le groupe 4, *Constans* (*CO*(*HvCO3*)) situé sur le groupe 5, et *Constans* - *TaHd1* (*CO*) situé sur le groupe 6, pour voir si un modèle de prédiction de la précocité basé sur les seuls marqueurs peut atteindre une valeur prédictive suffisante (ce qui n'est pas encore le cas avec les marqueurs dont nous disposons pour cette étude).

- de révéler un effet inattendu du polymorphisme à l'exon 7 de *Vrn1-5A*, qui apparaît déterminant pour la définition des types « hiver » et « printemps » pour le matériel adapté à l'agriculture française. Dans des études antérieures basées sur une diversité génétique beaucoup plus large, la diversité allélique à l'exon 7 semblait avoir un effet insignifiant.
- de souligner l'importance de la précocité intrinsèque, dont la connaissance semble indispensable pour avoir des modèles génétiques de prédiction de la précocité vraiment performants, alors qu'on a encore très peu d'idée sur son déterminisme.

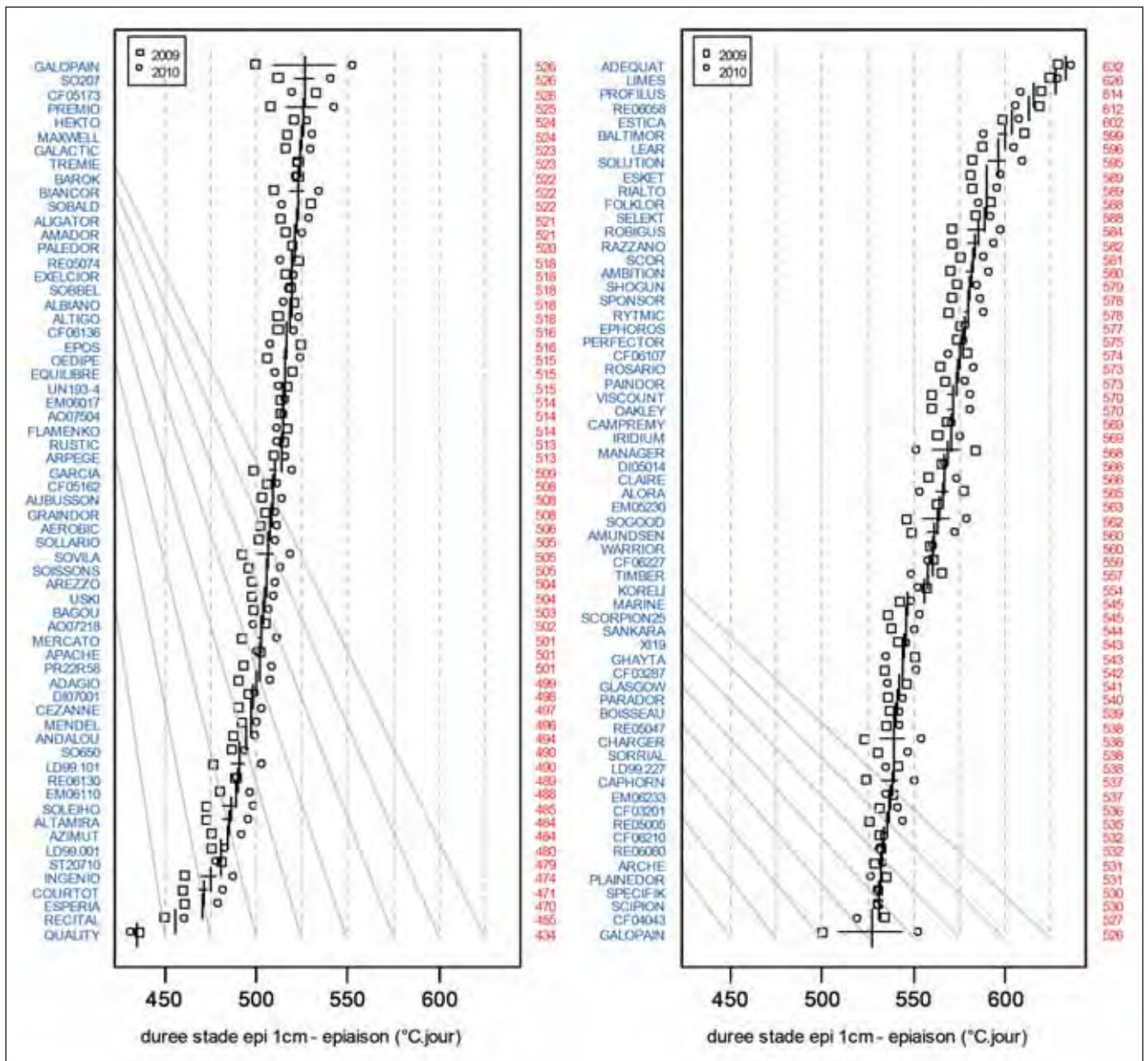


Figure 19 : durée entre le stade épi 1 cm et l'épiaison pour les 126 génotypes (valeurs moyennes pour les expérimentations de 2009 et pour les expérimentations de 2010).

Références bibliographiques

- Beales J., Turner A., Griffiths S., Snape J.W., Laurie D.A. (2007) A Pseudo-Response Regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Theoretical and Applied Genetics* 115:721-733.
- Brisson N., Gate P., Gouache D., Charmet G., Oury F-X., Huard F. (2010) Why are wheat yields stagnating in Europe? A comprehensive data analysis for France. *Field Crops Research* 119:201-212.
- Gate P., Blondlot A., Gouache D., Deudon O., Vignier L. (2008) Impacts du changement climatique sur la croissance et le développement du blé en France : quelles solutions et quelles actions à développer ? *Oléagineux, Corps gras, Lipides* 15 :332-336.
- 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 grain filling in France. *European Journal of Agronomy* 39:62-70.
- Le Gouis J., Bordes J., Ravel C., Heumez E., Faure S., Praud S., Galic N., Remoué C., Balfourier F., Allard V., Rousset M. (2012) Genome-wide association analysis to identify chromosomal regions determining components of earliness in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 124:597-611.
- Oury F-X., Godin C., Mailliar A., Chassin A., Gardet O., Giraud A., Heumez E., Morlais J-Y., Rolland B., Rousset M., Trottet M., Charmet G. (2012) A study of genetic progress due to selection reveals a negative effect of climate change on bread wheat yield in France. *European Journal of Agronomy* 40:28-38.
- Rhoné B., Remoué C., Galic N., Goldringer I., Bonnin I. (2008) Insight into the genetic bases of climatic adaptation in experimentally evolving wheat populations. *Molecular Ecology*, 17: 930-943.
- Rousset M., Bonnin I., Remoué C., Falque M., Rhoné B., Veyrieras J-B., Madur D., Murigneux A., Balfourier F., Le Gouis J., Santoni S., Goldringer I. (2011) Deciphering the genetics of flowering time by an association study on candidate genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 123:907-926.
- Weir A.H., Bragg P.L., Porter J.R., Rayner J.H. (1984) A winter wheat crop simulation model without water or nutrient limitations. *Journal of Agricultural Science* 102:371-382.

Exploitation de résistances durables aux septorioses et fusarioses du blé tendre

Olivier ROBERT*¹, Seyed MAHMOD, Tabib GHAFARY⁴, Ellen GOUEMAND¹, Laure DUCHALAIS², Laurent GUERREIRO³, Valérie LAURENT^{1,2}, Katia BEAUCHENE³, Éric MARGALE², Philippe LONNET¹, Gert H. J. KEMA⁴

* Coordinateur : Olivier ROBERT, olivier.robert@florimond-desprez.fr, Tél. : 03 20 84 94 90

- 1 - BIOPLANTE-FLORIMOND DESPREZ - BP41, 59242 Cappelle en Pévèle
- 2 - BIOPLANTE-R2N - 60 rue Léon Beauchamp, 59930 La Chapelle d'Armentières
- 3 - ARVALIS-Institut du végétal - 3 rue Joseph & Marie Hackin, 75116 Paris
- 4 - PLANT RESEARCH INTERNATIONAL - BIOINTERACTIONS AND PLANT HEALTH, P.O. Box 16, 6700 AA Wageningen, The Netherlands

1. Introduction

La septoriose est une maladie du blé qui peut être provoquée par deux champignons : *Zymoseptoria tritici* (*Septoria tritici* ou *Mycosphaerella graminicola*) et *Stagonospora nodorum* (*Septoria nodorum*). *Z. tritici* est désormais majoritaire en Europe et provoque souvent de fortes diminutions du rendement. Cette maladie du blé est donc classée parmi les plus dévastatrices en Europe de l'Ouest et chaque année environ 300 millions d'euros sont dépensés pour lutter contre ce parasite. Depuis que cette maladie est étudiée, seulement 15 gènes de résistance spécifique à *Z. tritici* ont été identifiés et malheureusement, la plupart d'entre-eux sont maintenant inefficaces. Il est donc important de rechercher et d'identifier de nouveaux gènes ou QTL de résistance à cette maladie pour offrir la possibilité au sélectionneur d'obtenir de nouvelles variétés avec de nouvelles sources de résistance.

La fusariose est une maladie du blé qui peut provoquer des pertes de rendement pouvant atteindre de 30 à 70% (Bai et Shaner 1994) lorsque les conditions environnementales sont favorables au développement de la maladie (pluie d'orage durant l'épiaison et précédent maïs). Outre la perte de rendement, cette maladie est responsable de l'accumulation de toxines dans les grains. Actuellement, il n'existe pas de variétés suffisamment résistantes pour que l'agriculteur puisse faire l'impasse, sans risques, sur des traitements fongicides contre ce pathogène.

Fournir aux agriculteurs français des variétés plus résistantes à ces 2 maladies représente donc un enjeu stratégique, puisque la culture de telles variétés leur permettra à la fois de réduire leurs intrants et de sécuriser leurs débouchés.

Ce projet avait pour objectif de valoriser les résultats du projet précédent (FSOV 2004 : Détection et exploitation de résistances durables aux septorioses et fusarioses du blé tendre). Ainsi, nous avons identifié des lignées avec un très bon niveau de résistance à la fusariose et à la septoriose et développé des populations haploïdes doublées (HD) nous permettant d'étudier la génétique de la résistance des lignées résistantes. Dans ce projet, il était également prévu qu'une population HD issue de la lignée Chine 94.4 soit étudiée pour la résistance à la fusariose et que trois autres le soient pour la résistance à la septoriose. Malheureusement la population retenue pour la fusariose n'a pas pu être exploitée à cause de sa trop grande sensibilité au froid et il a alors été décidé de recentrer les efforts de ce programme sur la septoriose en étudiant sept populations produite par

BIOPLANTE et une population produite par USDA-ARS au lieu des trois initialement prévues.

2. Matériel et méthodes

► Matériel végétal

Les 7 populations Bioplante sont constituées de lignées haploïdes doublées (HD). Leur effectif varie entre 63 lignées pour la population Nogal/Bio110 et 97 lignées pour la population Cordiale/Nuage (Tableau 1).

La population Kulm/M3 a été produite par J. Faris de USDA-ARS (Fargo). Elle est constituée de 96 lignées RIL au stade F6 :7 issues de SSD.

Population	Abbréviation	Nombre de lignées	Environnements *
Apache × Balance	A × B	91	Ad05Cap, Ad05Pre, Ad06Pre, Ad07Cap, Ad07Pre, Se07Wag, Ad08Cap, Ad08Pre
FD3 × Robigus	F3 × R	87	Ad04Cap, Ad04Pre, Ad05Pre, Ad06Pre, Ad08Cap, Se08Wag, Ad09Pre, Ad10Cap
Robigus × Soissons	R × S	92	Ad09Cap, Ad10Cap
FD12 × SE11	F12 × S11	88	Ad05Cap, Ad08Pre, Ad09Cap, Ad10Cap
Cordiale × Nuage	C × Nu	97	Ad09Cap, Ad10Pre
Bermude × Timber	Be × T	82	Ad09Cap, Ad10Pre
Nogal × Bio110	No × Bi	63	Ad10Cap

* : Le suffixe numérique correspond à l'année d'expérimentation
Ad (Adult stage) stade adulte, Se (Seedlings) stade juvénile,
Cap Cappelle-en-pévèle (FR), Pre Prêmesques (FR),
Wag Wageningen (NL)

Tableau 1 : Populations Bioplante étudiées pour la détection des QTL de résistance à *Zymoseptoria tritici* en fonction des stades de développement et des environnements testés

► Géotypage des lignées HD

Marquage moléculaire

L'extraction d'ADN a été effectuée à partir de 50 mg de feuilles fraîches conservées à -80°C pendant 24h et lyophilisées

pendant 48h. Les feuilles desséchées ont ensuite été broyées. L'ADN a été extrait et purifié grâce à un kit NucleoSpin®96 Plant (Macherey-Nagel).

Des marqueurs SSR de type gwm (Röder *et al.* 1998), wmc (Gupta *et al.* 2002), gpw (Sourdille *et al.* 2001) cfa, cfe, cfd (Guyomarc'h *et al.* 2002) et barc (USDA-ARS Beltsville Agriculture Research Station) ont été utilisés pour 4 populations. 284, 169, 57 et 3 SSR polymorphes ont été cartographiés respectivement sur les populations Kulm/M3, Apache/Balance, FD3/Robigus et Nogal/Bio110.

Plusieurs puces DArT (Triticarte Lty) ayant de 2500 à 7000 marqueurs ont été utilisées sur les différentes populations.

3. Tests de résistance

► Tests au champ

Ces populations ont été phénotypées au champ à Cappelle en Pévèle et à Prémescques par Bioplante et à Wageningen (NL) au stade juvénile par PRI durant la période allant de 2000 (précédent programme FSOV) à 2010 (Tableau 1).

Au champ, les essais ont été mis en place en bloc complet avec 1 à 2 répétitions par lieu. Selon les lieux, chaque génotype comporte entre 30 et 50 plantes semées au semoir de précision. L'humidité est contrôlée artificiellement par une irrigation de 5mm/h chaque nuit afin de maintenir un environnement favorable au développement du pathogène.

L'inoculation est effectuée par pulvérisation de l'inoculum sur les plantes. La première inoculation est effectuée au stade montaison/début-épiaison et est suivie de deux autres passages à intervalle d'une semaine. La première notation est effectuée 3 semaines après l'inoculation. Chaque lignée est notée en termes de résistance à la septoriose et selon des paramètres morphologiques. Une notation « sélectionneur » (BN) a été effectuée (1-résistant à 9 -sensible) ainsi que la notation du pourcentage de la surface de la feuille drapeau atteintes de symptômes (PS).

► Tests au stade juvénile

La résistance à la septoriose de la population Kulm/M3 a été étudiée au stade juvénile avec 20 isolats de *Z. tritici* (Tabib Ghaffary *et al.* 2012). La population Apache/Balance a été testée avec 30 isolats de *Z. tritici* (Ghaffary *et al.* 2011). Les autres populations ont été testées avec 14 isolats de *Z. tritici*. Les conditions d'inoculations et de lecture des symptômes sont identiques pour toutes les populations et décrites dans les articles de Ghaffary *et al.* (2001 et 2012).

4. Analyses des données

► Analyses statistiques

Les effets des répétitions, années et lieux ont été testés par une analyse de variance grâce au logiciel R v2.6.0. L'héritabilité au sens large a été estimée à partir de l'ANOVA. Les coefficients de corrélation (r^2) entre caractères phénotypiques ont été calculés sous R.

► Analyses de liaison

Cartographies génétiques et Détection de QTL

Pour chaque marqueur, la ségrégation allélique obtenue a été comparé au ratio 1:1 attendu par un test du Chi-2 ($\alpha=0.01$). Les cartographies génétiques des 7 populations

ont été effectuées grâce au logiciel MapDisto 1.7.0 (Lorieux, 2006). Les groupes de liaison ont été établis avec un Lod score de 3 et un taux de recombinaison inférieur à 0,40. Les distances génétiques entre marqueurs (cM) ont été estimées avec la fonction de Kosambi.

Les QTL ont été recherchés avec le logiciel WinQTL cartographeur version 2.5 (Wang *et al.*, 2007).

► Analyse conjointe de QTL : la Méta-analyse

Une carte consensus regroupant les 7 populations Bioplante, 34 cartes (obtenues par l'INRA GDEC), ainsi que la carte consensus du chromosome 3B (Wenzl *et al.*, 2010) a été réalisé avec le logiciel MetaQTL (Veyrieras *et al.*, 2007).

La Méta-analyse a été effectuée avec le logiciel MetaQTL. Le nombre optimal de MQTL est déterminé par la minimisation du critère d'Akaike (AIC).

► Analyses d'association

Les allèles rares (moins de 5% de présence) ont été considérés comme données manquantes pour éviter les liaisons marqueur/caractère erronées. L'utilisation du logiciel STRUCTURE 2.3.3 a permis de déterminer la structure du matériel végétal utilisé dans l'analyse. Un modèle avec un burn-in de 5000 itérations et 5000 MCMC (Chaînes de Markov par méthode de Monte Carlo) a été utilisé pour évaluer le nombre de sous-populations. Le nombre optimal de sous-population a été estimé en suivant la méthode d'Evanno (Evanno *et al.*, 2005).

Les matrices de kinship ont été produites à partir des logiciels CoCoe 1.0 grâce à un estimateur AIS (Alikeness In State) et TASSEL 2.1.

L'utilisation du logiciel TASSEL 2.1 a permis le calcul des associations entre les marqueurs et les caractères d'intérêt en utilisant 2 modèles (le modèle général linéaire (GLM) et le modèle mixte linéaire (MLM)).

5. Résultats et Discussion

Les populations Kulm/M3 et Apache/Balance ayant fait l'objet d'une étude approfondie de leur résistance au stade juvénile pour la détection de gènes majeurs spécifiques, les résultats obtenus seront détaillés en dehors de « l'analyse multi-populations ».

► Analyse multi-populations

Cartographie génétique consensus

La carte consensus, construite à partir des 42 cartes initiales, comprend 8856 marqueurs distribués sur 21 groupes de liaison et couvre 3345 cM Kosambi. Le nombre de marqueurs par chromosome varie de 170 (4D) à 1322 (3B). La densité de marqueurs est en moyenne de 2,65 marqueurs par cM (Tableau 2).

Méta-analyse et génétique d'association

- Détection de QTL de résistance à la septoriose au stade adulte

La détection de QTL a été menée sur les 7 populations pour la précocité à l'épiaison, pour la hauteur des plantes et pour le pourcentage de symptômes de septoriose évalués sur plusieurs années. Au total, 115 QTL de résistance à la septoriose et 66 QTL liés à la hauteur et la précocité ont été identifiés et cartographiés sur la carte consensus (Tableau 3).

Chromosomes	Nombre de marqueurs	Taille (cM)	Densité (x marqueurs par cM)
1A	464	126	3.68
1B	520	127.62	4.07
1D	290	124.4	2.33
2A	411	244.99	1.68
2B	575	212.96	2.70
2D	408	138.07	2.96
3A	325	159.55	2.04
3B	1322	147.74	8.95
3D	352	105.23	3.35
4A	388	160.98	2.41
4B	266	139.06	1.91
4D	170	108.33	1.57
5A	287	179.85	1.60
5B	423	273.31	1.55
5D	250	128.31	1.95
6A	455	170.11	2.67
6B	429	146.71	2.92
6D	206	132.4	1.56
7A	453	147.6	3.07
7B	410	173.82	2.36
7D	452	197.99	2.28
TOTAL	8856	3345.03	2.65

Tableau 2 : Répartition des marqueurs sur la carte consensus

Ces QTL sont présents sur presque tous les chromosomes, mais pour la résistance à la septoriose, aucun QTL n'a été détecté sur les chromosomes 1D, 5D et 7B.

• Analyse Méta-QTL

L'analyse Méta-QTL de l'ensemble de ces QTL, détectés plusieurs fois dans des expérimentations différentes (lieu et/ou année), a permis de regrouper les QTL identiques en M-QTL. Ainsi, les 115 QTL détectés ont été regroupés en 27 M-QTL et seulement 10 QTL n'ont pas pu être associés à un M-QTL (Tableau 4). Parmi ces 27 M-QTL, 14 colocalisent avec des QTL de hauteur ou de précocité. Le pourcentage de variance expliqué par les QTL initiaux constituant ces M-QTL varie de 7 à 64%.

• Analyses de génétique d'association

Les analyses du déséquilibre de liaison (LD) ont été effectuées sur l'ensemble du matériel Bioplante (613 génotypes). La corrélation entre le r^2 et la distance en cM est significative. Les deux modèles GLM et MLM ont été comparés et le nombre d'associations significatives entre les marqueurs et les caractères (MTA) est supérieur avec le modèle GLM. Ainsi, pour le pourcentage de symptômes de septoriose, 24 MTA ont été identifiées avec le modèle GLM contre seulement 8 MTA avec le modèle MLM. De même avec la notation sélectionneur de la septoriose (BN), 35 et 13 MTA ont été identifiées avec les modèles GLM et MLM respectivement (dont 21 MTA sont identiques aux deux modèles) (Tableau 5).

Chromosome	Populations														TOTAL	
	A x B		R x S		F3 x R		No x Bi		F12 x S11		Be x T		C x Nu			
1A	-	1(1)	-	2(2)	-	2(2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5(4)
1B	-	3(3)	-	-	1(1)	1(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	1(1)	4(3)
1D	1(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1(1)	-
2A	-	1(1)	1(1)	-	-	2(2)	1(1)	-	-	-	2(2)	2(1)	-	1(1)	4(4)	6(5)
2B	-	3(3)	-	-	1(1)	3(3)	-	-	2(2)	-	-	-	-	1(1)	3(3)	7(7)
2D	6(5)	7(7)	3(2)	-	-	2(2)	2(2)	-	-	-	-	2(1)	-	-	11(9)	11(10)
3A	-	5(4)	-	1(1)	-	7(5)	-	2(2)	-	-	-	-	-	-	-	15(12)
3B	1(1)	1(1)	-	-	-	-	-	1(1)	-	-	2(1)	1(1)	-	1(1)	3(2)	4(4)
3D	-	2(2)	-	-	-	-	-	1(1)	-	-	1(1)	2(1)	-	-	1(1)	5(4)
4A	-	-	-	-	-	2(2)	1(1)	-	-	-	-	-	3(2)	-	4(3)	2(2)
4B	1(1)	1(1)	1(1)	-	4(3)	2(2)	-	-	-	-	1(1)	-	2(2)	-	9(8)	3(3)
4D	2(2)	-	-	-	7(5)	7(6)	-	-	-	-	-	-	1(1)	-	10(8)	7(6)
5A	-	1(1)	1(1)	2(1)	-	2(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	1(1)	5(4)
5B	1(1)	-	-	-	-	1(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	1(1)	1(1)
5D	1(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1(1)	-
6A	-	-	-	-	-	4(3)	-	1(1)	-	-	-	-	-	-	-	5(4)
6B	-	-	-	3(2)	1(1)	4(4)	-	-	-	-	-	-	-	1(1)	1(1)	8(7)
6D	2(2)	8(6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2(2)	8(6)
7A	1(1)	1(1)	-	-	2(2)	2(2)	-	-	1(1)	4(1)	1(1)	-	-	-	5(5)	7(4)
7B	3(3)	-	-	-	3(3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6(6)	-
7D	-	9(7)	-	1(1)	-	-	2(2)	2(1)	-	-	-	-	-	-	2(2)	12(9)
TOTAL	19	43	6	9	19	44	6	7	3	4	7	7	6	4	66	115

Le nombre avant les parenthèses représente le nombre de QTL projetés ; " - " Absence de QTL ; Les colonnes grisées regroupent les QTL liés à la résistance à la septoriose tandis les autres regroupent des QTL lié à la précocité de floraison et à la hauteur des plantes. Le nombre entre parenthèses représente le nombre d'expérimentation révélant le QTL.

Tableau 3 : Nombre de QTL de précocité, hauteur et de résistance à la septoriose projetés sur la carte consensus.

Nom	Chr*	IC** (cM)	Nombre de QTL rassemblés***	Type de QTL initiaux et Populations				Marqueurs liés aux gènes STB de résistance	R ² (STB)
				Stade		Hauteur	Épiaison		
				Plantule	Adulte				
MQTL1	1A	19.2 - 25.4	3	F3×R	R×S F3×R	-	-	wPt-7905, wPt-2527, gpw7072	12 à 18%
QTL1	1A	48.5 - 66.3	1	-	R×S	-	-	wPt-669563	11%
QTL2	1A	107.3 - 112	1	-	A×B	-	-	wPt-732616, wPt-1011	10%
MQTL2	1B	36.6 - 40.5	3	A×B	A×B	-	-	wPt-4325, gpw4069, tPt-8929	7 à 12%
MQTL3	1B	74.1 - 75.9	2	-	F3×R	-	F3×R	wPt-6975, wPt-4721, wPt-5281	11%
MQTL4	2A	81.7 - 88.5	7	-	F3×R ; B×T C×Nu	R×S	B×T	wPt-740658, wmc177, wPt-9320, wPt-6711	11 à 17%
MQTL5	2A	176 - 178.2	3	-	F3×R ; A×B	No×Bi	-	wPt-9277, wPt-6662, wPt-741584, wPt-7901	9 à 11%
QTL3	2B	18.1 - 26.1	1	-	F3×R	-	-	wmc764, wPt-0289, wPt-4453	20%
MQTL6	2B	58.1 - 69.7	3	F3×R A×B	-	-	-	wPt-5672, gpw7438, wPt-6199, wPt-8583	11 à 22%
MQTL7	2B	72.2 - 78.5	3	-	A×B	-	F12×S11	wPt-0335, wPt-668084, gpw3032	17%
MQTL8	2B	85.9 - 87.5	3	-	C×Nu F3×R	F3×R	-	wPt-1646, wPt-0189, wPt-8340	11 à 15%
MQTL9	2D	35.3 - 39.2	3	A×B	F3×R	-	-	cfD36b, wPt-6003, wPt-6780	11 à 24%
MQTL10	2D	63.27 - 67.23	16	-	A×B	R×S A×B	R×S A×B	gwm332, gwm484, wPt-6419	10 à 26%
MQTL11	2D	86.73 - 89.7	4	-	B×T	-	No×Bi	wPt-665644, wPt-8330, wPt-0298	12%
MQTL12	3A	50.2 - 52.6	13	A×B F3×R	A×B ; F3×R No×Bi	-	-	wPt-0714, wPt-5486, wPt-0951, wPt-0797	9 à 77%
MQTL13	3A	132.3 - 133.7	2	-	F3×R ; R×S	-	-	wPt-1036, wPt-1596, wPt-9761	15 à 18%
MQTL14	3B	75.6 - 83.9	4	A×B	No×Bi C×Nu	-	B×T	wPt-0644, wPt-11278, wPt-3725, wPt-5358	6 à 15%
QTL4	3B	137.6 - 140.1	1	-	B×T	-	-	wPt-0343, wPt-6834, wPt-10758	15%
QTL5	3D	0 - 3.4	1	-	A×B	-	-	cfD141a, gwm161	8%
MQTL15	3D	21.9 - 24	4	A×B	B×T ; No×Bi	-	-	wPt-732185, barc125, wPt-731416	7 à 20%
QTL6	4A	42.3 - 61.1	1	-	F3×R	-	-	wPt-798213	17%
QTL7	4A	97.7 - 117.1	1	-	F3×R	-	-	wPt-6997	11%
MQTL16	4B	62.7 - 71.4	3	-	F3×R ; A×B	F3×R	-	wmc617, wPt-3439, gwm149, wPt-8650	9 à 18%
MQTL17	4B	81.8 - 83.1	9	-	F3×R	R×S ; A×B F3×R	C×Nu ; B×T F3×R	wPt-3991, wPt-1101, wPt-7365, wPt-6209	13%
MQTL18	4D	38.1 - 38.3	17	-	F3×R	A×B C×Nu F3×R	-	wPt-5809, wPt-0431, wPt-3058, wPt-665313	10 à 30%
MQTL19	5A	24.7 - 34.2	4	F3×R	R×S	-	R×S	wPt-2697, wPt-797382, tPt-6183	8 à 16%
QTL8	5A	39.9 - 53.6	1	-	A×B	-	-	wPt-3620, wPt-0605, gwm129	17%
QTL9	5A	159.3 - 159.8	1	F3×R	-	-	-	wPt-7061, wPt-1200, wPt-2873	16%
QTL10	5B	154.8 - 165.5	1	F3×R	-	-	-	wPt-664788, wPt-3076	14%
MQTL20	6A	18.4 - 20.3	5	F3×R	F3×R No×Bi	-	-	wPt-0864, tPt-4209, wPt-1664, wPt-9132	10 à 15%
MQTL21	6B	40.7 - 42.5	9	F3×R	F3×R ; R×S C×Nu	-	F3×R	wPt-729979, wPt-2587, wPt-2297, wPt-6437	6 à 20%
MQTL22	6D	26.86 - 30.1	8	A×B	A×B	-	-	gpw5176, gpw3087, wPt-665166	10 à 64%
MQTL23	7A	14.2 - 18.5	3	F3×R	F3×R	-	F3×R	wPt-8171, wPt-3794, wPt-732309, wPt-1510	15 à 42%
MQTL24	7A	103.3 - 104.4	5	-	F12×S11 A×B	-	-	wPt-5524, wPt-0639, wPt-0971, wPt-744897	11 à 32%
MQTL25	7D	87.7 - 91.7	7	A×B	-	-	-	wPt-744433, wPt-664469, gwm111	6 à 33%
MQTL26	7D	117.8 - 127.5	4	-	No×Bi	-	No×Bi	wPt-2258, wPt-7642	33%
MQTL27	7D	136.2 - 147.5	3	-	A×B ; R×S	-	-	wPt-667894, wPt-7368, wPt-6553	8 to 15%

* Chr Chromosome; ** CI 95% Intervalle de confiance; *** Nombre de QTL initiaux regroupés en Méta-QTL ; R² est le pourcentage de la variance expliquée par les QTL initiaux ; Les QTL en gris représentent un QTL unique pour la résistance à la septoriose; Le marqueur le plus lié à la résistance est souligné.

Tableau 4 : Résultats de Meta-analyse pour la résistance à la Septoriose

A-QTL	Marqueur	Chr.	Position	Caractère		Méthode		R ²
				Pourcentage de symptômes	Notation sélectionneur	GLM	MLM	
A-QTL1	wPt-6005	1A	114,02		X		X	0,025
A-QTL2	tPt-9405	2A	80,43	X	X	X		0.042 à 0.044
	wPt-664251	2A	87	X	X	X		0.041 à 0.049
A-QTL3	barc124	2D	29,18	X		X		0,126
	cf56	2D	29,27	X		X		0,115
	cf51	2D	31,53	X		X		0,178
	gpw5261	2D	31,53	X		X		0,158
	cf36b	2D	34,58	X		X		0,171
A-QTL4	wPt-667584	2D	63,21	X	X		X	0.023 à 0.025
	gpw332	2D	64,32	X	X	X		0,24
	wPt-0724	2D	69,27	X	X	X	X	0.02 à 0.032
	wPt-731409	2D	69,51		X	X	X	0.024 à 0.025
	wPt-666987	2D	70,07		X		X	0,023
A-QTL5	wPt-8330	2D	88,27	X	X	X	X	0.019 à 0.043
	wPt-0298	2D	90,33	X	X		X	0.021 à 0.023
A-QTL6	wPt-1923	3A	49,18	X		X	X	0.072 à 0.156
	wPt-0797	3A	53,07	X		X	X	0.044 à 0.057
A-QTL7	wPt-0343	3B	138,86		X	X	X	0.036 à 0.038
A-QTL8	tPt-4209	6A	18,74		X		X	0,03
A-QTL9	wPt-745052	6B	39,26	X			X	0,024
	wPt-729979	6B	41,26		X	X		0,04
A-QTL10	gpw5176	6D	25,6		X	X		0,154
	gpw3087	6D	31,46		X	X		0,199
A-QTL11	gpw4440	6D	46,93		X	X	X	0.059 à 0.068
	gpw4159	6D	48,45		X	X		0,058
	gpw4350	6D	51,31		X	X		0,115

X dans la colonne "Caractère" indique la présence d'une association entre le marqueur et un caractère spécifique ; X dans la colonne "Méthode" indique la méthode utilisée pour détecter cette association ; Seuls les marqueurs expliquant plus de 2% la variation phénotypique (R²>0.02) sont présentés ; A-QTL est un QTL identifié par analyse d'association.

Tableau 5 : Associations entre les marqueurs et les caractères identifiés avec les modèles GLM et MLM

Analyse spécifique de la population Kulm/M3 : Identification des gènes *Stb16q* et *Stb17*

Un QTL majeur a été identifié sur le chromosome 3DL aussi bien au stade juvénile qu'au stade adulte. Le pic de ce QTL a la même position avec les deux isolats testés et la valeur de son LOD atteint 8.4. Ce locus explique jusqu'à 31% de la variance phénotypique de la résistance. Il est encadré par les marqueurs SSR *Xwmc494* et *Xbarc125* (Tableau 6). Ce QTL correspond à un gène majeur de résistance spécifique que Tabib Ghaffary *et al.* (2012) ont nommé *Stb16q*. Le gène *Stb16q* a pour origine le blé synthétique M3 et plus précisément l'accèsion d'*Ae. tauschii* C122.

Un autre QTL majeur a été détecté sur le chromosome 5AL. Il explique jusqu'à 32% de la variation phénotypique au stade adulte et a un LOD de 8.9. Ce QTL est encadré par les SSR *Xgwm617* et *Whbg247*. Ce QTL correspond à un gène majeur de résistance adulte spécifique que Tabib Ghaffary *et al.* (2012) ont nommé *Stb17*.

Analyse spécifique de la population Apache/Balance : Identification du gène *Stb18*

Cinq QTL liés à la résistance à la septoriose au stade juvénile ont été identifiés sur les chromosomes 1BS, 3AS, 6DS, 7DL et 7DS (Tableau 7).

Trois QTL de résistance à la septoriose ont été détectés au stade adulte sur les chromosomes 2DS, 3AS et 6DS (Tableau 8). Le QTL du chromosome 2DS est spécifique du stade adulte tandis que les QTL des chromosomes 3AS et 6DS correspondent à ceux identifiés au stade juvénile.

L'analyse de ces marqueurs, validée par l'étude des virulences présentes dans les isolats utilisés pour tester la résistance des lignées, permet d'associer des gènes majeurs aux QTL détectés dans cette étude. Ainsi, le QTL 1BS identifié au stade juvénile chez Apache correspond au gène *Stb11* et le QTL sur le 7DS d'Apache correspond au gène *Stb4*. Le QTL 3AS de Balance correspond au gène *Stb6*. Le QTL 7DL, quant à lui, ne correspond à aucun gène connu.

Gène/ Bras Chromosomique	Intervalle des marqueurs	Position (cM)	Source de résistance	LOD (21/28dpi)	R ² (21/28dpi)	Effet additif (21dpi/28dpi)
<i>Stb16q</i> /3DL	Xbarc125-Xbarc128	58.0	M3	7.2/8.4	0.28/0.31	7.4/11.9
<i>Stb17</i> /5AL	Xgwm617-Xhbg247	62.0	M3	3.0/8.9	0.12/0.32	4.5/12.3

dpi : Nombre de jours entre l'inoculation et la notation des symptômes.

Tableau 6 : Valeurs des LOD et R² de *Stb16q* et *Stb17* pour la résistance à l'isolat IPO88018 de *Mycosphaerella graminicola*, évaluée au stade adulte, dans la population RIL issue du croisement Kulm/M3.

Un complément d'information est toutefois nécessaire pour savoir s'il s'agit réellement d'un nouveau gène majeur de résistance spécifique.

Le QTL majeur de résistance identifié sur le chromosome 6DS de la variété Balance ne correspond à aucun gène connu. Le pic de ce QTL a la même position avec les deux isolats testés et la valeur de son LOD atteint 8.4. Ce locus explique jusqu'à 31% de la variance phénotypique de la résistance au stade juvénile. Il est encadré par les marqueurs SSR *Xgpw3087* et *Xgpw5176*. Ce QTL correspond à un gène majeur de résistance spécifique que Tabib Ghaffary *et al.* (2011) ont nommé *Stb18*.

5. Conclusions

Ce programme a permis d'identifier 3 nouveaux gènes de résistance spécifique à la septoriose. Ces 3 nouveaux gènes portent ainsi à 18 le nombre total de gènes *Stb* connus à ce jour. De nouveaux M-QTL et A-QTL de résistance à la septoriose ont également été identifiés. Certains d'entre eux correspondent à des gènes *Stb* déjà connus, mais d'autres n'avaient pas encore été identifiés. Grâce à l'ensemble de ces résultats, le sélectionneur a la possibilité d'utiliser et de combiner plusieurs sources de résistances (3 gènes *Stb*, 10 QTL, 27 M-QTL dont 11 sont confirmés en A-QTL) efficaces

Isolat	Marqueur le plus lié	Chr.	Ensemble de données phénotypique ¹	Source de résistance	N			P		
					PD ² (cM)	LOD	Exp. (%)	PD (cM)	LOD	Exp. (%)
IPO323	wPt-0836	3AS	R1	Balance	0	12.2	46.1	1	7.3	27.7
			R2		1	25.5	73.7	1	11.1	39.7
			R3		1	25.6	73.1	1	10.8	38.7
	Xgpw5176-Xgpw3087 ³	6DS	R1	Balance	3.2- 5	3.6	12.7			
			R2		0.3- 8	3.1	8.9			
			R3		4.3- 4	3.5	11			
IPO98022	Xgpw5176-Xgpw3087 ³	6DS	R1	Balance	6.3- 2	6.4	30.4	5.3- 3	16.3	47
			R2		8.3- 0	5.4	21.6	5.3- 3	13.1	47.4
			R3		0.3- 8	4.4	18.8	5.3- 3	12.3	48
	Xgwm111	7DS	R1	Apache				1.1	6.2	11.8
			R2					0	5.2	11.2
			R3					0	2.2 ⁴	5.9
IPO89011	Xgpw5176-Xgpw3087 ³	6DS	Ave.	Balance				5.3- 3	23.1	67.5
	wPt-1859	7DL	Ave.		Apache				0	4.5
IPO98046	Xgwm111	7DS	R1	Apache				0	9.5	27.5
			R2					- ⁵	-	-
			R3					0	6.2	20.8
	Xgpw313	7DL	R1	Apache				-	-	-
			R2					5	6.8	20.5
			R3					-	-	-
			Ave.							
	Xgpw5176-Xgpw3087 ³	6DS	R1	Balance				8.3- 0	7	19
			R2					8.3- 0	7.9	24.2
			R3					6.3- 2	7.4	27.1
IPO87016	wPt-2019	1BS	R1	Apache				2	19.1	63.3
			R2					1	21.1	68.3
			R3					0	17.8	59.3
			Ave.		1	21.1	67.3			

1 : R1, R2 and R3 représentent les données de la première, la seconde et la troisième répétition. L'analyse QTL a été effectuée sur des données moyennes (Ave) quand le test du χ^2 de Bartlett indiquait une absence de significativité des variations phénotypiques entre répétitions, sinon les répétitions étaient analysées individuellement.
2 : PD = Distance au pic du QTL en cM.

Tableau 7 : Quantitative trait loci (QTLs) associé avec la nécrose (N) and le développement des pycnides (P) dans la population HD Apache/Balance après inoculation de 5 isolats de *Mycosphaerella graminicola* au stade juvénile.

Marqueurs	Lieu an	Lésion de la feuille drapeau									Précocité						Hauteur					
		R2n 2007			R2n 2008			F. Desprez 2008			R2n 2008			F. Desprez 2008			R2n 2008			F. Desprez 2008		
	Chr.	PD1	LOD	Exp %	PD	LOD	Exp %	PD	LOD	Exp %	PD	LOD	Exp %	PD	LOD	Exp %	PD	LOD	Exp %	PD	LOD	Exp %
Xgpw332b	2DS	2	8.9	30.9	6	3.5	7.8	11.9	6.7	30.9	5	24	77.5	3	27.3	79.3	6	5.6	24.8	7	6.56	23.3
wPt-0797	3AS	0	6.2	19.1																		
wPt-0836	3AS				1	14.2	35.6	1	8.6	28.6												
Xgpw5176-Xgpw30872	6DS				8.3	5.9	12.5															

1 : PD = Distance au pic du QTL en cM - 2 : Marqueurs flanquants

Tableau 8 : Quantitative trait loci (QTL) associé à la résistance à la Septoriose (isolat IPO323 de *M. graminicola*), à la précocité et à la hauteur des plantes au stade adulte au champ.

aux stades juvénile et adulte. Par un cumul approprié de ces différentes sources de résistance, il sera en mesure d'obtenir de nouvelles variétés présentant une résistance efficace et durable vis à vis de la septoriose.

Ainsi, le gène *Stb16q* nous semble être un gène très pertinent. Cependant les marqueurs liés à ce gène restent perfectibles pour une utilisation en sélection... De ce fait, nous voudrions identifier de nouveaux marqueurs très proches du gène (ou dans le gène) pour permettre une utilisation facile de *Stb16q* en sélection. Nous avons donc décidé de démarrer un nouveau programme FSOV qui a pour objectif principal d'identifier de tels marqueurs et qui sera

également à la base d'une démarche du clonage de ce gène de résistance (démarche qui offrira de multiples opportunités d'exploitation pour la recherche académique).

► Remerciements

La carte consensus a été le fruit d'une collaboration entre les partenaires de ce programme et l'INRA-GDEC (Laetitia CHEVARIN, Jacques BORDES et Jacques Le GOUIS). Par ailleurs, sans la collaboration de Justin Faris (ARS-USDA, Fargo), nous n'aurions pas été en mesure d'identifier les gènes *Stb16q* et *Stb17*. Les partenaires du programme tiennent donc à les remercier pour leur aide apportée à ce programme.

Références bibliographiques

- Bai G. H. and Shaner G. (1994). "Scab of Wheat - Prospects for Control." *Plant Disease* 78(8): 760-766.
- Evanno G., Regnaut S. et Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Gupta P.K., Balyan H.S., Edwards K.J, Isaac P., Korzun V., Röder M., Gautier M.F., Jourdrier P. et Schlatter A.R. (2002) Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 105 :413-422
- Ghaffary S. M. T., O. Robert, V. Laurent, P. Lonnet, E. Margalé, Van der Lee T.A.J., Visser R.G.F., Gert H.J. Kema (2011). "Genetic analysis of resistance to septoria tritici blotch in the French winter wheat cultivars Balance and Apache." *Theoretical and Applied Genetics* 123(5): 741-754.
- Tabib Ghaffary S.M., Faris J.D., Friesen T.L., Visser R.G.F., Van der Lee T.A.J., Robert O., Kema G.H.J. (2012). "New broad-spectrum resistance to septoria tritici blotch derived from synthetic hexaploid wheat." *TAG Theoretical and Applied Genetics* 124(1): 125-142.
- Guyomarc'h H., Sourdille P., Charmet G., Edwards K. and Bernard M. (2002) Characterisation of polymorphic microsatellites markers from *Aegilops tauschii* and transferability to the D-genome of bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 104:1164-1172
- Röder M.S., Plaschke J., König S.U., Börner A., Sorrells M.E., Tanksley S.D. et Ganai M.W. (1995) Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular and General Genetics* 252 :537-544
- Sourdille P., Guyomarc'h H., Baron C., Gandon B. et Chiquet V. (2001) Improvement of the genetic maps of wheat using new microsatellite markers. *Plant and animal genome IX*, San Diego, pp. 167.
- Lorieux M. (2006) MapDisto, A Tool for Easy Mapping of Genetic Markers. Poster (P886) presented at the Plant and Animal Genome XIV conference, Jan 14-18 2006, San Diego, CA. URL: <http://mapdisto.free.fr/>.
- Veyrieras J-B., Goffinet B., Charcosset A. (2007) MetaQTL: a package of new computational methods for the metaanalysis of QTL mapping experiments. *BMC Bioinformatics* 8:49
- Wang S., Basten C.J. et Zeng Z. (2007) Windows QTL cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Wenzl P., Suchankova P., Carling J., Simkova H., Huttner E., Kubalakova M., Sourdille P., Paul E., Feuillet C., Kilian A., Dolezel J. (2010) Isolated chromosomes as a new and efficient source of DArT markers for the saturation of genetic maps. *Theoretical and Applied Genetics* 121:465-474

Stabilité de QTL et de composantes de résistance adulte du blé tendre à la rouille jaune

Axel OLIVIER¹, Gwenn VERPLANCKE², Claude DE VALLAVIEILLE-POPE³, Marc LECONTE³, Bernard ROLLAND², Sophie PAILLARD², Jean-Bruno BEAUFUME⁴, Jayne STRAGLIATI⁴, Denis BEGHIN⁵, Philippe LONNET⁵, Sébastien CUVELIER⁶, Eric MARGALE⁶, Patrice SENELLART⁷, Sébastien CAIVEAU⁷, David GUIARD⁷, Françoise DEDRYVER²

* Coordinateur : Pierre RIGOLLE, prigolle@invivo-group.com

1 - GIE Club 5 - 83 avenue de la Grande Armée, 75782 Paris Cedex 16

2 - INRA UMR 118 - APBV- BP 35327, 35653 Le Rheu

3 - INRA BIOGER-CPP - UR 1290, BP01, 78850 Thiverval-Grignon

4 - Limagrain Verneuil Holding - Ferme de l'Etang, 77390 Verneuil l'Etang

5 - Maison Florimond Desprez - BP 41, 59242 Cappelle en Pévèle

6 - Serasem - 60 rue Léon Beauchamp, BP 45, 59933 La Chapelle d'Armentières

7 - Syngenta Seed SAS - Ferme de Moyencourt, BP5, 78910 Orgerus

La rouille jaune du blé est l'une des maladies du blé les plus répandues et les plus dévastatrices, qui se manifeste surtout dans les régions au climat frais et humide. La sélection de variétés résistantes apporte à l'agriculture des solutions efficaces permettant de réduire l'emploi de produits phytosanitaires. Pour éviter le contournement des résistances, il paraît indispensable d'introduire dans les programmes d'amélioration variétale des géniteurs de résistance adulte, qui présentent des résistances partielles considérées comme plus durables que les résistances totales exprimées dès le stade jeune plante. Le présent projet a étudié la stabilité dans le temps et dans différents environnements, de QTL/composantes de résistance adulte du blé tendre à la rouille jaune issus des variétés Renan, Camp Rémy et Apache dont la résistance s'est montrée durable après plus de dix années de culture en France. Ces QTL ont été mis dans différents fonds génétiques, seuls ou en combinaison dans un même génotype, en lien éventuellement avec un gène de résistance spécifique.

Cette étude a montré l'intérêt d'effectuer des expérimentations au champ différentes pour chaque pathotype étudié dans le cadre de détection de QTL et de gènes majeurs de résistance. La contamination naturelle par un pathotype extérieur à l'expérimentation est un frein à la bonne interprétation des résultats et donc à la détection des QTL et des gènes majeurs spécifiques. Si les QTL paraissent stables dans le temps vis-à-vis d'un même pathotype, leur niveau d'efficacité enregistré varie en lien avec le fonds génétique mais surtout en fonction des critères des notateurs.

Seul le suivi par marquage moléculaire des QTL dans le matériel végétal en sélection, nous a permis de savoir s'ils étaient présents dans les lignées étudiées. Le marquage est même parfois la seule possibilité de mettre en évidence des gènes majeurs spécifiques, lorsqu'ils sont cumulés dans un même génotype et que l'on ne possède pas les pathotypes adéquats pour les mettre en évidence. Vingt huit lignées en cours de sélection possèdent des allèles marqueurs des QTL de Renan et/ou du QTL du 2D de CR et présentent des bons niveaux de résistance mais pas une résistance totale vis-à-vis des 4 pathotypes testés. Pour obtenir un bon niveau de résistance, il faut donc associer impérativement dans un même génotype plusieurs QTL présentant des résistances partielles avec éventuellement des gènes majeurs spécifiques. Ainsi, parmi les 18 lignées

étudiées qui présentaient une résistance totale, le niveau de résistance de 16 de ces lignées peut s'expliquer par la présence de gènes majeurs, soit de *YrRsp* et *Yr7* en cluster issu de Camp Rémy, soit de la combinaison de *Yr7* avec *Yr17* trouvée chez Apache.

Nous avons constaté que toutes les lignées qui possèdent des allèles de Renan, de Camp Rémy ou d'Apache, ont ces variétés ou l'un de leur géniteur dans leur généalogie, lorsque celle-ci est connue. Le marquage moléculaire doit donc permettre de suivre des gènes majeurs spécifiques et des QTL dans des lignées en cours de sélection à partir du moment où l'on connaît la généalogie du géniteur de résistance, afin d'utiliser les allèles marqueurs adéquats. Le marquage de gènes dans des régions chromosomiques portant plusieurs gènes/QTL reste cependant plus délicat, afin de ne pas perdre des gènes/QTL de résistance. Dans ce cas, l'idéal est de réaliser à la fois le marquage et les tests pathologiques au stade jeune plante, au stade adulte au champ pour établir un niveau de résistance et confirmer ou non la présence des gènes/QTL marqués.

En conclusion, on peut souligner que le marquage moléculaire est un outil intéressant pour faire l'état des lieux des gènes/QTL le plus souvent utilisés en sélection. Il est alors important d'éviter d'introduire trop fréquemment les mêmes combinaisons de gènes/QTL dans différentes lignées en cours de sélection pour éviter de faire pression sur l'agent pathogène et donc de favoriser le contournement de la résistance, si ces lignées sont largement cultivées. Le marquage a montré que 74 lignées en cours de sélection possédaient le gène *Yr17*. La combinaison *Yr7-Yr17* trouvée chez Apache protégeait bien les lignées vis-à-vis de la rouille jaune, mais elle est trop présente dans les lignées étudiées.

Le nombre de gènes *Yr* marqués étant limité, les tests pathologiques réalisés au stade jeune plante restent donc également un outil de choix pour repérer un grand nombre de gènes majeurs spécifiques, comme on a pu le faire dans ce travail. Ainsi, parmi les 154 lignées testées, nous avons postulé la présence de gènes non marqués de résistance totale exprimés dès le stade jeune plante : *Yr6* (12 % des lignées) et *Yr32* (8 % des lignées). Cependant, beaucoup de lignées (environ 30 %) sont résistantes à tous les pathotypes et on ne peut savoir s'il s'agit d'une combinaison de gènes de résistance spécifique déjà décrits ou de nouveaux gènes qui auraient été introduits par la sélection.

1. Introduction

La rouille jaune du blé (*Puccinia striiformis. f.sp. tritici*) est l'une des maladies du blé les plus répandues et les plus dévastatrices, qui se manifeste surtout dans les régions au climat frais et humide (de Vallavieille-Pope *et al*, 2000 ; Hau et de Vallavieille-Pope, 2006). Suite aux hivers doux tels que 2006-2007, 2007-2008, des épidémies précoces, difficiles à enrayer, se sont déclenchées sur les variétés sensibles (de Vallavieille-Pope *et al*, 2012).

Une atteinte massive des feuilles supérieures et des glumes pénalise particulièrement les récoltes, réduit le poids de mille grains et provoque des pertes de rendement de l'ordre de 40 à 80 %.

Une variété sensible demande l'application de deux fongicides et donc ne peut être utilisée dans une stratégie de protection intégrée des cultures dans un système économe en intrants.

La rouille jaune étant une maladie explosive, il est difficile de l'enrayer si les traitements chimiques ne sont pas appliqués dès le démarrage de l'épidémie.

La sélection de variétés résistantes apporte à l'agriculture des solutions efficaces permettant de réduire l'emploi de produits phytosanitaires. Cependant, ces solutions s'avèrent parfois de courte durée car certains gènes de résistance sont rapidement contournés par l'agent pathogène. Dès lors, la sélection de variétés présentant des résistances durables à la rouille jaune suscite l'intérêt de nombreux partenaires sélectionneurs de la filière blé tendre.

Les années de fortes épidémies de rouille jaune en France ont coïncidé avec des contournements de gènes spécifiques de résistance : 1975 (*Yr11*), 1981 (*Yr7*), 1987-1990 (*Yr6*), 1989-95 (*Yr9*), 1991-1995 (*Yr6* et *Yr9*), 1997-2004 (*Yr17*), 2007-2011 (*Yr32*) et 2010-2011 (*Yr6* et *Yr32*) (de Vallavieille-Pope *et al*, 2000 ; Bayles *et al*, 2000 ; Enjalbert *et al*, 2005). Il paraît donc indispensable d'introduire dans les programmes d'amélioration variétale des géniteurs de résistance adulte qui présentent des résistances partielles considérées comme plus durables que les résistances totales s'exprimant dès le stade jeune plante (Chen, 2005).

Le présent projet s'est proposé d'étudier la stabilité dans le temps et dans différents environnements, de QTL/composantes de résistance adulte du blé tendre à la rouille jaune, mis dans différents fonds génétiques, seuls ou en combinaison dans un même génotype, en lien éventuellement avec un gène de résistance spécifique.

Les variétés Renan, Camp Rémy et Apache ont été cultivées pendant plus de dix années, et malgré des épidémies importantes, leur résistance à la rouille jaune n'a jamais été contournée. Les résistances de ces cultivars, qui se mettent en place à différents stades du développement de la plante, ont été cartographiés par l'équipe blé INRA du GAP de Rennes dans les croisements Renan x Récital (Dedryver *et al*, 2009), Camp Rémy x Récital (Mallard *et al*, 2005) et Apache x Taldor (Paillard *et al*, publication en cours). Ces études génétiques de la résistance ont permis de sélectionner du matériel végétal caractérisé pour ces QTL, seuls ou en combinaison. Ce type de matériel végétal a constitué une base de choix pour étudier dans un grand nombre de lieux (INRA Le Rheu et Grignon et pépinières du GIE 'Club 5'), de conditions expérimentales et de fonds génétiques, la stabilité de QTL de résistance adulte à la rouille jaune.

Par ailleurs, en utilisant des marqueurs moléculaires des QTL

issus de Renan, de Camp Rémy et d'Apache, nous avons détecté la présence de ces QTL dans des variétés et/ou des lignées en cours de sélection du GIE 'Club 5' et de l'INRA testées lors des trois années de contrat pour leur résistance adulte à la rouille jaune dans les expérimentations INRA et GIE 'Club 5'. Il a alors été possible d'associer la résistance adulte des lignées testées à la présence de ces mêmes QTL et de repérer quelles sont les combinaisons de ces QTL avec ou non des gènes majeurs les plus performantes pour obtenir une résistance à la fois efficace et durable.

2. Matériel et méthodes

► Matériel végétal

Des lignées issues de la sélection de chaque établissement partenaire ont été testées vis-à-vis de la rouille jaune chaque année : 88 en 2009 et 2010, 89 en 2011. Parmi elles, certaines étaient communes deux années consécutives (65 en 2009-2010 et 66 en 2010-2011) et seules 52 ont été présentes les trois années.

Vingt lignées témoins possédant un ou plusieurs gènes/QTL de Renan, de Camp Rémy (CR) ou d'Apache ont également été testées pour avoir en référence les effets de QTL ou gène de résistance sur le développement de la rouille jaune. Les lignées témoins présentant les gènes/QTL de Renan ou le gène *Yr6* provenant de Récital ont été étudiées les trois années et correspondent à des lignées recombinantes (ReR) issues du croisement Renan x Récital et aux deux parents Renan et Récital : ReR 15 (*Yr17*), ReR 22 (QTL *Yr2B* et *Yr6B*), ReR 32 (*Yr17* et QTL *Yr2B*), ReR 33 (sensible, sans composante de résistance), ReR 64 (QTL *Yr2B*), ReR 104 (*Yr6*), ReR 110 (QTL *Yr6B*) et ReR 138 (*Yr17* et QTL *Yr6B*). Les dix autres lignées témoins ont été testées deux années seulement (2010 et 2011). Cinq d'entre elles correspondent à CR et à quatre lignées recombinantes (CRR) issues du croisement CR x Récital : CRR 2019 (QTL *Yr2DS* étant probablement *Yr16*, gène de résistance adulte à la rouille jaune), CRR 2020 et CRR 2088 (tous les QTL de CR, excepté les deux gènes majeurs *Yr7* et *YrRsp* présents sur le 2BL) et CRR 2178R (gènes du 2BL). Les cinq dernières lignées correspondent à Apache et à des lignées haploïdes doublées (AT) issues du croisement Apache x Taldor : AT 2622 (*Yr7* et gène de résistance adulte *Rad 4B*), AT 2630 et AT 2655 (*Rad 4B*) et AT 2772 (*Yr17* et *Rad 4B*).

► Tests de résistance au stade jeune plante en conditions contrôlées

Nous avons testé au stade jeune plante 65 lignées vis-à-vis de 12 pathotypes de rouille jaune. Les tests ont été réalisés en conditions contrôlées avec 12 pathotypes de *P. striiformis f. tritici* : un du sud de la France : 6E16 (Vr2, -6, -7, -8), et onze du Nord de la France : 237E141V17 (Vr1, -2, -3, -4, -6, -9, -17, Sd, Su), 169E136V17 (Vr1, -2, -3, -9, -17, Sd), 40E8 (Vr3 Sd), 41E168 (Vr1,-2, -3, -32, Sd), 43E138 (Vr1, -2, -3, -7,Sd), 106E139 (Vr2, -3, -4, -7, Sd, Su), 109E141 (Vr1, -2, -3, -4, -6, Sd, -Su), 232E137 (Vr2, -3, -4, -9, Sd, Su), 233E169V17 (Vr1, -2, -3, -4, -9, -17, -32, Sd, Su), 237E141 (Vr1, -2, -3, -4, -6, -9, Sd, Su), et 239E141V17 (Vr1, -2, -3, -4, -6, -7, -9, -17, Sd, Su) (de Vallavieille-Pope *et al*, 2012).

Les jeunes plantes des lignées à tester sont cultivées en serre jusqu'au stade 2 feuilles puis inoculées par des spores des isolats testeurs. Elles sont placées 24 h à 100 % d'humidité

relative et 8°C pour favoriser la pénétration du parasite, puis mises en chambre climatisée : 16 h à 300 µE m⁻² s⁻¹ à 17°C suivies de 8 h à l'obscurité et à 14°C. Les types d'infection (0-9) sont notés 17 et 19 jours après l'inoculation. Une lignée est classée sensible si l'isolat est capable de se développer (forte sporulation, types d'infection 7-9), ou résistante (réaction de résistance partielle avec des types d'infection 5-6 ou résistance totale avec des types d'infection 0-4). On postule ensuite la présence des gènes de résistance en analysant les réactions de sensibilité et de résistance (de Vallavieille-Pope *et al*, 1990).

► Agent pathogène utilisé en expérimentation champ

Les deux premières années, trois pathotypes ont été choisis pour tester les lignées : 237E141 V17, 233E169 V17 et 106E139. Ces trois pathotypes ont été retenus en fonction, soit de leur grand nombre de facteurs de virulence pour les deux premiers d'entre eux, soit de leur capacité à contourner les gènes majeurs présents dans Renan et Apache (*Yr17*), dans Camp Rémy et Apache (*Yr7*), et dans Toisondor (*Yr32* : gène contourné en France en 2007). Leurs virulences respectives sont consignées dans le Tableau 1. En 2011, nous avons opté pour tester les lignées vis-à-vis du pathotype 237E173 V17 apparu en 2010 et majoritaire en France cette année là. Ce pathotype présente une virulence supplémentaire par rapport aux pathotypes 237E141 V17 et 233E169 V17, soit la virulence contournant respectivement les gènes *Yr32* et *Yr6*.

Pathotype	Gènes de résistance										
	Yr1	Yr2	Yr3	Yr4	Yr5	Yr6	Yr7	Yr8	Yr9	Yr17	Yr32
237E141 V17	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-
233E169 V17	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
106E139	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
237E173 V17	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+

+ : pathotype présentant la virulence vis-à-vis du gène de résistance *Yr*
 - : pathotype avirulent vis-à-vis du gène de résistance *Yr*

Tableau 1 : virulence des pathotypes de rouille jaune inoculés au champ

► Evaluation de la résistance au champ

Les lignées issues de la sélection et les lignées témoins sont semées en automne dans 8 expérimentations réparties dans 6 lieux géographiques : INRA Rennes (35) au Le Rheu (2 isolements) ; INRA Grignon (78) à Versailles (2 isolements) ; Florimond-Desprez à Cappelle (59) ; Limagrain à Verneuil (77) ; Serasem à Premesques (59) ; Syngenta à Orgerus (78). Dans six expérimentations sur les huit, les lignées sont réparties sur deux répétitions, alors qu'une seule répétition est réalisée dans les deux autres expérimentations. Des plantes contaminées par le pathotype retenu pour chacune des expérimentations sont repiquées dans les isolements respectifs de la fin de l'automne au début du printemps afin de contaminer les lignées à tester. Ainsi le pathotype 237E141V17 a servi à contaminer quatre expérimentations en 2009 et 2010 et trois en 2011. Le pathotype 233E169V17 a été utilisé dans trois expérimentations en 2009 et 2010 et dans deux en 2011. Chaque année, une seule expérimentation a été contaminée avec le pathotype 106E139 présentant le moins de virulence mais étant le seul à contourner le gène *Yr7* retrouvé chez Apache et CR. Le quatrième pathotype, 237E173V17 apparu en France 2010, a été introduit dans deux expérimentations en 2011.

Les notations rouille jaune ont été effectuées en suivant la méthodologie pratiquée habituellement par chacun des participants au projet, afin de déterminer si cette méthodologie pouvait affecter la détection de gènes ou QTL de résistance à la rouille jaune. Ainsi, une notation plante à plante a été réalisée dans les 4 expérimentations annuelles de l'INRA (Versailles et Le Rheu), alors qu'une notation globale par lignée a été faite dans chacune des expérimentations des sélectionneurs privés. Suivant la date initiale d'apport des plantes contaminées dans les parcelles et le climat lié à chaque lieu d'expérimentation, un nombre variable de notations a été réalisé sur chaque expérimentation : de 2 à 4 en 2009, de 1 à 5 en 2010 et de 2 à 5 en 2011. Deux échelles de notations ont été utilisées, l'une à l'INRA de Rennes (Tableau 2), l'autre chez les partenaires privés (Tableau 3), alors que l'INRA de Grignon a noté directement en pourcentage de surface sporulante.

Surface sporulante (%)	0	0,3 1 strie	0,7 2 stries	2	8	12	16	24	33	50	66	82	100
Echelle	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Tableau 2 : Echelle de notation de sévérité de rouille jaune, utilisée par l'INRA de Rennes

Surface sporulante (%)	0	15	25	35	50	65	75	85	100
échelle	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Tableau 3 : Echelle de notation de sévérité de rouille jaune utilisée par les membres du GIE 'Club 5'

Les notations ont toutes été rapportées en pourcentage de surface sporulante, comme à l'INRA de Grignon afin d'homogénéiser les résultats obtenus dans chaque expérimentation. Afin d'intégrer l'ensemble des notations annuelles de chaque expérimentation, nous avons calculé l'aire sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC) par expérimentation. La valeur de cette AUDPC dépend du nombre de notations effectuées par expérimentation mais également de la durée en jours entre chacune des notations : $AUDPC = (N_1 + N_2)(t_2 - t_1)/2 + (N_2 + N_3)(t_3 - t_2)/2$, avec N_i = note lors de la notation t_i .

► Génotypage des lignées

Vingt deux marqueurs microsattellites (25 allèles) et 3 STS ont été retenus pour la détection de gènes et QTL de Renan, Apache et Camp Rémy en fonction des résultats déjà décrits (Mallard *et al*, 2005 ; Dedryver *et al*, 2009 ; Paillard *et al*, publication en cours). Les marqueurs suivants ont été choisis pour détecter les QTL et gène de Renan :

- 1 - gwm 210, gpw 4108, gwm 636 et SCAR-Y15 (Robert *et al*, 1999) pour le gène *Yr17* du 2AS ;
- 2 - gwm210, barc 35, L14 (STS) et Fbb 67 BC (STS) pour le QTL du 2BS ;
- 3 - gwm389 et gwm583 pour le QTL du 3BS ;
- 4 - gwm 131, gwm 383 et wmc 291 pour le QTL du 3B centromérique ;
- 5 - gwm 193, gwm 608 et gwm 626 pour le QTL du 6B.

La détection des QTL et gène de CR a été faite à l'aide des marqueurs suivant :

- 1 - wmc 154 pour le QTL du 2BS ;
- 2 - cfd73, barc 101, gwm 120 et cfd50 pour le cluster des gènes *Yr7* et *YrRsp* du 2BL ;
- 3 - cfd50 et gwm 148 pour le QTL du 2BL ;

- 4 - gwm 102, gwm 484 et gpw 8041 pour le QTL du 2D étant probablement le gène de résistance adulte *Yr16* ;
- 5 - gwm 408 pour le QTL 5BL1 ;
- 6 - gwm 234 pour le QTL 5BL2. Les deux gènes d'Apache sont détectés à l'aide des marqueurs de Renan pour le gène *Yr17* et des marqueurs de Camp Rémy pour *Yr7* (2BL).

Les ADN des 110 lignées issues de la sélection testées au cours des deux premières années d'expérimentation ainsi que des 20 témoins et de la variété Talent (*Yr7*) ont été extraits. Les lignées ont ensuite été génotypées à l'aide des microsatellites, les produits PCR étant passés sur un séquenceur 16 capillaires ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems). Les trois STS ont également été utilisés sur les mêmes lignées et la lecture du génotypage se fait après électrophorèse des produits de PCR sur gel d'agarose à 2 %. Un marqueur spécifique (*Xucw125*) du seul gène de résistance à la rouille jaune du blé cloné (*Yr36*) a été confronté aux mêmes lignées (Fu *et al*, 2009). Le marquage de *Yr36* est spécialement intéressant, car ce gène se trouve dans la même région chromosomique que le QTL du 6B de Renan (Uauy *et al*, 2005).

► Analyse statistique

Les données phénotypiques concernant les AUDPC de toutes les lignées testées, témoins compris, ont été traitées par des analyses en composantes principales (ACP). Les variables retenues concernent toutes les données de phénotypage obtenues pour une expérimentation une année donnée donc correspondant à une contamination par un pathotype donné dans un lieu. Les variables ont été centrées réduites. Les ACP nous ont permis de comparer les résultats obtenus sur différents lieux, avec ou non différents pathotypes et ceci sur différentes années.

L'analyse des correspondances multiples (ACM) réalisée sur les données de génotypage des 110 lignées mises dans les expérimentations 2009 et 2010 ainsi que sur les 20 lignées témoins nous permet d'étudier les ressemblances entre individus du point de vue de l'ensemble des variables (gène(s) et/ou QTL d'une variété) et de dégager des profils d'individus. Nous avons donc regardé les similitudes entre lignées vis-à-vis des marqueurs des gènes ou/et QTL dans un premier temps de Renan, un second temps de Camp Rémy et un troisième temps d'Apache. Les variables sont dans ce cas d'ordre qualitatif, de type tout ou rien et soit la lignée présente un ou des allèle(s) marqueur(s) des gène(s) ou QTL de Renan, ou de Camp Rémy ou d'Apache, soit ce ou ces allèle(s) marqueur(s) est (sont) absent(s) chez cette lignée. Les axes de l'ACM ont été choisis afin d'avoir une représentation la plus complète possible de l'ensemble des marqueurs et de discriminer au mieux le nuage de points représentant les lignées.

3. Résultats

► Détection des gènes majeurs de résistance au stade jeune plante

Parmi les 154 lignées testées (témoins compris), nous avons postulé la présence des gènes de résistance *Yr6*, *Yr7*, *Yr17* et *Yr32* déjà présents dans les parents (Tableau 4). *Yr17* est postulé dans plus de 26 % des lignées. Cette fréquence est en accord avec la présence de *Yr17* dans deux des géniteurs, Renan et Apache, ainsi que dans de nombreuses variétés actuelles. *Yr7* présent chez Camp Rémy et Apache est postulé

dans 10 % des lignées. *Yr6*, présent dans la variété Récital, est postulé dans 12 % des lignées. *Yr32* est postulé dans 8 % des lignées testées, ce gène trouvé chez la variété Toison d'or est maintenant contourné en France depuis 2002. La virulence 32 est devenue très fréquente en 2007. La combinaison *Yr6* + *Yr32* dont le contournement correspond au développement de la race dite 'Oakley/Solstice' est suspectée dans 2 lignées. Nous avons trouvé également *Yr2*, *Yr3* et quelques lignées sensibles à tous les pathotypes, ces deux gènes sont contournés par tous les pathotypes même anciens. Beaucoup de lignées (environ 30 %) sont résistantes à tous les pathotypes, on ne peut savoir s'il s'agit d'une combinaison de gènes de résistance spécifique déjà décrits ou de nouveaux gènes qui auraient été introduits par la sélection.

Cinq lignées étaient sensibles au champ pour au moins un des pathotype alors qu'elles étaient totalement résistantes en conditions contrôlées au stade jeune plante à ce même pathotype. Cela soulève la question de la thermosensibilité de l'expression de la résistance.

Gènes de résistance	Nombre de lignées	Pourcentage
Résistant	46	29,9
<i>Yr7</i>	15	9,7
<i>Yr6</i>	11	7,1
<i>Yr6</i> ou <i>6+17</i>	4	
<i>Yr6</i> + <i>17</i>	8	5,2
Résistant ou <i>Yr6</i> + <i>32</i>	2	
<i>Yr17</i>	32	20,8
Résistant ou <i>Yr17</i>	3	
<i>Yr32</i>	12	7,8
Résistant ou <i>Yr32</i> +	1	
Sensible ou <i>Yr2</i>	14	9,1
Indéterminé	6	3,9

Tableau 4 : Fréquence au stade jeune plante des gènes de résistance à la rouille jaune dans 154 lignées. Gènes postulés après inoculation en conditions contrôlées des lignées par 12 isolats de *Puccinia striiformis*. f.sp. *tritici*

► Détection de composantes de résistance adulte au champ

Analyse phénotypique de la résistance

Les 131 lignées issues de la sélection et testées au cours des trois années d'expérimentation ont pu être classées en trois catégories (Tableau 5) : résistance totale (dans tous les lieux de test une même année), résistance partielle (avec sporulation de la rouille jaune) et sensibilité (> 50 % de recouvrement des feuilles par la rouille jaune dans au moins une implantation).

Année	Catégories de plantes			
	Pathotype	Sensibilité	Résistance partielle	Résistance totale
2009	237E141V17	12	54	22
	233E169V17	14	67	7
	106E139	1	8	79
2010	237E141V17	16	45	27
	233E169V17	6	61	21
	106E139	1	5	82
2011	237E141V17	8	41	40
	237E173V17	12	60	17
	233E169V17	4	23	62
	106E139	0	5	84

Tableau 5 : répartition des lignées issues de la sélection en trois catégories de plantes

En 2009 et 2010, la majeure partie des lignées présente une résistance partielle vis-à-vis des pathotypes 237E141V17 et 233E169V17 ayant un nombre important de facteurs de virulence. Les gènes majeurs, s'il y en avait, ont été contournés dans ces lignées. La comparaison des résultats obtenus sur les lignées communes cultivées lors des deux années d'expérimentation montre que :

- 1 - les lignées totalement résistantes vis-à-vis des pathotypes 237E141V17 l'étaient déjà en 2009 ;
- 2 - douze lignées totalement résistantes au pathotype 233E169V17 en 2010 présentaient une résistance partielle en 2009. Après analyse plus précise des données, on constate que pour deux des expérimentations réalisées en 2009 après contamination avec le pathotype 233E169V17, la variété Récital et la lignée témoin ReR 104, possédant le gène *Yr6*, présentent une note de sensibilité élevée à la rouille jaune ce qui n'est pas logique car ce pathotype ne peut pas contourner *Yr6*. Il y a donc probablement eu contamination naturelle de ces deux expérimentations par un pathotype présent dans la région, qui pourrait être le pathotype 237E141V17 ou éventuellement un autre. L'analyse en composante principale (ACP) sur les données 2009 (données non vues) montre effectivement un regroupement des données de phénotypage en deux groupes de corrélation correspondant aux expérimentations dans lesquelles il y avait ou non la présence de la virulence 6 repérée sur Récital. La contamination par une race extérieure permettrait aussi d'expliquer en partie que douze lignées totalement résistantes au pathotype 233E169V17 en 2010 présentaient une résistance partielle en 2009.

En 2011, la proportion de lignées présentant des résistances partielles à ces deux pathotypes chute largement au profit de la catégorie de plantes totalement résistantes. Cette année là, quarante lignées sont totalement résistantes au pathotype 237E141V17 et parmi elles 13 étaient testées pour la première fois. Parmi les autres lignées totalement résistantes, 14 présentaient déjà ce niveau de résistance dans les expérimentations précédentes et 13 montraient une résistance partielle auparavant. D'autre part 62 lignées sur les 89 testées en 2011 sont totalement résistantes au pathotype 233E169V17 et 23 lignées présentent une résistance partielle à ce pathotype. Parmi les 62 lignées totalement résistantes, 17 étaient testées pour la première fois et seules 18 avaient ce niveau de résistance dans les expérimentations antérieures. Il semble donc que pour les

deux pathotypes 237E141V17 et 233E169V17 l'année 2011 ait été moins propice à la mise en évidence de résistance partielle quel que soit le lieu d'expérimentation.

A l'inverse, le pathotype 106E139 ne contourne que peu de lignées en 2009, 2010 et 2011, soit respectivement : 9, 6 et 5 lignées. Parmi les 84 lignées ayant une résistance totale vis-à-vis de ce pathotype en 2011, 20 étaient testées pour la première fois cette année et seules 6 présentaient des traces de sporulation de rouille jaune durant les expérimentations 2010. Les lignées totalement résistantes vis-à-vis du pathotype 106E139 en 2010 l'étaient déjà en 2009 à l'exception d'une seule lignée montrant des traces de rouille jaune.

En 2011, la majeure partie des lignées (60/89) présente une résistance partielle vis-à-vis du pathotype 237E173V17 ayant le nombre le plus important de facteurs de virulence. Les gènes majeurs *Yr6* et *Yr32*, s'ils étaient présents, auraient été contournés dans ces lignées lorsque l'on compare avec les résultats obtenus respectivement vis-à-vis des pathotypes 233E169V17 et 237E141V17. Il faut cependant tempérer cette interprétation car nous avons noté une différence de notation importante entre les deux lieux d'expérimentation concernant uniquement le pathotype 237E173V17. Sur le premier lieu, 18 lignées étaient notées totalement résistantes alors que dans le deuxième lieu 48 étaient dans ce cas. Trois explications peuvent être apportées, soit la rouille jaune s'est mieux développée sur un des 2 lieux, soit il y a une éventuelle différence d'appréciation de la maladie entre notateurs, soit il y a eu contamination par le pathotype 239E175V17 apparu cette année en France et présentant une virulence supplémentaire permettant de contourner *Yr7*. La dernière hypothèse semble cependant peu probable, car sur les dix lignées, pour lesquelles on a mis en évidence par les tests résistance au stade jeune qu'elles possédaient *Yr7*, toutes présentaient une résistance totale au champ quel que soit le lieu d'expérimentation. On ne peut cependant conclure définitivement, car ces sept lignées peuvent posséder également des facteurs de résistance non contournés au stade adulte par le nouveau pathotype susceptible d'avoir contaminé une des expérimentations.

Influence du pathotype sur l'expression de la résistance

Une ACP a été réalisée en prenant en compte toutes les données de phénotypage (AUDPC) obtenues par expérimentation et par année (1 pathotype / 1 lieu) toutes lignées confondues, à l'exception cependant des deux expérimentations 2009 où il y a eu contamination par un pathotype extérieur.

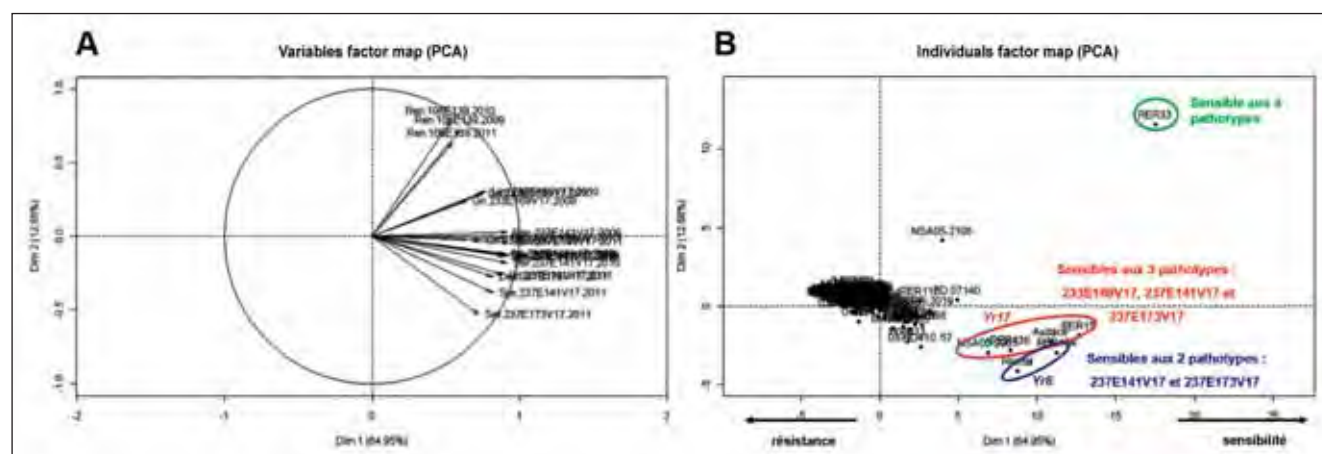


Figure 1 : analyse en composantes principales des données AUDPC enregistrées de 2009 à 2011 pour toutes les expérimentations

L'analyse du graphe des variables (Figure 1A) montre une corrélation positive entre la première composante principale (résistance/sensibilité) exprimant à elle seule près de 65 % de l'inertie totale. Le deuxième facteur, correspondant aux nombres de virulence des pathotypes donc à leur potentialité à contourner un plus ou moins grand nombre de gènes de résistance, explique près de 13 % de l'inertie. Les variables Grignon-233E169V17-2009, Grignon-233E169V17-2011 et Rennes-106E139-2011 sont les moins bien représentées par ces deux composantes. L'ACP montre qu'il existe bien des effets pathotypes significatifs entre les pathotypes 237E141V17, 233E169V17 et 106E139. Les AUDPC enregistrées sur les lignées avec les pathotypes 106E139 et 237E141V17 sont peu ou pas corrélées par exemple car leurs vecteurs sont perpendiculaires. Ceci est sans doute justifié par le fait que plusieurs facteurs de virulence différencient ces pathotypes entre eux. A l'inverse il existe de fortes corrélations entre données AUDPC attribuées à un même pathotype et plus particulièrement pour les deux pathotypes 106E139 et 233E169V17. L'ACP ne met pas en évidence un effet pathotype significatif entre les pathotypes 237E141V17 et 237E173V17. Ainsi les variables Desprez-237E173V17-2011 et Grignon-237E141V17-2011 sont très corrélées. La virulence de ces 2 pathotypes ne différant que d'un seul facteur de virulence (vis-à-vis de *Yr32*), on pourrait supposer que le gène *Yr32* est peu présent dans le matériel végétal testé. Si on se réfère aux résultats des tests de résistance effectués au stade jeune plante, dix lignées possèdent tout de même ce gène parmi les 110 lignées mises dans les expérimentations au champ en 2011. Par ailleurs, nous constatons que les variables Desprez-237E173V17-2011 et Serasem-237E173V17-2011 ne sont pas très corrélées entre elles et ceci correspond au fait qu'il y a un fort effet notateur déjà décrit dans le paragraphe précédent (analyse phénotypique de la résistance) concernant les deux expérimentations réalisées avec le pathotype 237E173V17. Pour établir une analyse fiable des résultats concernant le phénotype des lignées vis-à-vis du pathotype 237E173V17, il serait nécessaire de recommencer plusieurs expérimentations une année supplémentaire.

De l'analyse du graphe des individus (Figure 1B) de l'ACP il ressort que :

- 1 - la lignée témoin ReR 33 est la lignée la plus sensible vis-à-vis des 4 pathotypes utilisés ;
- 2 - les lignées témoins ReR 15 et ReR 138 ainsi que la variété Audace et la lignée NSA 05-2065 dont la résistance

repose essentiellement sur *Yr17* sont les plus sensibles aux trois pathotypes présentant la virulence 17 (237E141V17, 237E173V17 et 233E169V17) ;

- 3 - la lignée témoin ReR 104 et la variété Récital, dont la résistance dépend essentiellement de *Yr6* sont les plus sensibles aux deux pathotypes possédant la virulence 6 (237E141V17 et 237E173V17).

Influence de l'environnement sur l'expression de la résistance

Pour étudier l'influence de l'environnement, nous avons donc fait une ACP par pathotype et concernant uniquement les données AUDPC calculées sur les 64 lignées communes aux trois années d'expérimentation, dont 10 lignées témoins (ReR). Nous entendons par effet de l'environnement : l'effet notateur, l'échelle de notation utilisée, les conditions pédo-climatiques de l'expérimentation.

En ce qui concerne le pathotype 237E141V17 le plus fourni en données (10 variables), et après analyse du graphe des variables, nous constatons que la première composante principale (résistance/sensibilité) exprime à elle seule 91 % de l'inertie totale (Figure 2A) et la deuxième composante principale (différence entre notateurs : forte ou faible) 4,5 %. Les données AUDPC obtenues sur les lignées étudiées chez les sélectionneurs privés (Syngenta 2009, 2010 et 2011 ; Serasem 2010) sont bien corrélées entre elles ainsi qu'avec les données AUDPC obtenues à Grignon en 2009. Les données de Rennes 2009, 2010 et 2011 d'une part et de Grignon 2010 et 2011 d'autre part sont respectivement très corrélées entre elles. L'analyse du graphe des individus (Figure 2B), montre que pour les lignées les plus sensibles avec ce pathotype (ReR 15, ReR 33, ReR 104, Audace et Récital) les différences entre notateurs sont assez faibles, ces lignées présentant les notes maximales enregistrées sur chacun des lieux. Par contre les différences les plus importantes entre notateurs sont enregistrées sur des lignées qui présentent une résistance partielle comme les lignées ReR 138 et 03-HD 410.5 par exemple, comme cela est consigné dans le Tableau 6. L'AUDPC correspondant à ce pathotype serait plus influencée par le protocole de notation (échelles de notation différentes entre les stations expérimentales, notation individuelle par plante ou globale par groupe de plantes, nombre de notations effectuées au cours de l'épidémie) que par les climats différents enregistrés chaque année.

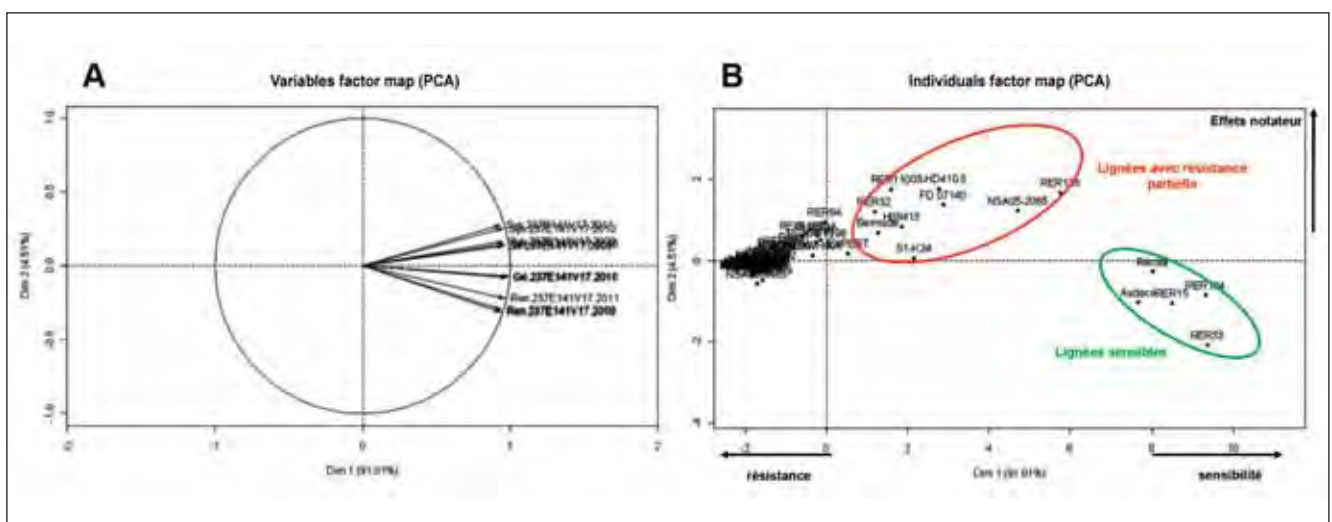


Figure 2 : analyse en composantes principales des données AUDPC enregistrées sur les 64 lignées communes de 2009 à 2011 avec le pathotype 237E141V17

Pour le pathotype 233E169V17 à l'inverse, le graphe des variables de l'ACP (Figure 3A) montre que les données AUDPC obtenues à Grignon en 2009, 2010 et 2011 ne sont pas très fortement corrélées entre elles. Pour ce pathotype, ce sont les données obtenues en 2010 chez Limagrain et à Grignon qui sont les plus corrélées. Le facteur année paraît prédominant dans ce cas.

Le graphe de l'ACP concernant les données AUDPC obtenues à Rennes avec le pathotype 106E139 en 2009, 2010 et 2011 (Figure 3B) montre qu'elles sont relativement bien corrélées entre elles. Les lignées présentent en grande majorité une résistance totale à ce pathotype. Cette résistance étant stable dans le temps, comme nous l'avons déjà signalé auparavant, ce résultat paraît logique.

► Mise en évidence de QTL/gènes de résistance par marquage moléculaire

Parmi les 22 marqueurs retenus, il s'est avéré que trois d'entre eux donnaient des résultats difficilement lisibles ou peu répétables après passage sur le séquenceur 16 capillaires. Nous n'avons donc pas tenu compte de ces trois marqueurs dans l'analyse des résultats de marquage : gwm 148 (QTL 2BL1, CR), gpw 8041 (QTL 2D, CR) et gwm 408 (QTL 5BL1, CR). Les marqueurs du QTL du 3BS de Renan (QTL à faible R²), étaient très peu représentés dans les lignées en sélection et n'ont donc pas fait partie du bilan. Camp Rémy (CR) étant un des géniteurs d'Apache, on constate qu'Apache présente les mêmes allèles (marqueurs wmc 154 et cfd50b) que CR dans les régions chromosomiques des QTL 2BS et 2BL1 de CR alors que ces deux QTL n'ont jamais été détectés chez Apache. En conclusion, on peut donc dire que les marqueurs wmc 154 et cfd50b ne sont pas suffisamment

liés aux QTL2BS et 2BL1 de CR pour pouvoir être utilisés pour rechercher ces QTL en sélection.

L'analyse des Correspondances Multiples (ACM) réalisée sur les données de génotypage des 110 lignées issues de la sélection, des 20 lignées témoins et de la variété Talent (Yr7) mises dans les expérimentations 2009 et 2010, dont 89 d'entre elles étaient également dans l'expérimentation 2011, met surtout en évidence un effet des gènes majeurs de résistance : Yr17 (2AS) provenant de VPM et retrouvé dans Renan et Apache, Yr2BL de Camp Rémy et Yr2BL d'Apache (région du gène Yr7). Camp Rémy à la différence d'Apache possède en plus sur le 2BL un gène majeur YrRsp non contourné différent de Yr7 (Mallard *et al*, 2005). Le marqueur spécifique (Xucw125) du gène Yr36 a été confronté aux 131 lignées, mais ce gène n'a jamais été retrouvé.

Cinquante cinq lignées sur les 131 sont marquées par tous les marqueurs de Yr17 et 19 lignées par au moins trois de ces marqueurs (Figure 4). Le gène Yr17 étant d'origine interspécifique (*Aegilops ventricosa*), tous ces marqueurs sont très liés au gène. Si la PCR n'a pas fonctionné pour tous ces marqueurs sur toutes les lignées, on peut cependant dire que Yr17 est présent dans ces 74 lignées.

Quatorze lignées sont proches d'Apache car elles présentent toutes les allèles marqueurs des gènes Yr17 (2AS) et Yr7 (2BL2). Neuf d'entre elles possèdent également des allèles de Camp Rémy (Figure 5). Parmi ces 14 lignées, dix sont connues comme ayant Apache comme géniteur.

Après étude des marqueurs de CR, on constate que la lignée 01015-137 est très proche de CR avec seulement un allèle de différence. Six autres lignées sont également proches de CR et possèdent les 4 allèles marqueurs du 2BL2 (Yr7+YrRsp) : FD-06012, FD-08121, 03-HD132-19, CF99102, CF04119 et CF05162.

Année	Lieu	Lignées						
		Apache	CR	Renan	Récital	ReR 33	ReR138	03-HD410.5
2009	Rennes	0	0	66	1452	2013	355	139
	Grignon	0	0	33	990	1200	720	675
	Syngenta	0	0	183	1483	1508	1432	701
2010	Rennes	0	0	108	1395	1765	780	139
	Grignon	0	0	3	770	910	647	357
	Syngenta	0	0	532	1836	1988	1725	1281
	Serasem	0	0	740	3050	3190	2742	1722
2011	Rennes	0	0	9.4	1386	2596	1376	515
	Grignon	0	0	1	937	825	450	431
	Syngenta	0	0	345	1638	1092	1725	1294

Tableau 6 : Données d'AUDPC enregistrées sur 6 lignées témoins et une lignée issue de la sélection avec le pathotype 237E141V17 au cours des trois années d'expérimentation

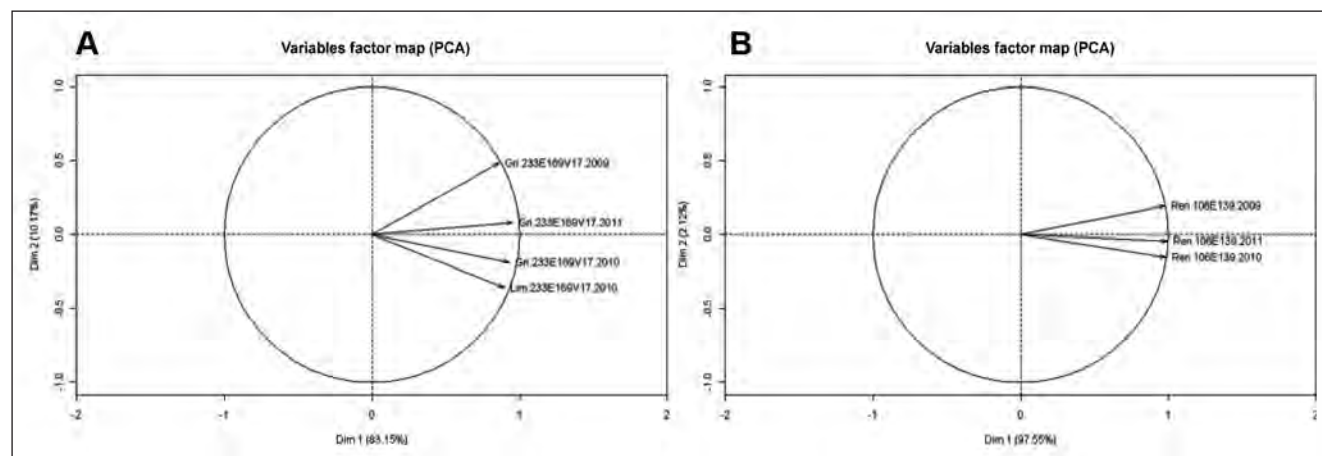


Figure 3 : analyse en composantes principales des données AUDPC enregistrées sur les 64 lignées communes de 2009 à 2011 avec les pathotypes 233E169V17 (A) et 106E139 (B)

L'analyse ACM des marqueurs de Renan montre également que l'on retrouve aisément dans les lignées génotypées celles qui possèdent des QTL à partir du moment où l'on dispose de 3 à 4 marqueurs de chaque QTL, ce qui était le cas des QTL du 2BS, 3Bcentro et du 6B de Renan (Figure 6). Dix sept lignées sont proches de Renan, quand on analyse les allèles marqueurs des QTL 2BS, 3B centro et 6B et parmi elles seules dix ont le gène *Yr17* présent chez Renan. Dix d'entre elles, dont la généalogie est connue, ont comme ancêtre Renan ou l'un de deux de ses parents : VPM ou Mironovskaia.

► **Recherche de combinaisons de gènes et /ou QTL de résistance efficaces et durables**

Nous avons sélectionné les lignées qui présentaient une résistance totale aux 4 pathotypes testés dans toutes les expérimentations des 3 années (Tableau 7) et qui sont au nombre de 18.

La résistance totale de 16 de ces lignées pourrait s'expliquer par la présence :

- 1 - des gènes majeurs *YrRsp* et *Yr7* en cluster (*Yr2BL2*) sur le 2BL ;
- 2 - le couplage de *Yr7* avec *Yr17*.

Le marquage confirme la détection du gène *Yr7* au stade jeune plante (JP) pour 10 lignées et c'est uniquement parce que la PCR n'a pas fonctionné pour deux marqueurs de ce gène que l'on ne peut conclure au niveau marquage pour les lignées Arlequin et SE-2153. L'origine de la résistance totale des lignées FD-07072 et H09499 ne peut être expliquée, car *Yr17* ne peut être responsable à lui seul de cette résistance, puisque 3 pathotypes sur les 4 utilisés présentaient la virulence 17. Le test au stade jeune plante de ces deux lignées montre également que plusieurs gènes majeurs, non déterminés à l'aide des 12 pathotypes utilisés dans ce test, sont impliqués dans leur résistance. Neuf lignées présentent comme Apache les gènes *Yr2BL* et *Yr17*, ce qui n'est pas surprenant, car lorsque l'on connaît la généalogie des lignées, on constate qu'Apache ou Camp Rémy l'un de ses parents, sont souvent l'un de leur géniteur. Cinq des lignées présentent également des QTL de Renan ou Camp Rémy.

Dans un deuxième temps, nous avons sélectionné toutes les lignées (Tableau 8), qui montraient des allèles marqueurs des QTL de Renan et/ou du QTL du 2D de CR mais qui ne présentaient pas des niveaux de résistance totale à l'ensemble des 4 pathotypes, comme cela a été vu dans le Tableau 7. Ces lignées sont au nombre de 26.

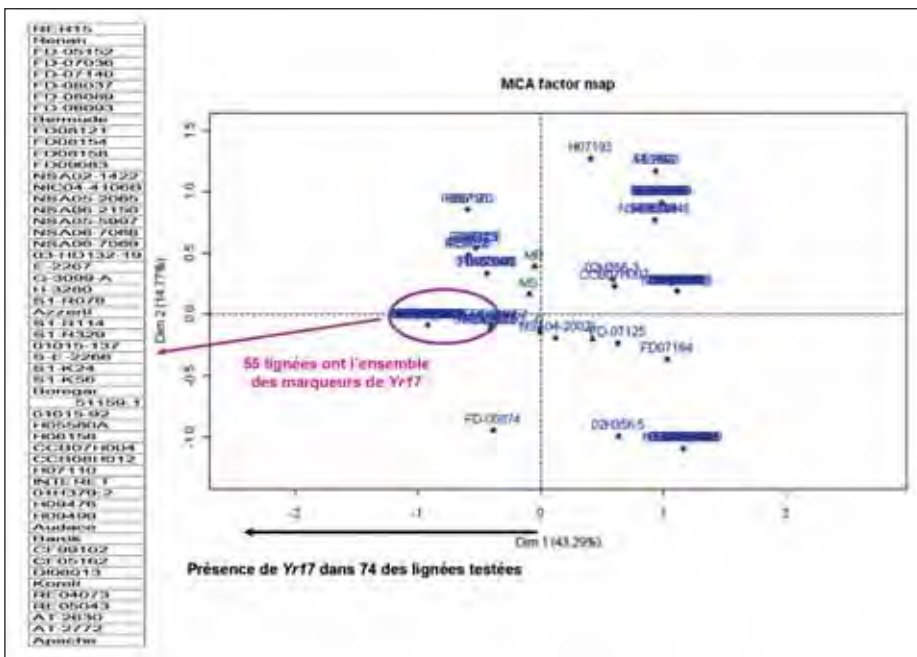


Figure 4 : Analyse des correspondances multiples (ACM) sur les données de génotypage correspondant aux allèles marqueurs du gène *Yr17*

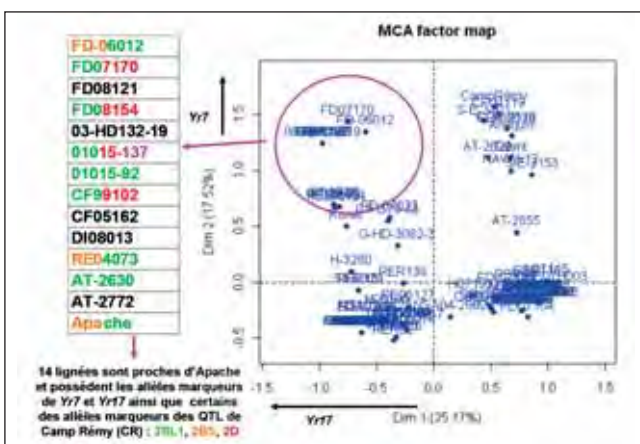


Figure 5 : Analyse des correspondances multiples (ACM) sur les données de génotypage correspondant aux allèles marqueurs des gènes *Yr7* et *Yr17*

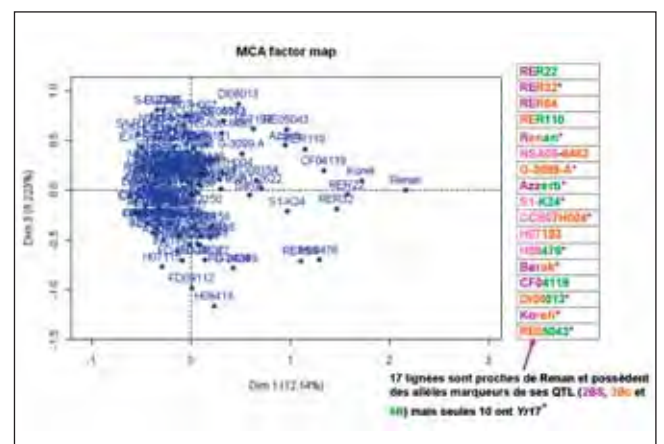


Figure 6 : Analyse des correspondances multiples (ACM) sur les données de génotypage correspondant aux allèles marqueurs des QTL de Renan du 2BS, 3B centro et 6B

Toutes ces lignées présentent des niveaux de résistance intéressant à l'exception peut-être de 4 lignées, qui sont moyennement sensibles à au moins deux pathotypes. Les deux lignées témoins ReR32 et ReR 110 et les lignées S1-K24 et H07193 sont dans ce cas. Il faut noter que la lignée H07193 a été signalée en disjonction sur certains lieux, ce qui peut entraîner sa notation comme moyennement sensible avec deux pathotypes. Sachant qu'aucun des QTL étudiés ne peut apporter une résistance totale à lui seul, les résultats consignés dans le Tableau 8, montrent qu'effectivement les QTL de Renan et celui du 2D de CR pourraient apporter un niveau de résistance intéressant à exploiter en association avec des gènes majeurs, ce qui peut déjà être le cas lorsque la lignée a déjà été signalée

résistante aux 12 pathotypes testés au stade jeune plante (exemple : lignée NSA06-2122). On note également l'effet du fonds génétique sur l'expression par exemple des QTL 2B et 6B de Renan, quand ils sont associés dans un même génotype, ce qui est le cas dans les lignées ReR22, S1-K24 et H09476. Un effet du fonds génétique est également noté sur l'expression de l'association des QTL 2B et 3B centro de Renan (Tableau 8) retrouvés dans les lignées ReR32, NSA06-8483, CCB07H004, H07193 (disjonction), Barok et Koréli. La présence du QTL 2D de CR, correspondant probablement au gène de résistance adulte *Yr16* (Mallard *et al*, 2005), est indiquée par seulement deux allèles marqueurs de ce gène et semble lié à un bon niveau de résistance indépendamment du fonds génétique.

généiteurs connus	lignées	Grignon test JP hypothèses gènes Yr	marqueurs de CR	marqueurs Yr17	hypothèses Yr marquage	marqueurs de CR	marqueurs de Renan
			nb maxi = 4 marqueurs Yr2BL2	nb maxi = 5 marqueurs Yr17		nb maxi = 2 QTL 2D CR	nb maxi = 12 QTL Renan (sauf Yr17)
Ap	FD-06012	Résistant	4	4	Yr2BL2+Yr17	0	1
Ap	FD-07072	Résistant	1	3	Yr17	0	2 (2B)
Ap	FD07170	Yr 7+	3	3	Yr2BL2+Yr17	1	2
Ap	FD08121	Yr 7+	4	4	Yr2BL2+Yr17	0	2 (6B)
-	Arlequin	Yr 7+	2+7	0	?	0	2 (3B cent)
Ap	01015-137	Yr 7+	4	5	Yr2BL2+Yr17	2 (2D)	2
-	S-E-3401	Résistant	3	0	Yr2BL2	0	0
-	S-E-2153	Yr 7+	1+7	0	?	0	3 (2B)
Ap	01015-92	Yr 7+	3	5	Yr2BL2+Yr17	0	0
-	H09499	Résistant	0	5	Yr17	1	1
VPM	CF99102	Résistant	4	5	Yr2BL2+Yr17	1	2
VPM	CF04119=Flamenko	Résistant	4	0	Yr2BL2	1	6 (2B et 6B)
Renan	CF05162	Yr 7+	4	5	Yr2BL2+Yr17	0	5 (6B)
Renan	DI08013=Muzik	Yr 7+	3	5	Yr2BL2+Yr17	0	5 (3B cent et 6B)
CR	CRR-2178R 2BL2	Yr 7+	2	0	Yr2BL2	1	0
CR	Camp Rémy (CR)	Yr 7+	4	0	Yr2BL2	2 (2D)	0
Ap	AT-2622 : Yr7+Rad2AS	Yr 7	3	0	Yr2BL2	0	2
Ap	Apache	Yr 7+ Yr17	3	5	Yr2BL2+Yr17	0	2

AP=Apache CR=Camp Rémy JP=jeune plante

Tableau 7 : Lignées présentant une résistance totale aux quatre pathotypes : 237E141V17, 237E173V17, 233E169V17 et 106E139

lignées	classes de notations / pathotype				Grignon test JP hypothèses gènes Yr	hypothèses Yr marquage	nb de marqueurs CR nb maxi = 2 QTL 2D CR	nb de marqueurs Renan nb maxi = 12 4 QTL Renan (sauf Yr17)
	237E141V17	233E169V17	106E139	237E173V17				
RER22	R	R	R	MS	Sensible ou Yr 2		1	8 (2B, 6B)
RER32	MS	MR	R	MS	Yr 17	Yr17	0	6 (2B, 3B cent)
RER64	MR	MR	R	MS?	Yr 2, 3 ou SD		0	6 (2B)
RER110	MS	MS	MR	MS	Sensible ou Yr 2		0	6 (3B, 3B cent, 6B)
FD-08090	R	R	R	-	Résistant		2 (2D)	3 (2B)
FD08154	R	R	R	-	Yr 7+	Yr2BL2+Yr17	1	4 (6B)
NAWW12	R	R	R	-	Résistant		2 (2D)	3
NSA06-2122	R	R	R	MR	Résistant		2 (2D)	1
NSA05-0078	R	R	R	MR	Yr 32		1	4 (2B)
NSA04-7113	R	R	R	MR	Résistant		2 (2D)	1
NSA05-5997	MR	MR	R	MR	Yr 17?	Yr17	2 (2D)	1
NSA06-8483	R	R	R	MR	Yr 32		1	4 (2B, 3B cent)
G-3099-A	MR	MR	R	MS	Yr 17	Yr17	0	5 (3B cent)
Azzer1	MR	MR	R	MR	Yr 17	Yr17	0	6 (2B et 6B)
G-3044	R	R	R	MR	Résistant		2	1
S1-K24	MS	MS	R	MS	Yr 17?	Yr17	0	5 (2B et 6B)
H06158	R	R	R	-	Yr 6 ou 6+17	Yr17	2	2
CCB07H004	MR	MR	R	MR	Yr 17	Yr17	0	4 (2B, 3B cent)
H06195	MR	R	R	-	Yr 6+17	Yr17	3 (2D)	1
H07193	MS	MS	R	-	Yr 17 (impur)		0	5 (2B et 3B cent)
INSTINCT	MS	MR	R	-	Yr 6+ (+9?)		2	2
H09476	R	R	R	MR	Résistant	Yr17	1	4 (2B et 6B)
Barok	MR	MR	R	MS	Yr 17	Yr17	2 (2D)	5 (2B et 3B cent)
Koreli	MR	MR	R	MS	Yr 17	Yr17	1	8 (2B et 3B cent)
RE04073	R	MR	R	MR	Yr 17	Yr2BL2+Yr17	0	4 (6B)
RE05043	R	R	R	MR	Résistant	Yr17	0	6 (3B cent et 6B)

R = résistant MR = moyennement résistant MS = moyennement sensible

Tableau 8 : Ensemble des lignées présentant des allèles marqueurs de QTL du 2B, 3B centro et 6B de Renan et/ou du QTL 2D de Camp Rémy à l'exception de celles qui sont résistantes à l'ensemble des 4 pathotypes de rouille jaune

3. Discussion et conclusion

► Intérêts et limites du phénotypage dans la détection de la stabilité de QTL de résistance

Cette étude a montré l'intérêt d'effectuer des expérimentations au champ différentes pour chaque pathotype étudié dans le cadre de détection de gènes majeurs et de QTL de résistance. La contamination naturelle par un pathotype non-inoculé artificiellement pendant l'expérimentation, est toujours possible surtout les années à forte contamination naturelle de rouille jaune, c'est un frein à la bonne interprétation des résultats et donc à la détection des gènes majeurs spécifiques efficaces dès le stade jeune plante ou à partir du stade adulte du blé. En cas de contamination naturelle, il est aussi difficile d'évaluer la stabilité d'un QTL, dont l'expression va être modifiée en fonction des pathotypes qui interviennent dans la relation hôte-pathogène et du fonds génétique (Tableau 8).

La détection de QTL dépend comme on a pu le voir également de l'effet « notateur » car le repérage d'individus moyennement résistants est parfois plus délicat, quand l'évaluation repose, soit sur une note globale donnée à la lignée, soit sur une moyenne de notes obtenues sur chaque plante de la lignée. Ainsi par exemple pour la lignée ReR138 (Tableau 6) les AUDPC sont significativement plus élevées dans les expérimentations des membres 'Club 5', (notation globale) que dans celles de l'INRA de Rennes et Grignon (note plante à plante). Cette différence est retrouvée également pour le parent résistant Renan. Or si Renan peut présenter quelques symptômes de rouille jaune en début de montaison, on n'en retrouve plus sur les étages foliaires supérieurs en fin de végétation. Autant la notation globale par lignée semble mieux convenir aux sélectionneurs car ils ont un grand nombre de lignées à noter chaque année pour divers critères et ils cherchent à éliminer tous les génotypes qui n'ont pas une résistance élevée, autant il apparaît être indispensable de faire de la notation plante à plante pour faire une étude de QTL précise. En effet, si chaque QTL n'apporte pas à lui seul un niveau de résistance suffisant, il est important d'en repérer plusieurs afin de les introduire par la suite dans un même génotype, qui aura alors un niveau de résistance supérieur.

► Intérêts et limites du génotypage dans la détection de gène / QTL de résistance

Le génotypage est idéal pour étudier la généalogie. A chaque fois que l'on a trouvé dans un génotype des allèles de Renan, de Camp Rémy ou d'Apache, et qu'il a été possible de vérifier la généalogie, nous avons confirmé la présence de ces 3 variétés ou de l'un de leurs parents dans les géniteurs de ce génotype.

Le marquage de gènes et QTL est possible, avec de préférence au moins 3 ou 4 allèles marqueurs par gène/QTL. Ce marquage est même parfois la seule possibilité de mettre en évidence des gènes lorsqu'ils sont cumulés dans un même génotype et que l'on ne possède pas les pathotypes adéquats pour les repérer. On peut prendre comme exemple la mise en évidence du gène *Yr17*

dans la lignée FD-07072 résistante aux 12 pathotypes de rouille jaune testés au stade jeune plante (Tableau 7).

Le marquage de gènes dans des régions chromosomiques portant plusieurs gènes/QTL est cependant plus délicat. Il est possible néanmoins de suivre en sélection assistée par marqueurs (SAM) des gènes à partir d'un géniteur défini, mais il faut être vigilant à ne pas perdre de gène en cours de sélection. Ainsi Camp Rémy (CR), possède un cluster de gènes de résistance majeurs sur le 2BL (*YrRsp* et *Yr7*), alors qu'Apache un des descendants de CR n'a hérité que de *Yr7* (Mallard *et al*, 2005 ; Paillard *et al*, publication en cours). Il n'est pas évident de faire un état des lieux exact des gènes présents dans une telle région chromosomique, surtout si on ne connaît pas la généalogie du matériel végétal étudié. Outre les gènes *YrRsp* et *Yr7*, existent dans cette même région les gènes *Yr5* et *YrSpalding*, étant considérés comme des allèles de *Yr7* (Zhang *et al.*, 2009), ainsi que *Yr43*, *Yr44* et *YrQz* (Cheng *et al*, 2010). Seul le clonage de chacun de ces gènes pourra conduire à un marquage beaucoup plus fiable de chacun d'eux.

De même, on sait qu'il existe d'autres QTL de résistance à la rouille jaune dans les régions chromosomiques des QTL 2B (Crossa *et al*, 2007) et 6B (Suenaga *et al*, 2003 ; Christiansen *et al* 2006 ; Bariana *et al*, 2010) de Renan, qui sont également marqués. Il faudra donc prendre des précautions, si on recherche grâce aux marqueurs ces QTL dans des lignées d'origine inconnue.

Dans ce travail, la mise en évidence par marquage de QTL/gènes de résistance dans différents fonds génétique a été limitée, car les lignées en sélection retenues ne présentaient pas ou peu Renan, Apache et Camp Rémy comme géniteurs.

► Vers la construction de génotypes présentant des combinaisons de gènes/QTL de résistance efficaces et durables

Le marquage permet de faire l'état des lieux des gènes/QTL présents dans le matériel végétal et doit permettre d'éviter l'utilisation trop fréquente de certaines combinaisons de gènes et donc de mettre trop de pression de sélection sur l'agent pathogène. La combinaison *Yr7-Yr17* trouvée chez Apache protégeait bien les lignées vis-à-vis de la rouille jaune, mais elle est très présente dans les lignées étudiées. Ainsi la moitié des lignées totalement résistantes aux 4 pathotypes de rouille jaune étudiés présente cette combinaison de gènes (Tableau 7). Attention à ne pas trop utiliser cette combinaison de gènes car son emploi trop fréquent, grandes superficies cultivées avec Apache par exemple, a peut-être déjà conduit en 2011 à l'apparition en France du nouveau pathotype de rouille jaune 239E175V17 (Vr1, -2, -3, -4, -6, -7, -9, -17, 27, 32, Sd, Su) contournant les gènes *Yr7* et *Yr17*. Il faut cependant signaler qu'Apache demeure résistante et reste protégé par un autre facteur de résistance, qui pourrait être le gène de résistance adulte porté par le 4B (Paillard *et al*, 2012), mais dont on ne dispose pas de marqueur suffisamment lié pour le suivre par marquage. L'analyse des lignées génotypées montre également que plusieurs lignées possèdent au moins un QTL de Renan. Il serait donc intéressant d'associer ces QTL à la combinaison *Yr17-Yr2BL* pour la rendre plus durable, comme c'est le cas (Tableau 7) dans la lignée DI 08013 (=Musik).

4. Livrables et utilisation des résultats

L'analyse de l'ensemble des travaux a permis de dresser une liste de livrables :

- caractérisation phénotypique et génétique du matériel végétal issu de la sélection avec identification :
 - 1 - de gènes majeurs postulés, efficaces dès le stade jeune plante ;
 - 2 - de composantes de résistance partielle détectées aux stades adultes du blé ;
 - 3 - de gènes et QTL par marquage ;
- confirmation de l'intérêt de l'emploi de marqueurs moléculaires déjà publiés pour la détection dans différents fonds génétiques de QTL de Renan et/ou de Camp Rémy ;
- identification dans le matériel végétal issu de la sélection de combinaisons de gènes majeurs/QTL efficaces, dont certaines exercent moins de pression de sélection sur

l'agent pathogène et seront donc probablement plus durables.

L'exploitation de ces résultats doit conduire à la création de futurs géniteurs et/ou de variétés cumulant différents QTL de résistance à la rouille jaune par une approche de sélection assistée par marqueurs (SAM).

Les résultats obtenus pourront faire l'objet d'une publication scientifique, dans un délai qui reste à préciser.

5. Remerciements

Nous remercions F. Brunet et P. Leconte pour la mise en place des expérimentations à l'INRA du Rheu (35), Christophe Montagnier et Laurent Gérard pour celle de Versailles (78). Ce travail a été réalisé avec l'aide financière du fonds FSOV versé par le GNIS (septembre 2008-septembre 2011).

Références bibliographiques

Bariana H.S., Bansal U.K., Schmidt A., Lehmensiek A., Kaur J., Miah H., Howes N., McIntyre C.L. (2010) Molecular mapping of adult plant stripe rust resistance in wheat and identification of pyramid QTL genotypes. *Euphytica* 176:251-260.

Bayles R.A., Flath K., Hovmöller M.S., de Vallavieille-Pope C. (2000) Breakdown of the *Yr17* resistance to yellow rust of wheat in northern Europe - a case study by the yellow rust sub-group of COST 817. *Agronomie* 20:805-811.

Chen X.M. (2005) Epidemiology and control of stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) on wheat. *Can J Plant Pathol* 27:314-337.

Cheng P., Chen X.M. (2010) Molecular mapping of a gene for stripe rust resistance in spring wheat cultivar IDO377s. *Theor Appl Genet* 121:195-204.

Christiansen M.J., Feenstra B., Skovgaard I.M., Andersen S.B. (2006) Genetic analysis of resistance to yellow rust in hexaploid wheat using a mixture model for multiple crosses. *Theor. Appl. Genet.* 112:581-591.

Crossa J., Burgueno, J, Dreisigacker S., Vargas M., Herrera-Foessel S.A., Lillemo M., Singh R.P., Trethowan R., Warburton M., Franco J., Reynolds M., Crouch J.H., Ortiz R. (2007) Association analysis of historical bread wheat germplasm using additive genetic covariance of relatives and population structure. *Genetics* 177:1889-1913.

Dedryver F., Paillard S., Mallard S., Robert O., Trottet M., Nègre S., Verplancke G., Jahier J. (2009) Characterization of genetic components involved in durable resistance to stripe rust in the bread wheat 'Renan'. *Phytopathology* 99:968-973.

De Vallavieille-Pope C., Picard-Formery H., Radulovic S., Johnson R. (1990) Specific resistance factors to yellow rust in seedlings of some French wheat varieties and races of *Puccinia striiformis* Westend. in France. *Agronomie* 10:103-113.

De Vallavieille-Pope C., Rouzet J., Leconte M., Delos M., Mistou M.N. (2000) La rouille jaune du blé en France : des épidémies déclenchées par une nouvelle race, un hiver doux et un printemps humide. *Phytoma* 527:22-29.

De Vallavieille-Pope C., Ali S., Leconte M., Enjalbert J., Delos M., Rouzet J. (2012) Virulence dynamics and regional structuring of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in France between 1984 and 2009, *Plant Disease*, 96,131-140.

Enjalbert J., Duan X., Leconte, M., Hovmöller M.S., de Vallavieille-Pope C. (2005) Genetic evidence of local adaptation of wheat yellow rust (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*) within France. *Molecular Ecology* 14:2065-2073.

Fu D., Uauy C., Distelfeld A., Blechl A., Epstein L., Chen X., Sela H., Fahima T., Dubcovsky J. (2009) A kinase-START gene confers temperature-dependent resistance to wheat stripe rust. *Science* 323:1357-1360.

Hau B., de Vallavieille-Pope C. (2006) Wind-dispersed diseases. In: *The Epidemiology of Plant Diseases*. p. 387-416, Eds B. M. Cooke, D. Gareth Jones and B. Kaye, Second Edition, Springer.

Mallard S., Gaudet D., Aldeia A., Abelard C., Besnard A.L., Sourdille S., Dedryver F. (2005) Genetic analysis of durable resistance to yellow rust in bread wheat. *Theor Appl Genet* 110:1401-1409.

Paillard S., Verplancke S., Perretan M.-R., Mohamadi F., Leconte M., Coëdel S., de Vallavieille-Pope C., Dedryver F. (2012) Durable resistance to stripe rust is due to three specific resistance genes in French bread wheat cultivar Apache. *Theoretical and Applied Genetics*, 125, 5, 955-965.

Robert O., Abelard C., Dedryver F. (1999) Identification of molecular marker for the detection of the yellow rust resistance gene *Yr17* in the wheat. *Mol Breed* 5:167-175.

Suenaga K., Singh R.P., Huerta-Espino J., William H.M. (2003) Microsatellite markers for genes *Lr34/Yr18* and other quantitative trait loci for leaf rust and stripe rust resistance in bread wheat. *Phytopathology* 93:881-890.

Uauy C., Brevis J.C., Chen X., Khan I., Jackson L., Chicaiza O., Distelfeld A., Fahima T. and Dubcovsky J. (2005) High-temperature adult-plant (HTAP) stripe rust resistance gene *Yr36* from *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* is closely linked to the grain protein content locus *Gpc-B1*. *Theor Appl Genet* 112:97-105.

Zhang P., McIntosh RA, Hoxha S., Dong C. (2009) Wheat stripe rust resistance genes *Yr5* and *Yr7* are allelic. *Theor Appl Genet* 120:25-29.

Résistance partielle à la rouille brune : sources de résistance, utilisation en sélection et durabilité

Henriette GOYEAU¹, Gustavo AZZIMONTI¹, Denis BEGHIN², Sébastien CAIVEAU³, Philippe DU CHEYRON⁴, Michaël COCHARD⁵, Clément DEBITON⁶, Jean-Michel DELHAYE⁷, Sylvie DUTRIEZ⁸, Pascal GIRAUDEAU⁹, Mathieu GRARE⁹, Volker LEIN¹⁰, Christian LANNOU¹, Philippe LEREBOUR⁶, Philippe LONNET², Thierry MARCEL¹, Christophe MICHELET¹¹, Jean-Michel MOREAU¹², Axel OLIVIER¹³, Sophie PAILLARD¹⁴, Pierre RIGOLLE¹³, Bernard ROLLAND¹⁴, Patrice SENNELLART³, Jayne STRAGLIATI⁵, Stephen SUNDERWIRTH¹⁵

* Coordinateur : Henriette GOYEAU, goyeau@grignon.inra.fr, Tél. : 01.30.81.54.36

- 1 - INRA BIOGER - 78850 Thiverval Grignon
- 2 - Florimond Desprez - 3 rue Florimond Desprez, BP 41, 59242 Cappelle en Pévèle
- 3 - Syngenta Seeds - BP 5, 78910 Orgerus
- 4 - Arvalis Institut du Végétal IBP Université Paris Sud Rue de Noetzelin Bât. 630 91405 Orsay Cedex
- 5 - Limagrain Europe - 5 rue de l'Égalité, 28130 Chartainvilliers
- 6 - UNISIGMA - 60480 FROISSY
- 7 - Ets Lemaire-Deffontaines SA - 180 rue du Rossignol, 59310 Auchy Lez Orchies
- 8 - Caussade Semences - ZI de Meaux, BP 109, 82303 Caussade Cedex
- 9 - Secobra - Centre de Bois-Henry, 78580 Maule
- 10 - Saaten Union Recherche - 163 avenue de Flandre, BP 6, 60190 Estrées Saint Denis
- 11 - RAGT R2N - 28150 Louville La Chenard
- 12 - SERASEM - Ferme du Paly 91490 Milly la Forêt
- 13 - GIE Recherches Génétiques Céréales Club 5 - 83 avenue de la Grande Armée, 75782 Paris Cedex 16
- 14 - INRA IGEPP - Domaine de La Motte au Vicomte - BP 35327, 35653 Le Rheu
- 15 - Adrien Momont & fils SARL - Station de Recherche - RN 154, 28150 Allonnes

1. Introduction

La résistance d'une variété peut reposer sur des gènes de résistance dits spécifiques. Elle s'exprime alors par une réponse de tout ou rien, soit résistant/sensible. La résistance spécifique a été très utilisée en raison de son déterminisme génétique simple (monogénique), et du haut niveau de résistance conféré (résistance totale). Dans les variétés de blé cultivées en France, une dizaine de gènes *Lr* de résistance spécifique à la rouille brune, maladie causée par *Puccinia triticina*, sont présents, seuls ou en combinaisons de deux ou trois gènes (Goyeau et Lannou, 2011). Toutefois le contournement de ce type de résistance est extrêmement fréquent et parfois rapide, après seulement 2 à 3 années de culture (Kolmer 2001), ce qui a été le cas par exemple en France pour les variétés Orvantis, Aubusson et Lancelot. La sélection pour la résistance à la rouille brune dans les variétés cultivées en France s'est traduite par un pyramidage progressif de gènes *Lr* dans les variétés, suite à l'apparition de nouvelles races cumulant les virulences permettant de contourner ces combinaisons de gènes *Lr* (Goyeau et Lannou, 2011).

Les résistances qualifiées de partielles, ou quantitatives, ou encore slow-rusting pour les rouilles, sont réputées plus durables que les résistances spécifiques (Kolmer 1996). Elles s'expriment par une quantité réduite de maladie. Après 25 années de sélection pour ce type de résistance vis-à-vis des rouilles des céréales, le CIMMYT (Centre International pour l'Amélioration du Blé et du Maïs) considère que la combinaison de quelques gènes de résistance partielle à effet additif permet d'obtenir une résistance durable (Singh *et al.* 2005). Singh *et al.* (2000) estiment que de tels gènes sont courants chez le blé. Toutefois, jusqu'à présent seulement deux gènes de slow-rusting pour la rouille brune ont été caractérisés : *Lr34*, qui a été cloné (Krattinger *et al.*, 2009), et *Lr46* (Singh *et al.*, 1998).

Dans ce contexte, l'enjeu est de proposer une stratégie de gestion durable de la résistance génétique à la rouille brune du blé, basée sur des sources de résistance quantitative. Notre objectif est de caractériser les sources de résistance quantitative présentes dans le fonds génétique utilisé en France. Nous proposons d'identifier des résistances se traduisant par une diminution des performances du pathogène sur les différentes phases du cycle infectieux (période de latence, efficacité d'infection, surface sporulante, production de spores par unité de surface). Ainsi, l'exercice de contraintes diversifiées sur le pathogène devrait ralentir son adaptation et augmenter la durabilité de la résistance.

La résistance partielle est censée être efficace contre tous les isolats du pathogène. Toutefois des interactions de type spécifique ont pu être démontrées dans le cas de résistances partielles (Parlevliet 1988). Nous avons montré qu'il existait une adaptation quantitative à l'hôte dans le cas d'un couple pathotype x variété pour la rouille brune du blé (Pariaud *et al.* 2009). Une telle adaptation pourrait signifier que le pathogène est susceptible d'éroder la résistance partielle, ce qui remettrait en cause sa durabilité. Nous nous attacherons donc également dans ce projet à étudier en conditions contrôlées plusieurs couples pathotype x variété, pour évaluer le potentiel d'adaptation à la résistance partielle chez *P. triticina*.

Lors d'un précédent projet (FSOV 2004), nous avons repéré au champ des variétés et lignées présentant divers niveaux de résistance partielle à la rouille brune. Une première série de croisements à partir de ces sources de résistance a été réalisée. La méthodologie d'étude des composantes de la résistance partielle en serre a été mise au point (Pariaud *et al.*, 2009), sauf pour l'efficacité d'infection pour laquelle une méthodologie fiable et précise restait à établir.

A partir de ces acquis, les deux principaux axes de travail définis pour le présent projet étaient de i) caractériser la

diversité et la stabilité de sources de résistance partielle, via l'analyse de leurs composantes, ainsi que leur déterminisme génétique ii) assurer une veille du contexte épidémiologique, en effectuant un suivi d'une part des virulences et de l'agressivité dans les populations pathogènes, et d'autre part des résistances spécifiques et quantitatives dans les variétés cultivées.

2. Caractériser des sources diversifiées de résistance partielle et leurs composantes, et analyser leur déterminisme génétique

► Caractérisation des composantes de la résistance partielle : diversité, variabilité et spécificité

Ce travail ayant fait l'objet d'une publication (Azzimonti *et al.*, Plant Pathology, sous presse), nous n'en produisons ci-après qu'un résumé.

A partir d'un ensemble de 86 lignées et variétés analysées pour leur résistance quantitative au champ lors d'un programme FSOV 2004-2007, six variétés et lignées représentant une gamme de résistance quantitative ont été sélectionnées pour une étude des composantes de la résistance en serre (Tableau 1). La variété Ecrin, parent sensible utilisé pour les croisements d'étude du déterminisme génétique (voir § 1.2.3), ainsi que Morocco, considéré comme témoin sensible en serre, ont également été incluses dans cette étude. Trois pathotypes différents, nommés P3, P4 et P5, ont été utilisés : leurs fréquences dans les populations naturelles sur la période 2000-2008 ayant été respectivement basse, élevée, et intermédiaire, nous avons postulé que ces pathotypes étaient représentatifs de niveaux d'agressivité différents.

Cinq composantes de la résistance ont été mesurées : l'efficacité d'infection (IE), pour laquelle une méthodologie originale a été développée, la période de latence (LP), la taille des lésions (LS), la production de spores par lésion (SPL), et la production de spores par unité de surface sporulante (SPS). Nous avons trouvé une grande diversité, ainsi qu'une variabilité élevée, dans les valeurs de ces composantes, selon les différentes combinaisons (génotype-hôte x pathotype)

étudiées. Pour toutes les composantes, une spécificité vis-à-vis du pathotype a été mise en évidence. Les génotypes hôtes étudiés ont présenté une diversité de profils de résistance, par rapport aux composantes affectées et à la spécificité des interactions avec les pathotypes. Leur intérêt en tant que source de résistance quantitative en sélection a pu être évalué : la lignée LD7 combine vraisemblablement des mécanismes de résistance diversifiés, car elle exprime un niveau de résistance élevé pour toutes les composantes, avec une spécificité par rapport aux pathotypes pour toutes les composantes ; pour Apache, aucune spécificité n'a pu être mise en évidence, ce qui signifie que l'agressivité des trois pathotypes utilisés était comparable, quelle que soit la composante considérée. Cette absence d'adaptation du pathogène à la résistance quantitative d'Apache pourrait expliquer la durabilité de cette résistance observée au champ depuis maintenant plus de 11 ans.

► Stabilité de la résistance partielle vis-à-vis de l'environnement biotique et abiotique

L'objectif était d'analyser la relation entre le niveau de résistance partielle mesuré sur les composantes en serre d'une part, et le niveau de résistance au champ d'autre part. Trois essais au champ ont été conduits en 2009, 2010 et 2011, à la station expérimentale d'Arvalis à Boigneville. Chaque année, l'essai comprenait trois traitements, inoculés avec les pathotypes P3, P4 et P5, avec deux répétitions par traitement. L'essai comportait 12 variétés (Andalou, Apache, Balance, Ciento, Camp Remy, Ecrin, Instinct, Sideral, Soissons and Tremie), deux lignées (LD7 et PBI), ainsi que les témoins sensibles au champ Buster and Frandoc. Des notations visuelles du pourcentage de surface malade sur la feuille drapeau ont été réalisées.

Pour les trois pathotypes utilisés, les composantes mesurées en serre LP, et LS étaient significativement corrélées à la sévérité finale de la maladie cDS3 (Figure 1). Les composantes IE et SPS étaient marginalement corrélées, alors que la sporulation par lésion (SPL) ne présentait pas de corrélation significative avec la sévérité de la maladie au champ. L'expression de la résistance partielle dans les génotypes hôtes étudiés s'est donc révélée stable, d'une part entre la serre et le champ, et d'autre part entre les trois pathotypes étudiés.

Variété	RAUDPC ^w	Gènes Lr ^x	Date d'inscription
Morocco	100	-	-
Ecrin	96	Lr13, (Lr14a)	1985
Soissons	61	Lr14a	1988
Trémie	53	Lr10, Lr13	1992
Apache	51	Lr13, Lr37	1998
Andalou	45	Lr13	2002
PBI-04-006 (PBI)	36	Lr13, Lr14a	non inscrite
Balance	25	Lr10, Lr13, Lr20, Lr37	2001
LD 00170-3 (LD7)	17	Lr13, Lr37	non inscrite

W : RAUDPC = Aire Relative sous la courbe de progression de la maladie, en pourcentage de l'aire sous la courbe de maladie (AUDPC) du témoin sensible mesurée au champ, en conditions d'inoculation artificielle avec l'isolat P3, moyenne de 3 années (2005, 2006, 2007) d'essais multilocaux.

X : gènes Lr de résistance à la rouille brune postulés au stade plantule (Goyeau & Lannou, 2011). La présence des gènes indiqués entre parenthèses est à confirmer. - : aucun gène de résistance spécifique

Tableau 1. Niveau de résistance quantitative au champ, estimé par la RAUDPC, gènes Lr de résistance spécifique à la rouille brune et année d'inscription des génotypes de blé étudiés pour leurs composantes de résistance partielle en serre

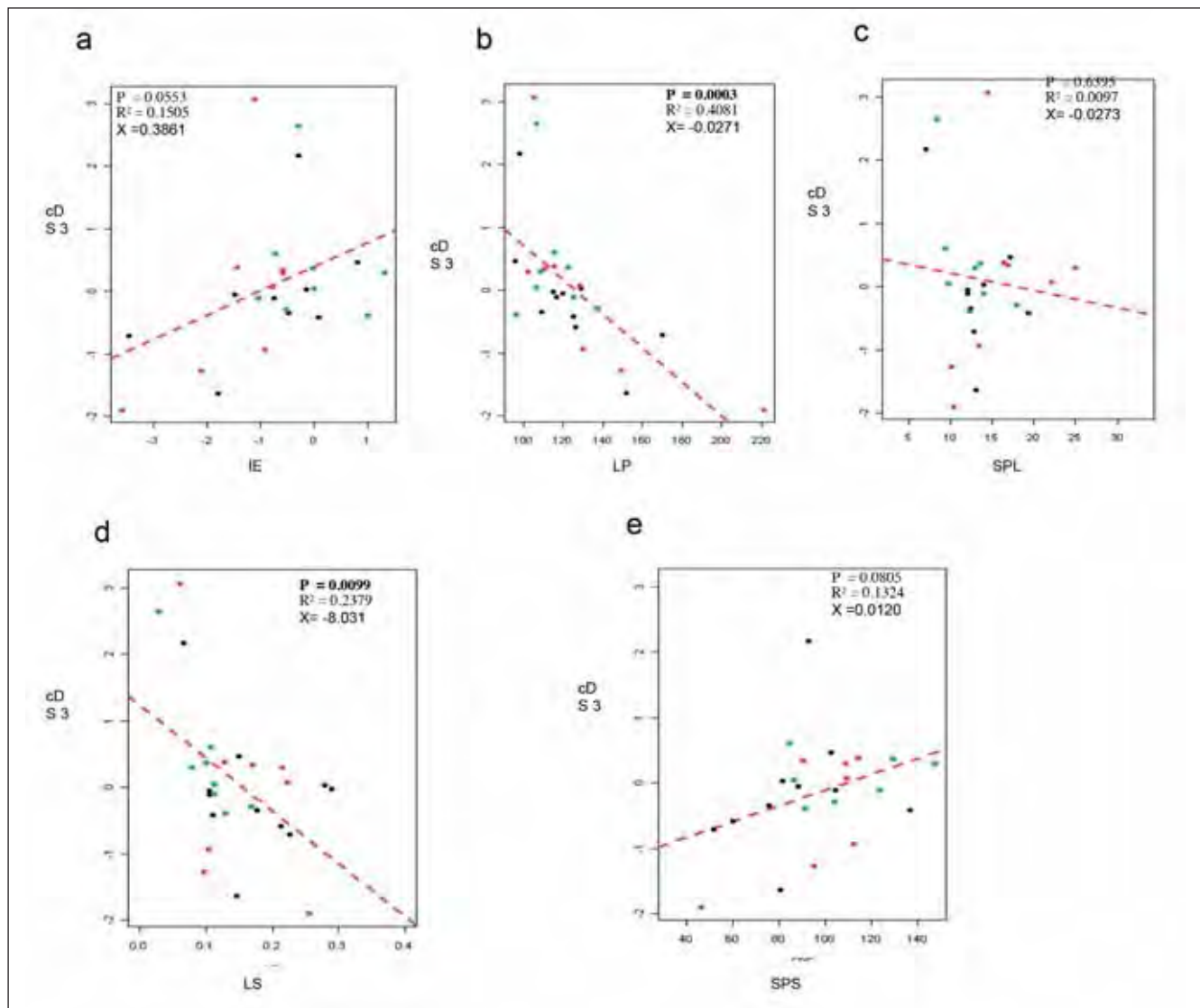


Figure 1. Relation entre la sévérité de la maladie au champ et les composantes de la résistance mesurées en serre. (a) efficacité d'infection (IE), (b) période de latence (LP), (c) production de spores par lésion (SPL), (d) taille de lésion (LS) et (e) production de spores par unité de surface (SPS). Les valeurs médianes des estimations a posteriori des paramètres sont indiquées pour chaque combinaison variété x isolat. Les valeurs pour les isolats P3, P4, et P5 sont figurées en noir, rouge, et vert, respectivement. La droite de régression est figurée en pointillés rouges. Les P-value, R^2 , et pentes (X) sont indiquées, et figurées en gras lorsque la pente est significativement différente de 0, au seuil de 0.05.

► Analyse du déterminisme génétique de sources de résistance partielles

L'enjeu de l'analyse du déterminisme génétique est d'identifier les QTLs responsables, et d'en produire des marqueurs utilisables en sélection. Dans un premier temps, nous avons vérifié si les gènes *Lr34* et *Lr46*, seuls gènes de résistance quantitative pour lesquels des marqueurs étaient disponibles, étaient présents dans le matériel étudié. D'autre part Bioplante a mis à notre disposition une population HD du croisement Apache x Balance, qui nous permettait d'étudier le déterminisme génétique de l'une des sources de résistance étudiée, à savoir Apache. Par ailleurs, nous avons poursuivi le travail de création (initié dans le programme FSOV 2004) de populations de cartographie à partir des parents Apache, Trémie, PBI et LD7, sélectionnés pour leur résistance exprimée sur des composantes diversifiées, et croisés avec le parent sensible Ecrin.

Détection des gènes de résistance quantitative *Lr34* et *Lr46* à l'aide de marqueurs

L'objectif de ce travail était de vérifier si les variétés/lignées

ayant exprimé une résistance quantitative dans le précédent projet FSOV, associée à l'observation d'une nécrose de bout de feuille au champ (marqueur morphologique de gènes *Ltn* - leaf tip necrosis - associés à *Lr34* et *Lr46*), étaient porteuses d'un de ces deux gènes, à l'aide des marqueurs moléculaires disponibles pour ces gènes. La liste des variétés à tester comprenait, outre les témoins Frontana, Forno et Bezostaya porteurs du gène *Lr34*, les variétés Andalou, Apache, Camp Rémy, Génial, Instinct, Occitan, Aciento, Sidéral, Soissons, Trémie, Paledor et Ecrin, ainsi que les lignées FD 02130-3, PBI et LD7. Les résultats des tests effectués en parallèle dans deux laboratoires ont été concordants : le marqueur *csLV34* du gène *Lr34* était présent dans les témoins, mais dans aucune des variétés et lignées testées. Trois marqueurs de *Lr46*, *wmc044*, *xpsp3100* et *gwm259*, ont été utilisés, et trouvés dans aucuns des génotypes.

Il semble donc que les gènes *Lr34* et *Lr46* n'aient pas été introduits dans le fonds génétique exploité en France, et que les résistances quantitatives observées seraient dues à d'autres gènes. Nous pouvons également conclure que les conditions d'environnement au champ, pourtant variées

car issues d'une dizaine de lieux, n'ont pas été favorables à l'utilisation de la nécrose de bout de feuille comme marqueur morphologique, puisque des nécroses de bout de feuille ont été observées en l'absence de gènes *Lr34* et *Lr46*, et donc des gènes *Ltn* associés.

Diversité et spécificité des QTLs associés à cinq composantes de la résistance chez les parents Apache et Balance

Le parent Apache a été identifié porteur de résistance quantitative à la rouille brune. La disponibilité chez Bioplante d'une population de cartographie (Apache x Balance) nous a fourni l'opportunité d'étudier le déterminisme de cette source de résistance. Les objectifs de ce travail étaient i) d'identifier les QTLs associés aux composantes de la résistance en serre ii) de déterminer quel est l'impact de ces composantes sur l'épidémie au champ et iii) d'analyser la spécificité de ces QTLs vis-à-vis de deux pathotypes au champ.

Une population d'haploïdes doublés (HD) de 91 lignées du croisement Apache x Balance, développée par O. Robert et V. Laurent (Bioplante) a été analysée dans 4 essais au champ, et deux essais en serre (2010 et 2011), inoculés avec les pathotypes P3 et P5.

Expérimentations en serre : l'expérimentation a été conduite à Grignon en 2010 (G1) et répétée en 2011 (G2). Pour chaque plante, trois feuilles drapeau ont été inoculées, celles du maître brin et de deux talles secondaires, par application au pinceau d'un mélange spores/Lycopodium. Les feuilles des talles secondaires ont été utilisées pour la mesure de l'efficacité d'infection, et la feuille du maître-brin a été utilisée pour mesurer la période de latence et les variables de sporulation. L'efficacité d'infection (IE) a été mesurée par le rapport entre le nombre de lésions sporulantes et le nombre de spores déposées. Juste après inoculation, la partie distale de la feuille a été coupée, et conservée à -20°C jusqu'au comptage des spores à la loupe binoculaire. Les lésions sporulantes ont été comptées sur 1 cm², sur la partie proximale de la feuille restée attachée à la plante, à la fin de la période de latence. Pour chaque lignée, l'efficacité d'infection a été estimée à partir de 10 à 12 répétitions.

La période de latence (LP) a été mesurée comme le temps auquel 50% des lésions sporulantes sont apparues, à partir de la courbe du comptage journalier des lésions en fonction du temps, sur 5 à 6 répétitions. A la fin de la période de latence, les feuilles ont été enveloppées dans des sachets cellophane, afin de recueillir les spores produites sur 5 jours consécutifs. Les spores ont été pesées, et les feuilles ont été scannées, afin de mesurer la surface sporulante par analyse d'image. Un comptage des lésions

a été réalisé sur une surface de 2 cm². L'ensemble de ces mesures a permis de déterminer la densité de lésions, la taille des lésions (LS), la production de spores par lésion (SPL), et la production de spores par unité de surface sporulante (SPS), à partir de 5 à 6 répétitions.

Expérimentations au champ : elles ont été conduites en 2009 et en 2010, en deux lieux, Cappelle en Pévèle (Cap-09, Cap-10) et Maisse (Mai-09, Mai-10). En chaque lieu, deux essais isolés l'un de l'autre ont été implantés, l'un inoculé avec P3 et l'autre avec P5, avec deux répétitions dans chaque essai. Deux à quatre notations visuelles du pourcentage de surface malade sur la feuille drapeau ont été réalisées, et l'aire sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC) a été calculée.

Analyses statistiques : Les variables mesurées au champ ont été analysées en fonction des facteurs année, lieu, pathotype, lignée, ainsi que l'interaction entre ces facteurs. Les variables mesurées en serre ont été analysées en fonction des facteurs année et lignée, et leur interaction. La densité de lésion a été utilisée en covariable dans les analyses de variance des variables LP, LS, SPL et SPS, car elle interagit avec ces variables. Les analyses ont été effectuées avec Splus.

Construction de la carte et analyses QTL : sur un total de 847 marqueurs DArT et SSR, nous avons conservé 355 marqueurs non distordus et suffisamment distincts, qui ont été positionnés sur les 39 groupes de liaison obtenus. Les QTLs ont été déterminés indépendamment pour chaque répétition au champ et chaque expérience en serre, par Composite Interval Mapping, avec QTL Cartographer.

Treize QTLs ont été identifiés, cartographiés, associés à une ou plusieurs composantes de résistance, et/ou à la résistance au champ (Tableau 2). Dix des 13 QTLs identifiés étaient associés à un effet sur les composantes de résistance mesurées en serre. La plupart des QTLs étaient associés à une ou deux composantes, ce qui est cohérent avec l'hypothèse que les différentes composantes sont gouvernées par des facteurs génétiques différents. Un seul des QTLs était associé à toutes les composantes, mais avec un niveau de signification variable selon les composantes. Tous les QTLs trouvés en serre étaient également associés à la résistance au champ. Les QTLs se sont exprimés à différents stades de l'épidémie au champ. La spécificité des QTLs vis-à-vis des deux pathotypes utilisés au champ (P3 et P5) était variable : cinq QTLs n'ont montré aucune spécificité, quatre QTLs ont été détectés avec les deux pathotypes mais avec un effet différentiel selon le pathotype, et quatre QTLs ont été détectés avec un seul des deux pathotypes.

QTL name ^A	Flanking markers ^B	QTL Position (cM) ^C	Max. Conf. Int. ^D	Experiment ^E	Epidemic stage ^F	Component ^G	Iso-specificity ^H	LOD rank ^I	mean R ² ^J	Effect ^K	Source ^L	QTLs already identified at the same position (Reference)
Qlr.inra-1Aa	Pt733361- Pt671596	0.0 - 9.7	0.0 - 28.0	Cap-09, Cap-10	Early	-	yes	1, 2	0.092	Minor	Apa	
Qlr.inra-2Ab	Pt0568- un3	0.0 - 23.5	0.0 - 31.8	Cap-10, Mai-09/ G1, G2	Late	SPL, LS	no	1	0.087	Minor	Apa	QTL for leaf rust, from Apache, near gene cluster Yr17-Lr37-Sr38 (O. Robert, pers. comm.)
Qlr.inra-2B	gpw3032- Pt4133	155.1 - 180.1	147.0 - 186.9	Cap-09, Mai-09/ G1	Late	LP	yes	1, 2, 3	0.143	Moderate	Bal	QTL for yellow rust, from Apache, near Yr7 (O. Robert, pers. comm.)
Qlr.inra-2D	Pt8330 - gpw3320	33.0 - 63.1	27.1 - 104.5	All Field / G1	All	SPS	Quantitative	3	0.226	Major	Bal	QTL for septoria tritici blotch, from Balance, near dwarfing gene Rht8, and several QTLs of morphological traits (Tabib Ghaffary et al., 2011)
Qlr.inra-3Bb.1	Pt741465- Pt1682	77.1 - 92.2	77.1 - 110.0	Cap-10 / G1	Late	SPS	no	1, 2	0.122	Moderate	Apa	QTL for yellow rust, from Balance (O. Robert, pers. comm.)
Qlr.inra-3Bb.2	Pt2757- Pt1867	121.7 - 125.4	105.0 - 136.5	Cap-10 / G2	Early	All	yes	1, 2, 3	0.141	Moderate	Bal	
Qlr.inra-3Db	Pt664804- gpw4163	63.2 - 80.5	63.2 - 110.0	Cap-09 / G1, G2	Intermediate	LP, LS	Quantitative	1, 2	0.102	Moderate	Apa	
Qlr.inra-4Bb	Pt3608- Pt4214	17.6 - 26.5	0.0 - 44.6	Mai-10 / G2	Intermediate	SPS	no	1, 2	0.1	Minor	Apa	
Qlr.inra-4Da	cf454- cf484	0.0 - 8.6	0.0 - 8.6	Mai-10 / G1, G2	Early	SPL, LS	yes	1, 2	0.132	Moderate	Bal	
Qlr.inra-5Bb/7Bb	Pt7720- wmc517	0.0 - 54.9	0.0 - 69.9	Cap-10, Mai-09, Mai-10	All	-	no	1, 2	0.08	Minor	Bal	
Qlr.inra-6Aa	Pt671799- Pt1742	11.3 - 31.9	8.0 - 34.1	Cap-09, Cap-10, Mai-09 / G1	Late	LP	Quantitative	1, 2	0.131	Moderate	Bal	
Qlr.inra-6B	Pt4716- Pt4388	0.0 - 16.3	0.0 - 50.0	Mai-09, Mai-10	All	-	Quantitative	1, 2	0.158	Moderate	Bal	
Qlr.inra-7Aa	Pt0639- Pt7105	0.0 - 20.6	0.0 - 25.6	Mai-09, Mai-10/ G2	All	SPL	no	2, 3	0.396	Major	Bal	QTL for leaf rust, from Balance, near Lr20 (O. Robert, pers. comm.)

A : nom des QTLs selon la nomenclature du Catalogue of Gene Symbols for Wheat (McIntosh et al. 2010).
B : Nom des marqueurs moléculaires flanquants. La position de chaque QTL varie selon les différentes analyses (lieu, répétition, année) conduites. Les marqueurs indiqués sont les plus externes, d'après l'ensemble des analyses réalisées.
C : Position des marqueurs pour les QTL avec des LOD supérieurs à 2 (LOD de rang 1) ou supérieurs à la valeur seuil de 1000 permutations (LOD de rang 2 ou 3). Les positions sont en centiMorgans, par rapport au premier marqueur de chaque groupe de liaison.
D : Intervalle de confiance maximum des QTLs, en centiMorgans. L'intervalle de confiance de chaque QTL varie selon les différentes analyses conduites. Les valeurs indiquées correspondent à l'intervalle de confiance le plus large, d'après l'ensemble des analyses réalisées.
E : Expérimentations en serre et au champ dans lesquelles les QTL ont été détectés
F : Stade de l'épidémie au champ auquel le QTL a été détecté, classé en précoce, intermédiaire et tardif, correspondant à la note de sévérité de la maladie à la première date, à une date intermédiaire, ou à la dernière date. All = QTLs trouvés à toutes les dates de notation.
G : Composante de résistance quantitative pour laquelle un QTL a été détecté en serre (IE = efficacité d'infection, LP = période de latence, SPL = production de spores par lésion, LS = taille de lésion, SPS = production de spore par unité de surface sporulante). All = QTLs trouvés pour toutes les composantes.
H : Spécificité des QTLs: no = QTL détecté avec les deux isolats, yes = QTL détecté avec l'isolat P5 uniquement, Quantitative = QTL détecté avec les deux isolats, mais avec un effet différentiel selon l'isolat.
I : rang du LOD minimal et maximal. Les valeurs des LOD ont été classées en catégories 1, 2, et 3, pour des valeurs de LOD respectivement : comprises entre 2 et la valeur seuil de 1000 permutations; comprises entre la valeur seuil de 1000 permutations et 7; supérieures à 7.
J : Pourcentage moyen de la variance phénotypique totale expliquée par le QTL postulé.
K : Classification de l'effet du QTL, basé sur le R² moyen: Mineur (R²<0.1), Modéré (0.1<R²<0.2), Majeur (R²>0.2).
L : Source Parentale de résistance (Apa=Apache, Bal=Balance).

Tableau 2. Profil des QTLs de résistance quantitative à la rouille brune dans la population d'haploïdes doublés Apache - Balance.

Populations de cartographie

Lors du programme FSOV 2004, nous avons sélectionné quatre sources de résistance quantitative, jugées diversifiées, à partir des deux critères suivants : i) différents niveaux de résistance au champ et ii) résistance due à différents composants, détectée par un phénotypage en serre. À partir d'un croisement avec la variété sensible Ecrin, les quatre populations de cartographie correspondantes ont été construites, et nous avons pu réaliser un phénotypage multilocal au champ de ces populations en année 4 du présent programme (Tableau 3). La distribution de fréquence du niveau de maladie ainsi obtenue a confirmé la nature quantitative de la résistance (Figure 2), et donc confirmé l'intérêt de poursuivre l'étude de ces populations. Ces quatre populations seront utilisées en 2013 (génération F7 pour les populations SSD) pour une cartographie fine des QTLs de résistance à la rouille brune et la production de marqueurs de ces QTLs utilisables en sélection.

	Populations SSD	Population HD
Parent(s)	Apache Trémie	
Résistant(s)	PBI04-006 (PBI)	LD00170-3 (LD7)
FSOV 2004		
2005 (année 1)	Phénotypage au champ	
2006 (année 2)	Phénotypage au champ	Phénotypage au champ
2007 (année 3)	Production de F1	Phénotypage au champ
FSOV 2008		
2009 (année 1)	Production de F3 et de F4	Production de HD
2010 (année 2)	Production de F5	Production de HD
2011 (année 3)	Production de F6 Pré-phénotypage en F5 (2 lieux par population)	Production de HD Pré-phénotypage (1 lieu)
2012 (année 4)	Production de F7 Phénotypage en F6 (3 lieux par population)	Phénotypage (3 lieux)

Tableau 3 : Production et phénotypage de populations de cartographie à partir de 4 parents sources de résistance quantitative diversifiées

2. Assurer une veille du contexte épidémiologique

► Suivi des populations pathogènes

Ce suivi permet de déterminer les pathotypes (ou combinaisons de virulences vis-à-vis des gènes *Lr*) de rouille brune auxquels les variétés sont confrontées au champ. Un suivi annuel des populations de *P. triticina* par échantillonnage sur les principales variétés cultivées reste indispensable, d'une part pour surveiller l'émergence de nouvelles virulences ou pathotypes, car les populations évoluent constamment, essentiellement en fonction des gènes de résistance utilisés dans les variétés cultivées ; d'autre part, il apporte les informations nécessaires au choix du ou des pathotypes à utiliser pour évaluer la résistance partielle, en fonction de leurs caractéristiques de virulence (contournement de gènes de résistance spécifique) et d'agressivité (fréquence dans les populations naturelles reflétant leur « succès » au champ). Ce suivi s'appuie entièrement sur les réseaux d'essais des partenaires sélectionneurs et Arvalis, et la caractérisation des pathotypes est effectuée par l'INRA-BIOGER.

Au cours des campagnes 2009, 2010 et 2011, au total 754 isolats ont été prélevés dans toute la France, en ciblant particulièrement les variétés les plus cultivées. Une quarantaine de pathotypes est identifiée chaque année. Pour simplifier la présentation des résultats, nous regroupons ces pathotypes en familles, une famille étant composée de pathotypes différant sur 2 ou 3 virulences maximum, et présentant le même génotype SSR (microsatellites). Les principales évolutions sur la période étudiée concernent d'une part de fortes évolutions de fréquence de certaines familles, et d'autre part l'apparition de nouvelles virulences :

- La famille 106314 (famille du pathotype P4) est très dominante depuis 2006. La famille 126-136 (famille du pathotype P5) a représenté au maximum 16% de la population en 2008, mais est devenue rare les années suivantes. Les familles 166 et 167, apparues en 2005, ont fait une très forte progression sur 2008-2011.

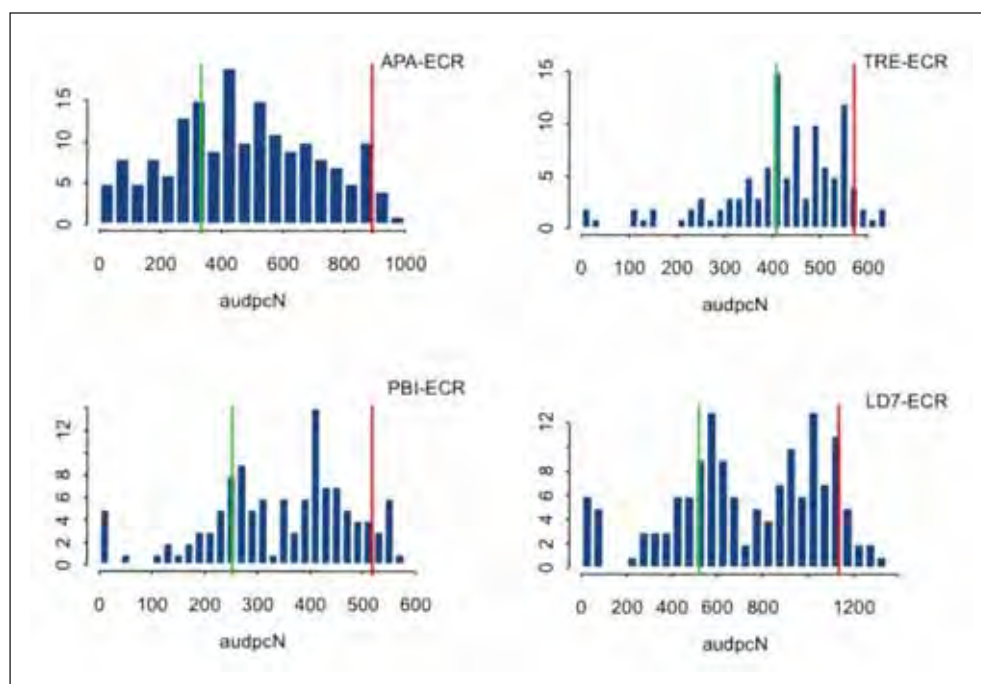


Figure 2 : Distribution de fréquences des AUDPC pour les populations HD et SSD (F6) au champ en 2012, vis-à-vis du pathotype P5. L'histogramme présenté ci-contre pour chacune des 4 populations a été choisi comme représentatif de ceux obtenus pour les 3 lieux x 2 répétitions par lieu. Ligne verte=moyenne du parent résistant, ligne rouge=AUDPC moyenne du parent sensible Ecrin

La famille 166 concurrence maintenant fortement la famille 106314 sur toutes les variétés. La famille 167 reste à une fréquence plus modeste et semblerait inféodée plus spécialement à Arezzo. Toutes ces familles dominantes ont en commun la combinaison de virulence (10, 13, 37), qui correspond à une combinaison de gènes devenue fréquente dans le paysage variétal français de ces dernières années. Les familles 166 et 167 ont très certainement en plus des virulences correspondant à des gènes de résistance adulte, présents dans les variétés mais indéterminés pour l'instant.

- La virulence sur le gène *Lr24* a été trouvée pour la première fois en 2009, et la virulence sur *Lr28* a été trouvée pour la première fois en 2011, avec des isolats porteurs de la double virulence 24 + 28. En conséquence, les variétés porteuses de *Lr24* et/ou *Lr28*, inscrites comme totalement résistantes, pourraient devenir sensibles au champ si ces nouveaux pathotypes portant les virulences correspondantes se développent. D'autre part, l'évaluation du niveau de résistance quantitative chez ces mêmes variétés ne pourra se faire qu'en utilisant un de ces nouveaux pathotypes, capables de contourner les résistances spécifiques de ces variétés.

► Suivi des populations hôtes

Détection au champ de sources de résistance quantitative, et évaluation de leur stabilité vis-à-vis de la population pathogène

L'objectif est de prospecter au fur et à mesure dans les nouvelles variétés inscrites, celles qui présentent une résistance de type quantitatif, et d'analyser la variation du niveau de résistance en fonction des pathotypes auquel la variété est confrontée. Les lignées et variétés à évaluer ont été confrontées aux pathotypes P3, P4 et P5 dans des essais séparés, au champ, réalisés par Arvalis à Boigneville en 2009, 2010 et 2011. Une grande partie du matériel testé a présenté des niveaux de résistance intéressants par rapport au témoin sensible Ecrin (Figure 3). Par ailleurs cette étude montre que pour certaines variétés, le niveau de résistance peut varier fortement en fonction du pathotype : par exemple Altigo est complètement résistant à P4, assez résistant à P3, et un peu moins à P5.

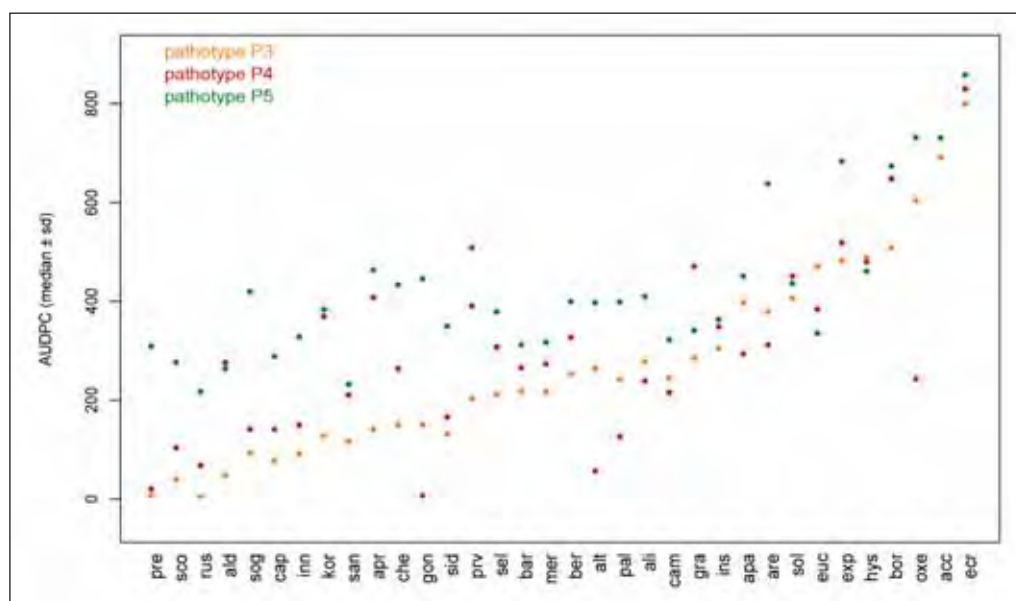


Figure 3 : Niveau de résistance quantitative à la rouille brune, mesuré par l'aire sous la courbe de progression de la maladie (AUDPC), moyenne de 3 années d'essai au champ (2009, 2010, 2011), d'une série de variétés vis-à-vis de 3 pathotypes différents. Décodage des variétés, dans l'ordre d'apparition sur l'axe des abscisses : Premio, Scor, Rustic, Aldric, Sogood, Caphorn, Inspiration, Koreli, Sankara, Aprilio, Chevalier, Goncourt, Sidéral, Prevert, Selekt, Barok, Mercato, Bermude, Altigo, Paledor, Aligator, Campero, Graindor, Instinct, Apache, Arezzo, Solehio, Euclide, Expert, Hystar, Boregar, Oxebo, Accroc, Ecrin.

Détection au champ de résistance partielle dans le matériel en sélection

Une pépinière comprenant des variétés témoins et 5 lignées, proposées par chacun des 12 établissements sélectionneurs partenaires (soit au total 75 entrées) comme potentiellement porteurs de résistance quantitative, a été implantée en 11 lieux, et inoculée avec le pathotype P5, en 2009 et en 2010. Les notations ont été réalisées par chaque partenaire indépendamment, et l'ensemble des notations rassemblées dans un fichier diffusé à tous les partenaires. Chaque participant dispose ainsi de deux années d'évaluation au champ du niveau de résistance quantitative de ce matériel. Les lignées et variétés présentant un niveau intéressant de résistance partielle sont indiquées dans le Tableau 4. Les autres lignées de la pépinière se sont comportées soit comme sensibles ou très sensibles, soit comme très résistantes. Dans ce dernier cas on peut émettre l'hypothèse que la résistance totale observée pourrait être due à un ou plusieurs facteurs de résistance spécifique, non contourné(s) par le pathotype utilisé.

Résistance quantitative élevée		Résistance quantitative moyenne	
Flaubert	PBI-04-0006	Aciento	Soissons
Prevert	Premio	Altigo	Hekto
Albiano	RE04073	Andalou	Trémie
Aldric	RE05043	Apache	UN 239
Camp-Rémy	Rustic	Arlequin	
CCB07H004	Goncourt	Barok	
CCB08H012	SO821	Chevron	
CF99102	Solehio	FD 06012	
Génial	Solution	Menestrel	
LD 00170-3	SUR.233	Mercato	
Tulip	UN 112	MH07.17	
NSA07-0788	Verlaine	Aramis	
33355 HT12	Instinct	Occitan	
Bermude	Koreli	Volontaire	
CCB08H020		Sirtaki	

Tableau 4 : Lignées et variétés ayant exprimé un niveau de résistance quantitative à la rouille brune significatif dans les essais au champ (11 lieux) en 2009 et 2010, vis-à-vis du pathotype P5.

3. Conclusion Générale - Perspectives

En associant au sein de ce projet l'ensemble des partenaires impliqués dans l'étude des populations pathogènes et de la génétique de la plante hôte, nous avons caractérisé pour la première fois la résistance quantitative à la rouille brune du blé d'un ensemble de variétés et lignées issues du matériel français utilisé en sélection. Si cela avait déjà été fait pour le matériel de sélection d'autres régions du monde (par exemple, au CIMMYT), notre travail vient combler un vide important, visant à élargir l'utilisation de la résistance quantitative dans la sélection variétale française. La principale conclusion de notre étude est que le matériel proposé par les sélectionneurs français contient une grande diversité phénotypique pour la résistance quantitative à la rouille brune, ce qui donne de bonnes bases pour sélectionner des résistances plus durables.

La stabilité de ces sources de résistance a été évaluée en les confrontant à des pathotypes combinant de nombreuses virulences, et représentatifs des divers niveaux d'agressivité présents dans les populations pathogènes actuelles. Partant de l'hypothèse que l'exercice de contraintes diversifiées sur le pathogène devrait ralentir son adaptation et augmenter la

durabilité de la résistance, nous avons évalué la diversité des sources de résistance proposées, en les caractérisant pour leurs composantes s'exerçant sur les différentes étapes du cycle infectieux du parasite. La mesure précise des composantes exigeant des expérimentations en serre, nous avons conduit en parallèle une évaluation du niveau de résistance au champ des génotypes étudiés, afin d'analyser la cohérence entre résultats en serre et au champ : elle s'est avérée très bonne pour les composantes période de latence, taille de lésion et sporulation par unité de surface sporulante.

A partir des parents Apache et Balance, pour lesquels une population de cartographie était déjà disponible, nous avons pu cartographier 13 QTLs. Toutefois le niveau de saturation de la carte génétique étant insuffisant pour obtenir des marqueurs suffisamment proches des QTLs, une cartographie plus fine doit être réalisée sur cette population. Les partenaires ayant poursuivi depuis 2007 sans interruption un travail de fond de construction de populations de cartographie, nous disposons à présent des connaissances et du matériel nécessaire pour identifier dans les deux prochaines années des marqueurs pour un panel de QTLs diversifiés de résistance à la rouille brune, qui seront exploitables en sélection assistée par marqueurs.

Références bibliographiques

Azzimonti G., Lannou C., Sèche I., Goyeau H. (2013) Components of quantitative resistance to leaf rust in wheat cultivars: diversity, variability and specificity. *Plant Pathology*, sous presse.

Goyeau H., Lannou C. (2011) Specific resistance to leaf rust expressed at the seedling stage in cultivars grown in France from 1983 to 2007. *Euphytica* 178, 45-62.

Kolmer J.A. (1996) Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annual Review of Phytopathology* 34: 435-455

Kolmer J.A. (2001) Molecular polymorphism and virulence phenotypes of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* in Canada. *Can. J. Bot.* 79, 917-926.

Krattinger S.G., Lagudah E.S., Spielmeier W., Singh R.P., Huerta-Espino J., McFadden H., Bossolini E., Selter, L., Keller B. (2009) A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science Express*.

Pariaud B., Robert C., Goyeau H., Lannou C. (2009) Aggressiveness components and adaptation to a host cultivar in wheat leaf rust. *Phytopathology* 99, 869-878.

Parlevliet J.E. (1988) Identification and evaluation of quantitative resistance. *Plant Disease Epidemiology*. K. J. Leonard and W. E. Fry. New York, Mc Graw-Hill. II: 215-248.

Singh R.P., Mujeeb-Kazi A., Huerta-Espino J. (1998) *Lr46*: A gene conferring slow-rusting resistance to leaf rust in wheat. *Phytopathology* 88, 890-894.

Singh R.P., Huerta-Espino J., Rajaram S. (2000) Achieving near-immunity to leaf and stripe rusts in wheat by combining slow rusting resistance genes. *Acta Phytopathol. Entomologica Hung.* 35, 133-139.

Singh R.P., Huerta-Espino J., Williams H.M. (2005) Genetics and breeding for durable resistance to leaf and stripe rusts in wheat. *Turk J Agric For* 29, 121-127.

Evaluation de la résistance du blé à la septoriose provoquée par *mycosphaerella graminicola*

David GOUACHE¹, Delphine HOURCADE^{*2}, Marc-Henri LEBRUN³, Thierry MARCEL³, Lilian GOUT³, Aurélie DUCASSE³, Sian DELLER³, Colette AUDEON³, Henriette GOYEAU³, Frederic SUFFERT³, Christophe MICHELET⁴, Olivier ROBERT⁵, Valerie CADOT⁶, SMT Ghaffary⁷, Gert HJ Kema⁷

* Coordinateur : Delphine HOURCADE, d.hourcade@arvalisinstitutduvegetal.fr, Tél. : 01.64.99.23.33

1 - Arvalis - Institut du Végétal. IBP Université Paris Sud, rue de Noetzelin, Bât. 630, 91405 Orsay, France, david.gouache@rdto.nestle.com

2 - Arvalis - Institut du Végétal. Station Expérimentale. 91720 Boigneville, France

3 - INRA - UR1290 BIOGER-CPP, 78850 Thiverval Grignon, France

4 - RAGT 2n - Station de recherche RAGT 2n S.A.S., Route d'Epincy - 28150 Louville la Chenard, France

5 - BIOPLANTE - Florimond Desprez, BP41, 59242 Cappelle en Pévèle, France

6 - GEVES - 25 Rue Georges Morel - CS 90024 - 49071 BEAUCOUZE Cedex - France

7 - Plant Research International B.V. - P.O. Box 16, 6700 AA Wageningen, The Netherlands

1. Introduction

La septoriose du blé tendre (*Triticum aestivum*), causée par *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*), est une des maladies économiquement les plus importantes en France. Elle se caractérise par sa présence généralisée sur le territoire et sa nuisibilité élevée, pouvant atteindre plus de 50 q/ha dans les situations les plus exposées (Jorgensen *et al.* 2008). Le contrôle de la septoriose s'appuie essentiellement sur la lutte chimique, avec la réalisation de 1 à 3 traitements, qui contribuent en moyenne à approximativement la moitié de l'investissement en fongicides sur blé (Maumené, communication personnelle). La première méthode de lutte complémentaire est l'emploi de variétés résistantes qui permet de réduire l'investissement fongicide de l'ordre de 20 €/ha (Jorgensen *et al.* 2008), soit un tiers à un quart. Toutefois, caractériser les résistances variétales vis-à-vis de la septoriose est une tâche complexe, comme l'ont constaté de nombreux auteurs en France (Bernicot, 2006) et dans le monde (van Ginkel et Rajaram, 1999 ; Goodwin, 2007). Dans sa revue, Goodwin (2007) rappelle ainsi le propos de Nelson et Marshall de 1990 : « en comparaison aux autres maladies du blé, comme les rouilles, peu de progrès ont été réalisés en matière de résistance variétale aux septorioses ». Malgré l'accélération significative des recherches, Goodwin inventoriait 12 gènes de résistance, dits *Stb*, en 2007. Même en tenant compte de la mise à jour de l'inventaire par Cuthbert (2011) auquel se rajoutent les travaux de Ghaffary *et al.* (2011, 2012), 18 gènes *Stb* sont identifiés aujourd'hui, à comparer aux 73, 89, 61 et 95 pour la rouille jaune, rouille brune, rouille noire et oidium, respectivement (Ghaffary *et al.*, 2011).

Van Ginkel et Rajaram (1999) puis Goodwin (2007) explicitent les nombreuses difficultés : grande diversité génétique du pathogène (Zhan *et al.* 2002, 2003), difficulté à mettre en évidence des interactions spécifiques (van Ginkel et Scharen, 1987), et surtout, les difficultés à phénotyper de manière stable et répétable le comportement des génotypes, que ce soit en conditions contrôlées (Bockus 2007) ou au champ, du fait d'un grand nombre de facteurs interagissant avec la progression épidémique comme la précocité, la hauteur des plantes, et d'autres encore (Gouache *et al.*, 2009 ; Arraiano *et al.*, 2009).

Les travaux que nous décrirons sont : la recherche des gènes *Stb* connus dans 58 cultivars français via des tests pathologiques et la présence de marqueurs moléculaires associés, la

caractérisation phénotypique et moléculaire des populations françaises de septoriose, la mise au point et l'exploitation d'outils d'étude de la résistance partielle, et la mise au point de protocoles de phénotypage de la résistance adulte pour les études de génétique d'association. Des travaux ont également été réalisés sur la mise au point et l'exploitation de méthodes de qPCR et la correction du biais de précocité dans les essais en contamination naturelle.

2. Caractérisation moléculaire et phénotypique de la résistance spécifique

La résistance spécifique à *M. graminicola* est pratiquement totale, oligogénique, et gouvernée par une relation gène-pour-gène (Brading *et al.*, 2002). Nous avons caractérisé 58 variétés et lignées de sélection pour les gènes *Stb1* à *Stb15* par le biais de tests d'inoculation avec des souches différentielles sur plantules.

► Matériel et méthodes

Recherche des gènes Stb dans les cultivars français

La réalisation des tests sur plantule est décrite en détail dans Ghaffary (2011). Il s'agit d'inoculer des plantules entre l'émergence et le stade 2 feuilles, avec une série de souches présentant des profils de virulence différenciés, permettant de postuler la composition des variétés en gènes *Stb*. Chaque expérimentation a été répétée 2 fois. Les souches utilisées sont présentées ci-dessous (Tableau 1).

Souche	Provenance		Souche	Provenance	
	Pays	Lieu		Pays	Lieu
323	Netherlands	W.Brabant	90015	Peru	Inconnu
88004	Ethiopia	Kulumsa	9007		
98051	France	Villaines la Gonais	2166	Iran	Dezful, Safi Abad
94218	Canada	Saskatoon	99031	France	Beauce
98042			9008		
90006	Mexico	Toluca	98050	France	St. Pol de Léon
98022	France	Villaines la Gonais	95054	Algeria	Berrahal
98033	France	Capelle-en-Pévèle	99018	France	Beauce
86013	Turkey	Adana			
92034	Algeria	Guelma			

Tableau 1 : Liste des souches utilisées pour évaluer la présence des gènes *Stb*

Test des marqueurs moléculaires disponibles

Les marqueurs moléculaires disponibles ont ensuite été testés : ils sont présentés Tableau 2 (modifiée de Goodwin, 2007).

Dans un premier temps, l'amplification des marqueurs a été testée sur une liste de variétés de référence, quand elles étaient connues et disponibles, (Tableau 3) pour valider qu'ils fournissent bien les informations attendues. Ensuite, ils ont été testés sur 54 des 58 variétés du panel phénotypé, si les résultats obtenus sur les variétés de référence le permettaient.

► Résultats

La recherche des gènes *Stb* a permis de montrer que seul *Stb6* est présent de manière régulière dans les variétés françaises : il se retrouve dans 28 des 58 cultivars testés. Ce résultat est peu surprenant, Arraiano et Brown (2006) ayant montré qu'il était largement présent dans tout le matériel européen. Ce gène est à priori peu intéressant au champ, car les souches échantillonnées en France (et dans le monde) par l'équipe du PRI contournent cette résistance (Ghaffary *et al*, 2008). D'après le test effectué, aucune des 58 variétés ne semble posséder les gènes *Stb1*, *Stb5*, *Stb10*, *Stb11*, *Stb12*, et *Stb15*. *Stb2*, *Stb3*, *Stb4* et *Stb8* ont été mis en évidence une seule fois chacun, *Stb9* trois fois et *Stb7*, *Stb13*, et *Stb14* quatre fois. Dans les variétés ainsi identifiées, seuls *Stb2*, *Stb4* et *Stb8* sont présents dans du matériel connu pour sa résistance au champ en France. Pour les autres gènes, l'absence de lien avec un comportement de résistance connu peut s'expliquer par 2 phénomènes : soit par l'existence de la virulence correspondante dans les souches françaises, ce qui semble être le cas pour *Stb7* et *Stb9* (Ghaffary *et al*, 2008), soit par des différences entre résistance au stade plantule et résistance au stade adulte (Kema et van Silfhout, 1997). Un dernier point important est la sensibilité à toutes les souches inoculées de plusieurs variétés connues pour leur forte résistance au champ, comme Toison dor, Boisseau, Koreli ou Maxwell. Ceci indiquerait qu'il existe chez ces variétés une résistance adulte, que les inoculations au stade plantule ne permettent pas de mettre en évidence.

Du côté des marqueurs moléculaires, nombre d'entre eux ne semblent pas directement utilisables sur le matériel élite français. Les résultats d'amplification obtenus pour les marqueurs de *Stb1*, *Stb6* et *Stb8* sur les variétés de référence ne sont pas cohérents avec les données de la littérature. Pour les autres, du polymorphisme a été détecté à ces marqueurs,

mais sans lien clair avec les résultats de phénotypage. Ceci est peu surprenant, vu que ces marqueurs ont été obtenus sur du matériel généralement « exotique ». Néanmoins, les marqueurs disponibles pour *Stb2*, *Stb3* et *Stb4* semblent prometteurs. Le marqueur pour *Stb2* est bel et bien présent dans la variété Sankara, seule variété dans laquelle ce gène a été identifié. A noter que le même profil moléculaire a été obtenu sur la variété Trémie, qui elle, ne le porte pas. Pour *Stb3*, seule Haussmann possède ce gène d'après les tests, et le résultat d'amplification du marqueur associé à ce gène indique également sa présence. 25 autres variétés possèdent ce marqueur, et bien que le gène *Stb3* n'y ait pas été identifié, plus de la moitié d'entre elles sont entièrement résistantes à la souche 88004 et les autres présentent des niveaux de symptômes faibles. Enfin, Ambition, seule à posséder *Stb4* d'après les tests en gamme d'hôte, possède également les marqueurs moléculaires attendus.

► Conclusions

Le premier résultat remarquable est la faible présence des gènes *Stb* répertoriés dans le matériel élite français. Ceux-ci pourraient donc constituer des sources de résistance intéressantes pour la sélection. En considérant les connaissances sur les virulences correspondantes présentes dans les populations françaises, le comportement au champ des rares variétés élites portant les gènes *Stb*, et les premiers tests de marquage moléculaire, les gènes les plus prometteurs

Variétés	Gène de résistance
Oasis	stb1
Sullivan	stb1
Clark	stb1
Monon	stb1
Arthur	stb1
Chinese Spring	stb1
Veranopolis	stb2
Yecora Rojo	stb4
Senat	stb6
Amigo	stb6
Gene	stb6
Heines Kolben	stb6
Blé Seigle	stb6
Arine	stb6

Variétés	Gène de résistance
Armanda	stb6
Atlas 66	stb6
Bezostaya 1	stb6
Longbow	stb6
Synthetic W7984	stb8
Opata 85	stb8
Tonic	stb9
Riband	stb15
Forno	stb15
Courtot	stb9

Tableau 3 : Liste des variétés de référence disponibles utilisées pour vérifier l'amplification des marqueurs

Genre	Localisation	Marqueurs et distance au gène	Parent donneur	Stade de développement évalué
<i>Stb1</i>	5BL	barc74(2.8 cM), gwm335	Bulgaria 88	Plantule et adulte
<i>Stb2</i>	3Bs	gwm389 (0.9 cM), gwm533, gwm493	Veranopolis	Plantule
<i>Stb3</i>	7AS	wmc83	Israël 493	Plantule
<i>Stb4</i>	7DS	gwm111 (0.7 cM)	Tadinia	Plantule et adulte
<i>Stb5</i>	7DS	gwm44 (7.2 cM)	Chinese Spring (Synthetic 7D)	
<i>Stb6</i>	3AS	gwm369 (2 cM)	Senat, Flame, Kavkaz-K4500	Plantule, adulte et sur feuilles
<i>Stb7</i>	4AL	wmc313 (0.5 cM), wmc219, gwm160	Estanzuela Federal	Plantule et feuilles
<i>Stb8</i>	7BL	gwm146, gwm577	Synthetic W7984	Plantule
<i>Stb9</i>	2BL	gpw1214, gpw4044, gpw5039, wmc317, barc0129	Courtot, Tonic	Plantule
<i>Stb10</i>	1D	gwm848 (private marker)	Kavkaz-K4500	
<i>Stb11</i>	1BS	barc008 (<1cM)	TE 9111	
<i>Stb12</i>	4AL	wmc219	Kavkaz-K4500	Plantule et feuilles
<i>Stb13</i>	7BL	wmc396		
<i>Stb14</i>	3BS	wmc500 (2cM), wmc632 (5cM)		
<i>Stb15</i>	6AS	psr904 (RFLP marker)	Arina	Feuilles

Tableau 2 : Liste des marqueurs testés (modifiée de Goodwin, 2007)

semblent être *Stb4*, *Stb2* et *Stb3*. Des travaux visant à confirmer leur intérêt et à améliorer la pertinence des marqueurs, s'appuyant par exemple sur des populations recombinantes avec les variétés Ambition, Sankara, et Haussmann comme parents résistants, seraient à poursuivre.

L'autre conclusion est que le matériel élite français possède d'autres sources de résistance à la septoriose : pour mieux l'exploiter, il paraît donc très utile d'en identifier le déterminisme génétique. Des travaux de génétique d'association semblent particulièrement indiqués pour cela. Qui plus est, l'existence de résistances adultes incite fortement à ce que ces travaux de génétique d'association soient aussi conduits avec du phénotypage au champ. Nous y reviendrons plus loin.

3. Caractérisation moléculaire et phénotypique des populations françaises de septoriose

La compréhension des facteurs impliqués dans l'évolution de ces populations est importante pour évaluer l'efficacité potentielle des stratégies de lutte, génétique en particulier (McDonald, 1997). La caractérisation des populations à l'aide des premières générations de marqueurs moléculaires a permis de mieux comprendre la structure génétique des populations de *M. graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) (Zhan *et al.* 2003). Néanmoins, ceux-ci n'ont pas permis d'établir de lien avec les évolutions phénotypiques : dans les populations d'Orégon, alors qu'aucune trace de sélection n'a été détectée à l'aide de marqueurs neutres RFLP, les études au champ et en serre ont montré une sélection pour une augmentation de la virulence et de l'agressivité au cours de la saison (Chen *et al.*, 1994, McDonald *et al.*, 1996, Mundt *et al.* 1999). De plus, des gènes de résistance spécifiques *Stb* ont déjà été contournés avec l'apparition de souches virulentes (Cowger *et al.* 2000 et 2002). Le projet a donc visé à améliorer la connaissance des souches de septoriose françaises. En effet, la population française caractérisée pour ses virulences (Ghaffary *et al.*, 2008) correspond à un échantillonnage restreint. La caractérisation sur la base de marqueurs neutres d'une autre population, plus vaste, (El Chartrouni, 2011) l'a été sur un faible nombre de marqueurs. Nous avons donc, premièrement, contribué à l'élaboration d'un panel de marqueurs moléculaires, deuxièmement, établi un vaste échantillonnage de souches de septoriose françaises, troisièmement, analysé une partie de la population échantillonnée grâce au panel de marqueurs, et enfin, pathotypé les souches pour leurs virulences.

► Matériel et méthodes

Mise au point des panels de marqueurs microsatellites

Ce projet auquel les partenaires FSOV collaborent (G Kema, TC Marcel) a été mis en place par l'équipe AMAR (J Confais, A-S Walker) et la plateforme de génotypage (A Gautier) de l'INRA BIOGER-CPP, initialement dans le cadre d'un projet financé depuis 2009 par le département SPE de l'INRA (collaboration avec Arvalis pour la fourniture des échantillons) et visant à caractériser les pressions de sélection exercées par les fongicides dans les populations de septoriose. Vingt quatre marqueurs microsatellites répartis sur les 21 chromosomes de *M. graminicola* ont été sélectionnés parmi les marqueurs publiés (Owen *et al.* 1998

; Goodwin *et al.* 2007) et parmi un set de 3728 nouveaux marqueurs identifiés suite à une recherche bioinformatique systématique du génome de la souche IPO-323 récemment séquencée (Goodwin *et al.*, 2011). Les positions des nouveaux marqueurs ont été comparées à celles des gènes prédits sur le génome de *M. graminicola* afin de ne sélectionner que des microsatellites présents dans les régions codantes. La sélection des marqueurs s'est également faite à partir de la gamme de taille des allèles et du polymorphisme connus des marqueurs. Un protocole a été mis au point afin d'amplifier les 24 marqueurs microsatellites en 3 panels de 8 marqueurs dont les amorces ont été multiplexées avant PCR. Les panels 1 et 2 correspondent à des marqueurs cartographiés sur les chromosomes 1 à 13 (« chromosomes fondamentaux ») et le panel 3 à des marqueurs cartographiés sur les chromosomes 14 à 21 (« chromosomes dispensables »). Pour chaque multiplex une paire d'amorces amplifiant un gène très conservé (peu ou pas de polymorphisme) de *M. graminicola* a été ajouté afin d'avoir une amplification contrôlée. Afin de valider les trois panels de marqueurs microsatellites ainsi constitués une collection de 130 isolats, représentant la diversité mondiale de *M. graminicola*, a été génotypée.

Echantillonnage des souches françaises

Au cours des années 2009 à 2011, 2 échantillonnages ont été réalisés. Le premier a été réalisé dans les essais variétaux d'Arvalis et du Geves, sur les parcelles non-traitées des variétés Apache et Premio. Un échantillonnage hiérarchique, de 5 zones par parcelle et 3 feuilles (F1, ou F2 si aucune pycnide n'était présente sur F1) par zone. Par ailleurs, un second échantillonnage, également dans des essais variétaux, a été conduit sur une plus grande diversité de variétés, présentant différents niveaux de résistance au champ : Apache, Premio, Caphorn, Sankara, Dinosaur.

Génotypage des souches

Les panels 1 et 2 de marqueurs microsatellites correspondant à des marqueurs cartographiés sur les 13 premiers chromosomes ont été utilisés pour génotyper 774 isolats de l'ensemble de la collection constituée (n=1772) afin d'en étudier le niveau de diversité et la structure génétique. Le type sexuel des 774 isolats (MAT1-1 ou MAT1-2) a également été déterminé à l'aide du protocole publié par Waalwijk *et al.* (2002). La collection a été subdivisée en sous-collections, chaque sous-collection correspondant à des isolats collectés la même année, sur un même cultivar, sur une même parcelle. Les sous-collections présentant un nombre d'isolats suffisant (>30) et respectant la hiérarchie de l'échantillonnage ont été retenues pour les analyses génétiques. Du premier échantillonnage, 17 sous-collections ont été retenues et 421 isolats génotypés. Du second échantillonnage, 15 sous-collections ont été retenues et 353 isolats génotypés. Le nombre d'isolats génotypés par sous-collection est compris entre 17 et 29, avec en moyenne 24,2 isolats par sous-collection.

Pathotypage des souches

150 souches monospores parmi la collection ont été retenues pour les analyses phénotypiques. Ce pathotypage a été réalisé avec le même protocole que celui décrit pour la postulation des gènes *Stb* décrit ci-dessus. Les souches sont confrontées à 22 cultivars différentiels portant un ou plusieurs gènes *Stb* plus 2 variétés témoins de sensibilité. Les résultats présentés sont issus de la moyenne de 2 répétitions.

► Résultats

Validation des panels de marqueurs microsatellites

Une collection de 130 isolats représentant la diversité mondiale de *M. graminicola* a été génotypée avec les 3 panels de marqueurs microsatellites multiplexés. Les résultats de cette analyse montrent que les niveaux de variabilité génétique (nombre et fréquence des différents allèles) de ces microsatellites sont très hétérogènes. Les microsatellites possèdent de 2 à 28 allèles et ont des niveaux de diversité génique (uH) compris entre 0.085 et 0.920. La plupart des microsatellites présente un ou deux allèles majoritaires dans la collection, à l'exception de 3 marqueurs localisés sur des chromosomes dispensables. Enfin, un nombre important d'individus présente des allèles nuls (absence d'amplification) pour les 8 microsatellites du panel 3 (localisés sur les chromosomes dispensables), indiquant que le chromosome correspondant est certainement absent.

Echantillonnage des souches françaises

L'échantillonnage en 2009 a été le plus intensif, aboutissant à plus de 900 souches disponibles pour la 1^{ère} étude et plus de 300 pour la seconde. En 2010, l'effort d'échantillonnage a été plus ciblé, et a abouti tout de même à plus de 350 souches pour chacune des 2 études. Le bilan de la collection 2011 est en cours. La Figure 1 détaille l'origine de l'ensemble des différentes souches collectées.

Génotypage des souches

Les 774 isolats français sont répartis en 32 sous-collections différenciées selon le lieu, le cultivar et l'année de collecte. Par soucis de simplicité, ces sous-collections seront appelées « populations » ci-après. Globalement, le ratio des types sexuels de 408 MAT1-1 : 357 MAT1-2 n'est pas significativement différent d'un ratio 1:1. Parmi les 774 isolats, 584 haplotypes différents ont été identifiés, indiquant une proportion globale d'haplotypes uniques de 75% dans ces populations. Après correction pour la fraction clonale, 592 isolats ont été conservés pour les analyses de diversité et de distances



Figure 1 : Carte de l'origine des différentes souches collectées en 2009 et 2010

génétiques. La diversité génique moyenne observée est égale à 0.458, et varie dans chaque population de 0.372 à 0.519. D'autre part, une première analyse des distances génétiques de Nei montre que les 32 populations ne sont pas ou peu différenciées entre elles. Seules les deux populations du Sud de la France se distinguent d'abord pour avoir la diversité génique la plus élevée, mais leur échantillonnage ayant été réalisé de manière légèrement différente, ce résultat est à confirmer.

Pathotypage des souches

La caractérisation phénotypique de la collection a révélé, qu'au stade plantule, il existe en France des isolats virulents sur tous les gènes *Stb* testés. Cependant, les gènes *Stb1* à *5* restent intéressants, *Stb5* et *Stb3* étant les plus efficaces en France (c.-à-d. moins de 35% des isolats sont virulents). Ceci confirme les observations faites sur la population historique de 1988. Au contraire, les gènes *Stb13+14*, *Stb7*, *Stb9* et *Stb15* ne sont efficaces que très rarement (c.-à-d. plus de 90% des isolats sont virulents). Il est également intéressant de noter que la combinaison de gènes de résistance individuellement peu efficaces augmente significativement le niveau de résistance de lignées testées, notamment en ce qui concerne les gènes *Stb6*, *Stb11* et *Stb18*. La caractérisation phénotypique des isolats n'a révélé aucune structure particulière de la collection liée à la région ou au cultivar d'échantillonnage des isolats.

L'analyse des données préliminaires de pathotypage des souches semble montrer qu'il n'y a pas de structuration du comportement de celles-ci par rapport à la provenance - régionale ou variétale - des isolats.

► Conclusions

Afin de mieux connaître les populations de *M. graminicola* présentes en France nous avons constitué une collection exceptionnelle de 1772 isolats échantillonnés de manière hiérarchique dans plusieurs bassins de production et sur des variétés aux niveaux de résistance contrastés. Nous avons mis au point un protocole de génotypage des isolats ayant vocation à être mis à la disposition de la communauté scientifique. Son utilisation a permis de conclure que la reproduction sexuée joue un rôle prépondérant, que la diversité au sein de ces populations est élevée, et qu'il n'existe qu'une faible différenciation génétique entre celles-ci, en concordance avec plusieurs autres études (Linde *et al.* 2002, Zhan *et al.* 2002, Zhan *et al.* 2003, El Chartouni *et al.* 2011). L'étude phénotypique systématique des virulences vis-à-vis des gènes *Stb* d'une population aussi vaste de souches de *M. graminicola* constitue à notre connaissance une première. Les résultats, montrent que certains gènes *Stb* sont efficaces face aux populations françaises. Ils montrent également qu'une stratégie visant à combiner les gènes de résistance à la septoriose dans les cultivars de blé pourrait être efficace. Ils montrent aussi que certaines souches semblent posséder un spectre de virulences complet vis-à-vis de l'ensemble des gènes *Stb*. Ces souches seront à étudier et à suivre de manière approfondie.

4. Caractérisation de la résistance partielle

Actuellement, les mesures de résistance quantitative du blé à *M. graminicola* reposent sur la mesure de la surface foliaire sporulante (lésions présentant des pycnides, Kema et van Silfhout 1997, Arraiano 2001). Mais la résistance partielle

(quantitative) peut agir en réduisant d'autres composantes du cycle épidémique : efficacité d'infection, période de latence, taille des lésions nécrotiques/sporulantes, quantité de spores produites par lésion, induction de la sénescence, capacité de restauration et vitesse d'épuisement des pycnides (Cowger *et al.* 2002, Eyal et Brown 1976, Gough 1978, Lovell *et al.* 2004, Viljanen-Rollinson 2005).

► Matériel et méthodes

Une technique d'inoculation localisée de *S. tritici* (échelle foliaire, environ 2 cm²) a été mise au point. Elle permet de produire des lésions de septoriose sur plantes adultes en serre (conditions optimales retenues : dose inoculum 105 spores ml⁻¹, application au pinceau, incubation par ensachage pendant 72 h). L'évolution des symptômes a été réalisée par notations visuelles au rythme de deux par semaine (soit une cinétique de développement épidémique à plus de 15 points). Une technique non destructive de collecte de pycnidiospores par mise en solution aqueuse a permis d'estimer la dynamique de sporulation.

L'ensemble des paramètres de la dynamique d'apparition et d'évolution des symptômes (surface chlorotique, surface nécrotique, surface sporulante, dénombrement de pycnides) a été analysé par ajustements non linéaires (modèle Logistique/Gompertz) et conduit à la définition d'une quinzaine de variables épidémiologiques élaborées, accessibles seulement après modélisation des cinétiques. De plus, le potentiel de sporulation d'une cohorte de pycnides (quantité de spores libérée), la capacité de restauration d'une lésion (capacité à produire et libérer des spores au fur et à mesure de son vieillissement) et sa dynamique d'épuisement sont en cours d'analyse par une modélisation de la dynamique temporelle de sporulation.

Ce dispositif expérimental a été déployé sur 4 variétés (Apache, Soissons, Caphorn, Koreli croisées avec 4 souches de septoriose - 3 locales et IPO323) et répété deux fois. Lors de la seconde répétition, les variétés Premio, Balance, Capelle, Toison d'Or et Barok ont été rajoutées au dispositif.

Parallèlement, un travail de mise au point de méthodes sensibles et robustes de quantification de l'ADN de *M. graminicola* dans les feuilles de blé infectées en utilisant différents gènes cibles a été conduit, afin de les comparer aux méthodes existantes.

Plus précisément nous avons ciblé des gènes nucléaires présents soit en copie unique (isoméro-réductase, ILV5), soit en copie multiples (ADN ribosomique, IGS ; transposon, TF6) dans le génome de *M. graminicola*. Nous avons comparé ces méthodes avec celles qui sont les plus utilisées pour *M. graminicola*, c'est-à-dire un gène nucléaire en copie unique (beta-tubuline, TUB1) et un gène mitochondrial en copies multiples (CYTB) pour leur sensibilité, leur spécificité, et leur conservation au sein des populations de *M. graminicola*.

Pour tester ces méthodes, nous avons analysé des données issues d'expérimentations déjà disponibles à Arvalis, et les données de l'essai 2009 (Gouache *et al.*, 2009). L'ensemble des expérimentations mobilisées ont été suivies avec des cinétiques d'observation de symptômes nécrotiques et de mesure de biomasse fongique par qPCR. Les expérimentations historiques et le protocole qPCR, réalisé en prestation par l'Institut Lasalle-Beauvais, sont décrits plus en détail dans (Gouache *et al.* 2009, « La pcr quantitative : un potentiel à creuser pour la prevision du developpement des symptomes de septoriose » présenté à l'AFPP). Les données publiées (Rohel *et al.* 2002, « Quantitative PCR

monitoring of the effect of azoxystrobin treatments on *Mycosphaerella graminicola* epidemics in the field », Pest Management Science) ont également été utilisées.

► Résultats

Concernant l'évaluation de la résistance partielle par phénotypage, l'analyse des corrélations entre la quinzaine de variables épidémiologiques élaborées a permis de retenir un nombre plus restreint de variables comme composantes principales d'agressivité (Tableau 5). L'analyse en cours des résultats indique des interactions significatives entre souches et variétés pour plusieurs de ces paramètres, révélant de probables résistances partielles. Enfin, des corrélations positives entre composantes d'agressivité ont été mises en évidence. Par exemple, entre dynamique des symptômes et capacité de sporulation (Figure 2). De plus, aucune corrélation négative, indicatrice de trade-offs entre composantes à l'échelle du monocycle infectieux, n'a été mise en évidence.

Variable	Signification biologique
Temps du pic de chlorose	Période d'incubation
Temps pour que sporulation atteigne 5% de sporulation maximale	Période de latence
Surface sporulante finale (%)	Sévérité d'attaque
Temps pour que nécrose atteigne 50% de nécrose finale	Vitesse de développement
Vitesse de développement de la surface nécrosée	
Densité de pycnides	Capacité de sporulation
Nombre de spores / pycnide	

Tableau 5 : Variables épidémiologiques retenues pour caractériser la résistance partielle

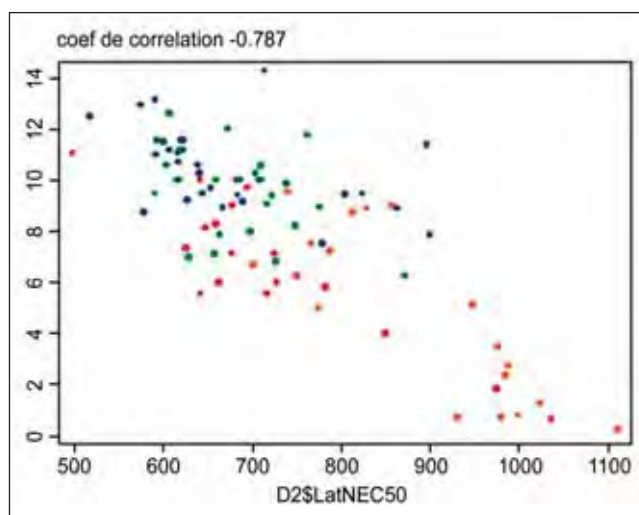


Figure 2 : Densité de pycnides en fonction du temps thermique (base 0°C) pour atteindre 50% de la surface nécrosée finale

Parallèlement, au niveau développement de méthode qPCR, celle utilisant la cible TF6 semble la plus adaptée à la quantification de *M. graminicola* dans les feuilles de blé infectée. En effet, cette méthode combine une très bonne spécificité et une bonne sensibilité (cf Table ci-dessous), et il ne semble pas y avoir de différences importantes dans les séquences cibles entre isolats, car nous avons obtenu les mêmes valeurs d'amplification quel que soit l'isolat de *M. graminicola* utilisé. TF6 correspond à une famille de

transposons présents en environ 50 copies dans le génome, et il est vraisemblable que les différentes copies de cette famille soient relativement bien conservées entre isolats. Les méthodes utilisant l'IGS et CYTB sont aussi très performantes, car elles sont très sensibles et ne semblent pas présenter de variations au sein de *M. graminicola* (Tableau 6). Leur manque de spécificité vis-à-vis de *S. passerinii* ne semble pas être un problème. En effet, cette espèce est spécifique de l'orge et ne provoque pas d'épidémies sur le blé. De plus, les valeurs obtenues avec TF6, IGS et CYTB dans le cas des feuilles infectées aux

champs sont similaires. Ce résultat montre que le manque relatif de spécificité d'IGS et CYTB ne semble pas poser de problème avec ces échantillons complexes susceptibles de contenir d'autres champignons que *M. graminicola*. La méthode utilisant TUB1 est très spécifique, mais peu sensible. De plus, il existe une certaine variabilité dans ce gène au sein des populations de *M. graminicola*. Pour continuer à utiliser cette méthode, il sera nécessaire de définir de nouveaux oligonucléotides en identifiant des séquences conservées entre les allèles TUB1 des différents isolats de *M. graminicola*.

Gène	IGS	TF6	CYTB	ILV5	TUB1
Cible	copies multiples nucléaires	copies multiples nucléaires	copies multiples mitochondriales	copie unique nucléaire	copie unique nucléaire
Sensibilité	++	+	+	--	--
Spécificité	--	++	+/-	--	++
Variabilité chez <i>M. graminicola</i>	non	non	non	non	oui
Détection dans les échantillons environnementaux	++	++	++	+/-	+/-

Tableau 6 : Comparaison des méthodologies utilisées pour la détection de *M. graminicola*

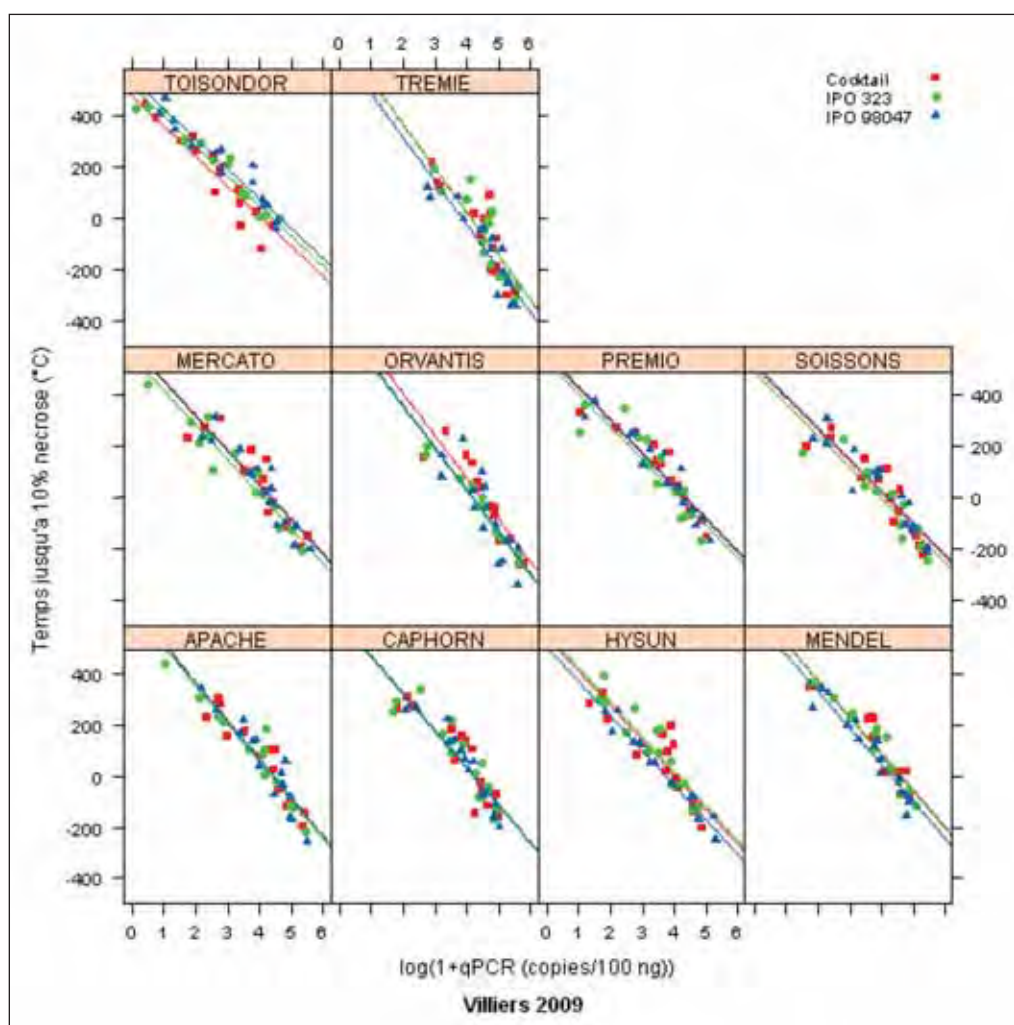


Figure 3 : Temps thermique (degrés-jours base 0) entre la date de prélèvement et la date de 10% de symptômes nécrotiques en fonction de la quantité de biomasse fongique estimée par qPCR à la date de prélèvement.

Lien entre biomasse fongique quantifiée par qPCR et symptômes

L'hypothèse de travail est qu'il existe une relation robuste entre la quantité de biomasse fongique et le développement des symptômes. Mais ces deux paramètres doivent être traités en tenant compte de la dynamique de la croissance mycélienne dans les feuilles infectées et de l'apparition des symptômes. Notre démarche a donc consisté, dans un 1er temps, à déterminer la date à laquelle 10% de symptômes (surface foliaire nécrotique) ont été atteints pour chaque étage foliaire étudié grâce aux notations réalisées dans chaque expérimentation. Nous avons considéré cette date comme étant le temps « zéro » de chaque cinétique de développement de symptômes, et aussi de la croissance fongique estimée par qPCR. Nous avons ensuite exploré 2 relations : premièrement, la relation entre la quantité de biomasse fongique mesurée par qPCR et le temps séparant la date du prélèvement du point zéro de la cinétique de symptômes. Ce travail, déjà réalisé sur les données historiques dans (Gouache *et al* 2009) a été réalisé sur l'expérimentation 2009. Les résultats confirment ce que nous avons déjà montré, à savoir que la qPCR permet d'anticiper sur la date future d'apparition des symptômes, mais, comme le montre la Figure ci-dessous, il semblerait que des effets souche ou variété interfèrent avec cette relation, de manière néanmoins assez légère.

Nous avons également analysé ces données sous forme de cinétique, en explorant le rapport entre les symptômes et les mesures de qPCR en fonction du temps depuis 10% de symptômes. Une relation robuste apparaît également, avec un effet « expérimentation » (Figures 4- 5 et 6).

Ces résultats laissent penser que la qPCR pourrait être un outil intéressant pour identifier des mécanismes de résistance quantitative distincts. Ainsi, la progression du champignon dans sa phase asymptotique jusqu'aux premières nécroses pourrait mettre en évidence des différences lors de sa phase de latence. Il serait aussi possible d'identifier des différences dans la relation entre biomasse fongique et les symptômes dans la phase nécrotrophe. Quelques hypothèses pourraient rendre compte de cette relation quantitative robuste entre biomasse

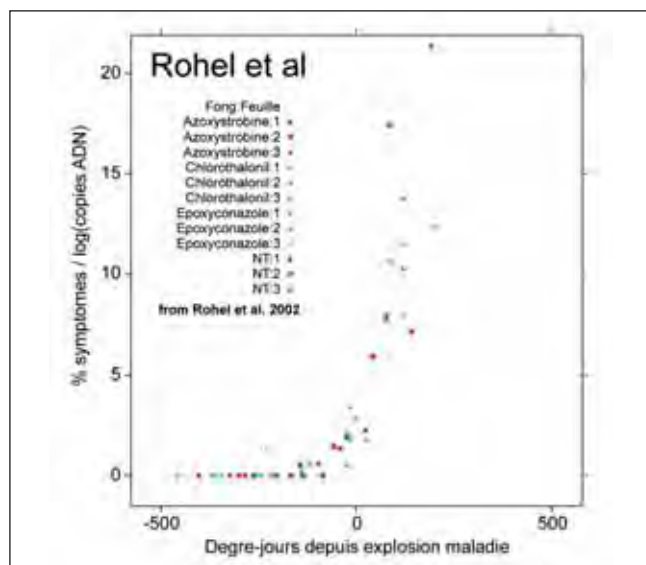


Figure 4 : Ratio symptômes nécrotiques (%) sur biomasse fongique mesurée par qPCR en fonction du temps thermique depuis l'apparition de 10% de symptômes nécrotiques sur la strate foliaire considérée : cas des expérimentations de Rohel *et al* 2002 (traitements fongicides différenciés).

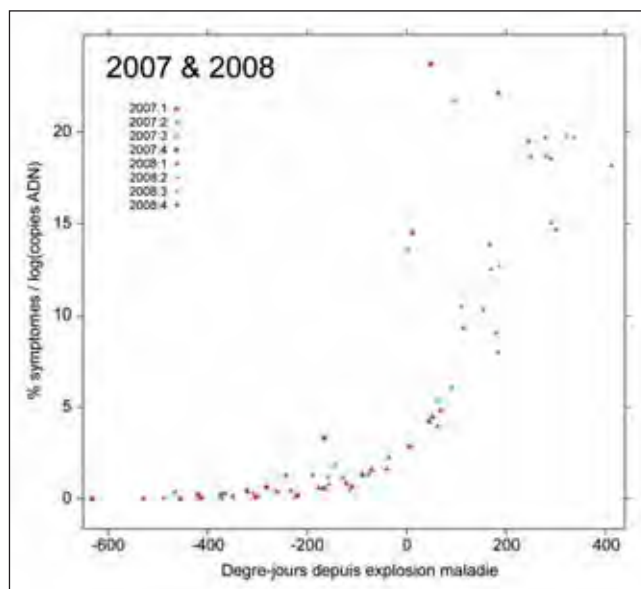


Figure 5 : Ratio symptômes nécrotiques (%) sur biomasse fongique mesurée par qPCR en fonction du temps thermique depuis l'apparition de 10% de symptômes nécrotiques sur la strate foliaire considérée : cas des expérimentations de Gouache *et al* 2007 et 2008 (variétés, dates de semis différenciées)

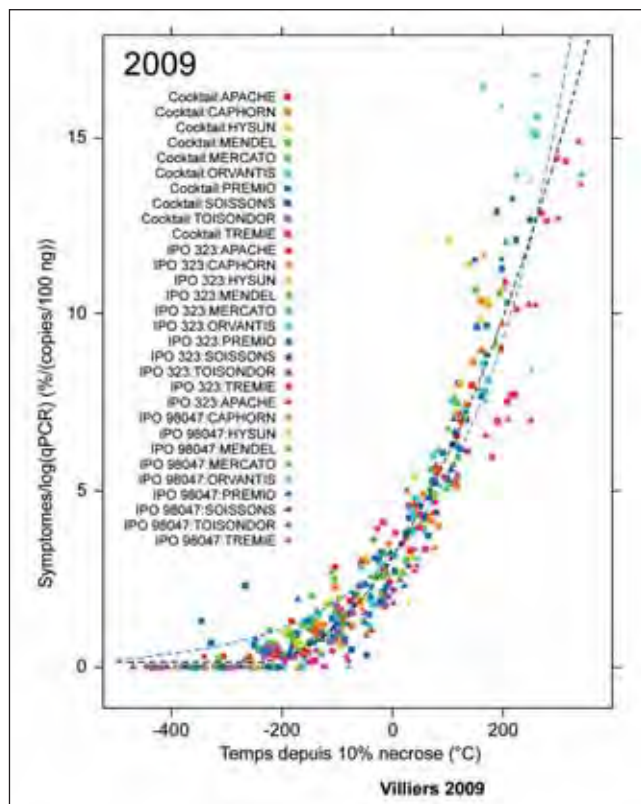


Figure 6 : Ratio symptômes nécrotiques (%) sur biomasse fongique mesurée par qPCR en fonction du temps thermique depuis l'apparition de 10% de symptômes nécrotiques sur la strate foliaire considérée : cas des expérimentations 2009 (variétés et souches inoculées différenciées)

fongique et symptômes. Premièrement, le déclenchement de la phase nécrotrophe pourrait dépendre de l'accumulation d'une certaine quantité de mycélium, ou de toxines/effecteurs sécrétés par ce mycélium, au site d'infection. Les variations autour de cette relation générale pourraient ensuite être dues aux variations de l'état physiologique des feuilles, capables de supporter une plus ou moins grande quantité de mycélium ou

d'effecteurs, et/ou à des mécanismes de résistance, et/ou au nombre de cohortes d'infections présentes sur les feuilles. Pour vérifier ces hypothèses, il est nécessaire de suivre les cinétiques de symptômes et de quantité de biomasse fongique en conditions contrôlées avec des inoculations localisées, comme les protocoles mis au point ci-après. La relation symptôme - biomasse fongique laisse aussi penser que chaque quantité de surface nécrosée ne peut servir de support qu'à une quantité limitée de biomasse fongique. Ce constat peut être interprété en terme de mécanismes de défense de la plante - la sénescence accélérée de la plante servant à limiter la quantité de champignon qui se développe - ou en termes écologiques - une unité de surface de symptômes ayant une capacité de charge maximale, et la croissance du champignon étant densité-dépendante.

► Conclusions

Une méthode expérimentale de caractérisation de la résistance partielle et des composantes d'agressivité a été mise au point pour la septoriose. Ce type de méthode a permis, sur rouille brune, de mieux comprendre les stratégies d'adaptation du pathogène et d'éclairer les questions de durabilité des résistances (Pariaud, 2008) : ces perspectives sont désormais ouvertes pour la septoriose, dont la capacité d'adaptation a été largement mise en évidence d'un point de vue génotypique, mais reste moins étudiée sur le plan de critères phénotypiques d'intérêt.

4. Caractérisation phénotypique de la résistance adulte au champ

Les résultats précédents ont montré l'intérêt de caractériser plus précisément le déterminisme génétique de la résistance adulte du matériel élite français. La génétique d'association permet de contourner un certain nombre de problèmes de la détection de QTL classique (Flint-Garcia, 2005). En particulier, dans notre cas, les marqueurs moléculaires existant ont une faible valeur diagnostique sur le matériel français. La précision des études de génétique d'association est néanmoins dépendante de la taille de la population utilisée. Phénotyper, vis-à-vis de la septoriose au stade adulte une large population pose plusieurs problèmes. En contamination naturelle, la diversité génétique des souches présentes peut rendre difficile l'analyse du déterminisme génétique du comportement des variétés. Cela induit également la nécessaire prise en compte de covariables influençant la progression épidémique, comme la hauteur des plantes, leur précocité, et d'autres paramètres architecturaux (Arraiano, 2009). Nous nous sommes donc fixé comme objectif de développer un protocole expérimental sur un panel d'association, avec une contamination contrôlée. Nous avons testé diverses approches de phénotypage, en cherchant à obtenir un maximum de précision pour l'essai. Enfin, nous nous sommes imposés une contrainte de taille de parcelles suffisamment grandes pour être compatible avec des mesures d'élaboration du rendement, ouvrant la possibilité à une caractérisation de la tolérance (Bancal *et al.*, 2012).

► Matériel et méthodes

Deux cent douze variétés et lignées ont été implantées en microparcelles de 9 m² sur le site de Plélo (48.55°N, 2.93° E) dans un dispositif à 2 répétitions, organisées en 4 sous-blocs de précocité avec 4 témoins répétés 6 fois par bloc. L'essai a été inoculé avec la souche IPO98046, souche française possédant un large spectre de virulences

(Ghaffary *et al.*, 2008), à 3 dates, les 27/04/2011, 02/05/2011 et 05/05/2011, de façon à ce que l'ensemble des variétés reçoivent de l'inoculum alors que leur dernière feuille était largement déployée, à une dose de 1010 spores/m² avec un pulvérisateur agricole.

Le développement des symptômes de septoriose a été suivi depuis la veille de la 1ère inoculation jusqu'à la sénescence complète du couvert, à intervalles d'environ une semaine, aboutissant à 8 dates d'observation. A chaque date, deux types de notations ont été réalisés. D'une part, une notation visuelle, réalisée par un seul opérateur durant toute la durée de l'expérimentation. D'autre part, le même jour, deux photos numériques par parcelle ont été réalisées. Le pourcentage de surface verte de chaque photo a été analysée à l'aide du logiciel SATVA (<http://www4.paca.inra.fr/emmah/Production-Documentation/Outils-et-modeles/SATVA>). Un indice de vert a ensuite été calculé à partir des photos pour chaque parcelle à chaque date :

$$IV_{photo} = \frac{\% \text{ Vert } (t) - \% \text{ Vert } (\text{final})}{\% \text{ Vert } (\text{max}) - \% \text{ Vert } (\text{final})}$$

Les 2 types de notation ont ensuite été analysés directement, ou après calcul de l'aire sous la courbe (AUC). Parallèlement, à chaque date, 15 feuilles des 4 derniers étages foliaires ont été prélevées, scannées, et analysées (logiciel Scanarea : <http://www4.paca.inra.fr/emmah/Production-Documentation/Outils-et-modeles/SCANAREA>), pour 8 variétés, ceci afin de valider les résultats obtenus par les photos verticales. La date d'épiaison, ainsi que des notations visuelles de rouille brune et de rouille jaune ont également été réalisées. Enfin, 15 feuilles F1 ont également été prélevées à 3 dates pour analyse par PCR quantitative, une fois avant l'inoculation, et 2 fois ensuite.

Les corrélations entre différentes approches de phénotypage ont été analysées par calcul de régressions et de coefficients de corrélation de Wald et de Kendall. Les résultats ont ensuite été analysés par analyse de variance classique, en testant l'intégration de covariables comme les notes de rouille brune et rouille jaune. Puis, des classements ont été établis avec des comparaisons multiples via le package agricolae (de Mendiburu, 2010) du logiciel R. Ceci afin de comparer le nombre de groupes significativement différents obtenus suivant le type de mesure utilisée, et suivant le choix d'utiliser une seule date de notation ou d'utiliser la cinétique.

En contamination naturelle : décorrélation précocité-septoriose

L'étude publiée par D Gouache et C Robert à l'AFPP en 2009 a permis d'établir un schéma d'hypothèses expliquant le biais induit par la précocité sur les observations de septoriose :

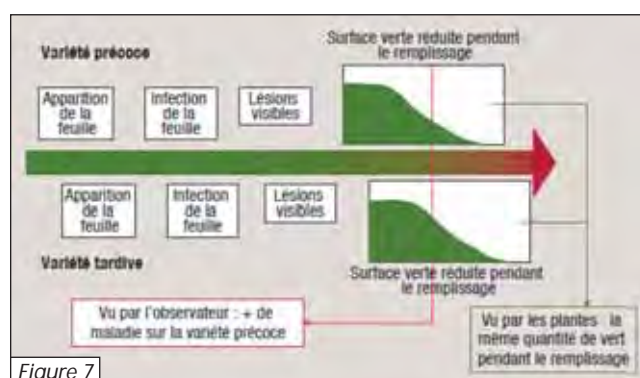


Figure 7

L'utilisation de la méthodologie proposée par Gouache & Robert (2009) en routine est apparue trop complexe par rapport à l'utilisation de la date d'épiaison comme covariable. Nous avons néanmoins souhaité mieux évaluer la pertinence de l'utilisation de cette covariable, et les conditions d'utilisation de celle-ci.

Pour ceci, les données utilisées correspondent aux essais VAT du CTPS (source : V Cadot, GEVES) de 2004 à 2009. 120 essais ont été regroupés.

► Résultats

La contamination a bien fonctionné, comme indiqué par les résultats de qPCR et le développement de la maladie, nettement plus important sur l'essai que sur un essai non-traité mais non-contaminé artificiellement présent sur le même site.

L'utilisation des données de scan a permis de valider l'indice de vert calculé avec les photos verticales. Ainsi, à une date donnée, la corrélation entre l'indice de vert obtenu par scan (moyenne pondérée des surfaces vertes des 4 étages foliaires) et celui obtenu par photo verticale est de 93%, et la corrélation entre les aires sous la courbe des 2 approches est de 83%. La corrélation entre les AUC obtenues avec les notations visuelles et l'indice photo est de 64%, validant également globalement l'approche. L'analyse des données de chaque date a permis de mieux comprendre les différences et ainsi d'identifier les forces et faiblesses de chaque approche, que nous illustrons avec 2 exemples. Pour les variétés les plus tardives, malgré les 3 dates d'inoculation, la dernière feuille n'était pas encore entièrement déployée, et a donc reçu une moindre dose d'inoculum. La notation visuelle ayant été réalisée sur cet étage foliaire, elle a sous-estimé le niveau d'attaque. Au contraire, la photo intégrant l'ensemble des strates visibles (essentiellement les 3 étages les plus hauts), ce biais n'a pas existé. A contrario, sur les variétés les plus précoces et les plus résistantes, la sénescence due aux conditions hydriques difficiles a biaisé le résultat obtenu par photographie, alors que l'œil du notateur a pu le corriger lors de la notation visuelle.

Les analyses de variance sur les données d'AUC sont présentées ci-dessous (Tableau 7).

Mesure	Effet	ddl	F-value	Pr>F	CV résiduel	ETR
AUDPC_notations	Variétés	211	15.9251	<0.0001	0.0552	2538.40
	Bloc	1	9.4204	0.0024		
	Rouille Jaune	1	0.9785	0.3236		
	Rouille Brune	1	2.9508	0.0872		
	Bloc/Sous-bloc	6	4.1188	0.0006		
AUDPC_photo	Variétés	211	13.3548	<0.0001	0.0845	24.6439
	Bloc	1	30.9015	<0.0001		
	Rouille Jaune	1	6.0004	0.0150		
	Rouille Brune	1	7.8567	0.0055		
	Bloc/Sous-bloc	6	2.4510	0.0256		

Tableau 7 : Analyses de variance des données d'aire sous la courbe de surface verte avec les notations visuelles et photographiques (AUDPC - Aire sous la courbe ; ddl - Degrés de liberté ; F-value - Valeur de la statistique F ; Pr>F - Probabilité critique ; CV résiduel - Coefficient de variation résiduel ; ETR - Ecart type résiduel)

L'analyse de variance permet de calculer la moyenne ajustée de l'AUC en corrigeant pour les effets liés à la présence de rouille et aux gradients contrôlés par le dispositif. Ces valeurs ajustées permettent ensuite de classer les variétés en groupes

homogènes, significativement différents entre eux. 86 groupes sont établis avec l'AUC des notations visuelles, et 93 avec l'AUC des indices photos. Le même type d'analyse a été effectué en utilisant comme variable phénotypique non pas l'AUC mais la valeur de la notation à une date ou à 2 dates. Dans ce cas, on n'arrive à établir qu'une trentaine de groupes différenciés. Ceci montre que la prise en compte de la cinétique complète de développement de la maladie apporte un gain important de précision à l'essai.

Les résultats de qPCR sont globalement corrélés aux résultats des notations photos et visuelles, mais ces corrélations ne sont que de l'ordre de 30% à 45%. Ceci montre que les 2 types de mesures peuvent apporter une information complémentaire. En effet, il est possible que les mécanismes de défense de la plante vis-à-vis de la croissance mycélienne et vis-à-vis du développement des symptômes soient différents : disposer de résistances ciblant ainsi des mécanismes différents pourrait être intéressant pour la durabilité des résistances. Il apparaît utile d'approfondir le lien entre ces deux phénomènes (Gouache *et al.*, 2011 ; Bancal *et al.*, 2012).

Concernant la décorrélation avec la précocité, il est recommandé, suite à ce travail, d'utiliser systématiquement la date d'épiaison comme covariable dans les analyses. En effet, les données analysées ici montrent que le schéma décrit en Figure 7 n'est que très peu souvent mis en défaut. La variation des conditions épidémiologiques entre les variétés de différentes précocité d'un même essai ne met pas en défaut l'utilisation de la seule date d'épiaison comme covariable correctrice et ce, pour 2 raisons. Premièrement, ces conditions, appréhendées au travers des variables climatiques de cette étude, n'expliquent que 15% des variations du pouvoir explicatif de la note décorrélée sur la nuisibilité. Deuxièmement, ces variations, finalement assez faibles dans le jeu de données utilisé ici, sont elles-mêmes liées à la variation de la date d'épiaison. Ce qui permet à la covariable date d'épiaison de tenir compte suffisamment bien à la fois du biais d'observation décrit en Figure 7 et de sa modulation par les conditions épidémiologiques variables en fonction des précocités.

Toutefois, l'utilisation de la date d'épiaison comme covariable n'est pas pertinente pour des observations faites trop tôt en saison. Nous pouvons alors donner les ordres d'idée suivants : il vaut mieux attendre de l'ordre de 500°C jours après que de bonnes conditions épidémiologiques se soient manifestées postérieurement à l'émergence de la F2 (autrement dit le stade Deux nœuds, BBCH32). En tendance, ceci correspond à un stade légèrement postérieur à la fin de la floraison.

► Conclusions

Il a été possible de réaliser un essai en contamination contrôlée au champ pour évaluer la résistance adulte. Le grand nombre de mesures effectuées, bien que coûteux, apporte un gain de précision conséquent, qui améliorera la puissance de détection en génétique d'association. L'utilisation de photos est actuellement plus coûteuse en terme de moyens humains qu'une notation visuelle classique, mais le développement d'outils haut débit pourrait changer cette donne. L'approche par appareil photo est par contre plus répétable que la notation visuelle. L'utilisation de la qPCR nous apparaît complémentaire des notations visuelles. Par ailleurs, les résultats valident l'intérêt d'une décorrélation des observations de septoriose avec la date d'épiaison observée. Ils montrent que celle-ci doit s'opérer seulement

pour des observations réalisées dans certaines conditions : premièrement, les dates d'épiaison observées doivent être variables, deuxièmement, les observations seront d'autant plus pertinentes que la maladie s'exprime fortement. Encore plus précisément, il s'agit de vérifier que l'observation se fait à un moment où la maladie qui a été propagée par les épisodes pluvieux de la montaison s'exprime bien : ceci doit généralement être le cas pour des observations postérieures à l'épiaison dès lors que le niveau moyen de maladie commence à s'élever suffisamment. Enfin, la décorrélation peut être rendue moins pertinente si les conditions de propagation de la maladie lors de la montaison ont été très variables lors de la montaison.

5. Conclusions générales

Les variétés françaises contiennent peu de gènes *Stb* connus. En conséquence, l'introduction de ceux-ci dans des programmes de sélection pourrait apporter un gain de résistance. Deux freins existent cependant. Premièrement, les marqueurs disponibles ont peu de valeur diagnostic. Nous avons néanmoins identifié les plus prometteurs d'entre eux, et des variétés élites françaises pouvant éventuellement servir de parents donneurs. Deuxièmement,

il est nécessaire d'établir quels sont les gènes qui seront les plus efficaces parce qu'ils ne sont pas ou peu contournés sur le territoire français. Nos premiers résultats indiquent qu'il existe des isolats virulents sur tous les gènes *Stb* testés dans le cadre du projet (*Stb1* à *Stb15*). Cependant, la fréquence des isolats virulents est très variable d'un gène à l'autre et certains gènes ne sont que rarement contournés. La combinaison de différents gènes *Stb* individuellement contournés semble également être une approche intéressante pour augmenter le niveau de résistance des variétés françaises de blé tendre.

L'autre conséquence de ce constat est que des approches de génétique d'association semblent particulièrement indiquées pour mieux valoriser les résistances existantes dans le matériel français. Nous avons mis au point un protocole expérimental qui a permis d'acquérir un jeu de données très précis pour réaliser ce type d'analyse. Un dispositif expérimental permettant de caractériser de nombreux paramètres de résistance quantitative et d'agressivité a également été mis au point, ouvrant la voie à une meilleure compréhension de la durabilité des résistances vis-à-vis de la septoriose. Enfin, la découverte de souches à très large spectre de virulence appelle à poursuivre la caractérisation et le suivi de telles souches.

Références bibliographiques

- Arraiano L.S., Brown J.K.M.** (2006) Identification of isolate-specific and partial resistance to *Septoria tritici* blotch in 238 European wheat cultivars and breeding lines. *Plant Pathology* 55: 726-738.
- Arraiano L.S., Balaam N., Fenwick P.M., Chapman C., Feuerhelm D., Howell P., Smith S.J., Widdowson J.P., Brown J.K.M.** (2009) Contributions of disease resistance and escape to the control of *Septoria tritici* blotch of wheat. *Plant Pathology* 58: 910-922.
- Bancal M.O., Bancal P., Bingham I.J., Foulkes J., Gouache D., Ney B., Paveley N., Smith J.** (2012) Crop Architecture and Crop tolerance to biotic stresses - Mechanisms to limit crop losses. *Epidemiology and Canopy Architecture Conference*. Rennes, France. 1-5 Juillet 2012
- Bernicot M.H.** (2006) Décryptage des variétés cultivées. *Perspectives Agricoles* 323 : 48-51
- Bockus W.W., Su Z., Garrett K.A., Gill B.S., Stack J.P., Fritz A.K., Roozeboom K.L., Martin T.J.** (2007) Number of Experiments Needed to Determine Wheat Disease Phenotypes for Four Wheat Diseases. *Plant Disease* 91: 103-108.
- Chen R.S., Boeger J.M. and McDonald B.A.** (1994) Genetic stability in a population of a plant pathogenic fungus over time. *Molecular Ecology* 3, 209-218.
- Cowger C., Hoffer M.E., and Mundt C.C.** (2000) Specific adaptation by *Mycosphaerella graminicola* to a resistant wheat cultivar. *Plant Pathology* 49:445-451.
- Cowger C. and Mundt C.C.** (2002) Aggressiveness of *Mycosphaerella graminicola* isolates from susceptible and partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology* 92: 624-630
- Cuthbert R.D.** (2011) Molecular mapping of *Septoria tritici* blotch resistance in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). Thèse de doctorat. University of Manitoba. 149 pp.
- De Mendiburu F.** (2010) agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.0-9. <http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
- El Chartouni L., Tisserant B., Siah A., Duyme F., Leducq J.B., Deweer C., Fichter-Roisin C., Sanssené J., Durand R., Halama P., Reignault P.** (2011) Genetic diversity and population structure in French populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Mycologia* 103: 764-774
- Eyal Z., Brown M.B.** (1976) A quantitative method for estimating density of *Septoria tritici* pycnidia on wheat leaves. *Phytopathology* 66: 11-14.
- Flint-Garcia S.A., Thuillet A-C., Yu J., Pressoir G., Romero S.M., Mitchell S.E., Doebley J., Kresovich S., Goodman M.M., Buckler E.S.** (2005) Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. *The Plant Journal* 44: 1054-64.
- Ghaffary S.M.T.** (2011) Efficacy and mapping of resistance to *Mycosphaerella graminicola* in wheat. Thèse de doctorat. Wageningen University. 241 pp.
- Ghaffary S.M.T., Van der Lee T.A.J., Verstappen E.C.P., Kema G.H.J.** (2008) Screening for resistance to *Septoria tritici* blotch, the major wheat disease in Western Europe. 7th international *Mycosphaerella* and *Stagonospora* symposium, 18-22 August, Ascona, Switzerland
- Ghaffary S.M.T., Robert O., Laurent V., Lonnet P., Margalé E., Van der Lee T.A.J., Visser R.G.F., Kema G.H.J.** (2011) Genetic analysis of resistance to *Septoria tritici* blotch in the French winter wheat cultivars Balance and Apache. *Theoretical and Applied Genetics* 123: 741-754
- Ghaffary S.M.T., Faris J.D., Friesen T.L., Visser R.G.F., Van der Lee T.A.J., Robert O., Kema G.H.J.** (2012) New broad-spectrum resistance to septoria tritici blotch derived from synthetic hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 124: 125-42

Références bibliographiques (suite)

- Goodwin S.B.** (2007) Back to basics and beyond: increasing the level of resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. *Australasian Plant Pathology* 36: 532-538.
- Goodwin S.B., Van der Lee T.A.J., Cavaletto J.R., Te Lintel Hekkert B., Crane C.F., Kema G.H.J.** (2007) Identification and genetic mapping of highly polymorphic microsatellite loci from an EST database of the septoria tritici blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology* 44: 398-414.
- Goodwin S.B., Ben M'Barek S., Dhillon B., Wittenberg A.H.J., Crane C.F. et al** (2011) Finished Genome of the Fungal Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola* Reveals Dispensome Structure, Chromosome Plasticity, and Stealth Pathogenesis. *PLoS Genetics* 7: 1-17.
- Gouache D., Andrieu B., Bancal M-O., Bancal P., Chelle M., Fournier C., Robert C., Ney B.** (2009) Modélisation des interactions épidémies-couvert végétal : de la recherche à la mise au point d'outils opérationnels pour la protection intégrée des cultures. AFPP. 9ème conférence Internationale sur les maladies et les plantes - Tours.
- Gouache D., Thepot S., Roisin-Fichter C., Selim S.** (2011) Exploring quantitative relationships between mycelial growth and visual symptoms of *Septoria tritici*. 8th International Symposium on Mycosphaerella and Stagonospora Diseases of cereals 11-14 Sept. 2011. Mexico City, Mexico.
- Gough F. J.** (1978) Effect of wheat host cultivars on pycnidiospore production by *Septoria tritici*. *Phytopathology* 68: 1343-1345.
- Jorgensen L.N., Jahn M., Clark W., Antichi D., Goral T., Schepers H., Lucas P., Rolland B., Gouache D., Hornok L.** (2008) Endure Wheat Case Report.
- Kema G.H.J., Van Silfhout C.H.** (1997) Genetic Variation for Virulence and Resistance in the Wheat-*Mycosphaerella graminicola* Pathosystem III. Comparative Seedling and Adult Plant Experiments. *Phytopathology* 87: 266-272.
- Linde C.C., Zhan J. and McDonald B.A.** (2002) Population Structure of *Mycosphaerella graminicola* : From Lesions to Continents. *Phytopathology* 92: 946-955.
- Lovell D.J., Hunter T., Powers S.J., Parker S.R., Bosch F.V.D.** (2004) Effect of temperature on latent period of septoria leaf blotch on winter wheat under outdoor conditions. *Plant Pathology* 53: 170 -181.
- McDonald B.A., Mundt C.C. and Chen R.S.** (1996) The role of selection on the genetic structure of pathogen populations: Evidence from field experiments with *Mycosphaerella graminicola* on wheat. *Euphytica* 92: 73-86
- McDonald B.A.** (1997) The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87: 448-453
- Mundt C.C., Hoffer M.E., Ahmed H.U., Coakley S.M., DiLeone J.A., Cowger C.** (1999) Population genetics and host resistance. In : Lucas JA, Bowyer P, Anderson AM, eds. *Septoria on Cereals : A study of Pathosystems*. Wallingford, UK : CAB International, 115-130.
- Owen P.G., Pei M., Karp A., Royle D.J., Edwards K.J.** (1998) Isolation and characterization of microsatellite loci in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Ecology* 7: 1611-1612.
- Pariaud B.** (2008) Agressivité de *Puccinia triticina* (agent de la rouille brune du blé) et son adaptation à l'hôte. Thèse de doctorat. Université Paris-Sud 11. 202 pp.
- Van Ginkel M., Rajaram S.** (1999) Breeding for Resistance to the Septoria/Stagonospora Blights of Wheat. In: van Ginkel, M., A. McNab, and J. Krupinsky, eds. 1999. *Septoria and Stagonospora Diseases of Cereals: A Compilation of Global Research*. Mexico, D.F.: CIMMYT.
- Van Ginkel M., Scharen A.L.** (1987) Generation mean analysis and heritabilities of resistance to *Septoria tritici* in durum wheat. *Phytopathology* 77: 1629-1633.
- Viljanen-Rollinson S.L.H., Marroni M.V., Butler R.C., Deng Y., Armour T.** (2005) Latent periods of *Septoria tritici* blotch on ten cultivars of wheat. *New Zealand Plant Protection* 260: 256-260.
- Waalwijk C., Mendes O., Verstappen E.C.P., De Waard M.A., Kema, G.H.J.** (2002) Isolation and Characterization of the Mating-Type Idiomorphs from the Wheat Septoria Leaf Blotch Fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology* 35, 277-286
- Zhan J., Kema G.H.J., Waalwijk C. and McDonald B.A.** (2002) Distribution of mating type alleles in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* over spatial scales from lesions to continents. *Fungal Genetics and Biology* 36:128-136.
- Zhan J., Pettway R.E. and McDonald B.A.** (2003) The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. *Fungal Genetics and Biology* 38: 286-297

Introduction de résistance au puceron des épis *Sitobion avenae* chez le blé dur

Charles-Antoine DEDRYVER¹, Joseph JAHIER¹, Jean-François LE GALLIC¹, Pierre RIGOLLE*, MAXIME Trottet¹

1 - INRA - UMR IGEPP, Domaine de la Motte au Vicomte, BP 35327, 35653 LE RHEU

2 - GIE Club 5 - In Vivo, 83 Avenue de la Grande Armée, 75782 Paris Cedex 16

* Coordinateur : Pierre RIGOLLE, prigolle@semences-de-france.fr

1. Introduction

Le puceron des épis *Sitobion avenae* est un des principaux déprédateurs des cultures céréalières en Europe. C'est même le plus important au printemps, entre la montaison et la maturité pâteuse. Il peut entraîner des baisses de rendement sur céréales, en particulier sur le blé tendre, pouvant aller de 10 à 20 quintaux par hectare en cas de fortes pullulations comme celle de 2004. Les dégâts causés par *S. avenae* sur les céréales au printemps sont dus à l'effet dépressif direct de la prise de nourriture du puceron. Comme presque tous les aphides, *S. avenae* se nourrit en insérant ses stylets dans les tubes criblés du phloème où il prélève la sève élaborée (Caillaud & Niemeyer 1996). Ces prélèvements des ressources de la plante en sucres et acides aminés entraînent un affaiblissement général de celle-ci, qui se traduit, dans le cas des céréales, par une baisse de la productivité en grains lorsque les populations atteignent plusieurs dizaines d'individus par talle (Vereijken, 1979). Aux stades herbacés, *S. avenae* se nourrit sur les feuilles, puis se localise préférentiellement sur les épis dès leur émergence. Cette possibilité d'exploiter successivement des organes différents dont la physiologie active est décalée dans le temps permet à ce ravageur de se maintenir plus longtemps sur les céréales que la plupart des autres espèces de pucerons. De plus, le miellat rejeté par les pucerons est propice au développement de fumagines, champignons noirs dont la présence diminue le rendement photosynthétique de la plante. Outre ces dégâts directs, *S. avenae* peut transmettre des virus causant des maladies végétales induisant elles aussi une diminution de la production de grains, comme la jaunisse nanisante de l'orge (JNO). A l'automne, son rôle comme vecteur des virus de la JNO est néanmoins secondaire par rapport à celui de *Rhopalosiphum padi*. Il joue un rôle beaucoup plus important dans la transmission de ces derniers au maïs en fin de printemps.

La principale technique de lutte contre le puceron des épis est actuellement la lutte chimique entre la fin de la montaison et la maturité laiteuse, sous forme de traitements insecticides foliaires. Les pullulations sont sporadiques et imparfaitement expliquées et les traitements dits « d'assurance » sont fréquents (Wratten *et al.* 1990), alors qu'a posteriori, ils ne sont justifiés que dans moins d'un cas sur deux en moyenne. Actuellement, la notion de traitement d'assurance est de plus en plus vivement combattue dans le souci du développement d'une agriculture plus raisonnée, associant compétitivité et meilleur respect de l'environnement (Butault *et al.*, 2010). En complément ou en subsidiarité à la lutte chimique, des techniques culturales comme les semis tardifs peuvent contribuer à diminuer les populations hivernales de pucerons, mais elles n'ont pas sur ce puceron à dynamique printanière,

l'efficacité montrée sur les contaminations automnales par *R. padi* (Fabre *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'utilisation d'ennemis naturels des pucerons comme les hyménoptères parasitoïdes Aphidiides ou les champignons de type entomophthorales, n'est pas réaliste sur céréales. À l'inverse, l'utilisation de variétés au moins partiellement résistantes pourrait permettre d'abaisser le niveau moyen des populations de pucerons des épis au printemps en dessous de leur seuil de nuisibilité, ce qui contribuerait à réduire fortement le nombre de traitements insecticides, en particulier sur le blé.

Les recherches menées dans les années soixante-dix et quatre-vingt ont toutes conclu à l'absence de résistances à *S. avenae* dans les variétés et les populations existantes de blé tendre (Di Piéto & Dedryver, 1986), à l'exception de quelques cas de résistance partielle chez des blés chiliens dus à une surproduction de DIMBOA (acides hydroxamiques) uniquement au stade jeune plante (Niemeyer, 1991). Les recherches se sont ensuite focalisées sur *Triticum monococcum*, espèce diploïde (2n=14, A^mA^m) dont le génome A^m présente un fort niveau d'homologie avec le génome A du blé dur (2n=28, BBAA) et du blé tendre (2n=42, BBAADD). C'est en effet dans cette dernière espèce que se situent pratiquement toutes les sources de résistances stables identifiées à ce jour (Dedryver *et al.*, 2004). À l'INRA, trois sources de résistance de type antibiose ont été mises en évidence et étudiées entre 1988 et 1995, au sein des lignées TM44, TM45 et TM46 (Di Piéto *et al.*, 1993, Caillaud *et al.*, 1994). Ces lignées contrarient fortement le comportement alimentaire des pucerons (Caillaud *et al.*, 1995a), d'où réduction très importante des périodes de prélèvement de sève et inanition de ces derniers. La résistance s'exerce spécifiquement sur *S. avenae*, les autres espèces de pucerons communes sur céréales étant très peu (*Metopolophium dirhodum*) ou pas du tout (*Rhopalosiphum padi*) affectées.

Une étude génétique à partir d'un croisement diallèle entre les lignées TM44, TM46 et TM47 a montré que pour le taux de mortalité des pucerons induit par le génotype de blé sur les feuilles de jeunes plantes au stade 1-2 feuilles, et dans une moindre mesure pour la durée du développement larvaire, les gènes portés par ces trois génotypes n'étaient pas dans les mêmes régions du génome et avaient un effet additif (Caillaud, 1994). Bien que la résistance de TM47 soit modérée, on observe un effet positif sur la résistance moyenne des F1 et F2 issues de croisements avec TM44 ou TM46.

Il existe une variabilité interclonale chez *S. avenae* pour l'aptitude à se développer et à se multiplier sur les *T. monococcum* résistants. Caillaud *et al.* (1995b) ont testé le comportement de 60 clones de *S. avenae* pour leur vitesse de développement et leur fécondité sur TM44 et Arminda. Ces 2 paramètres sont affectés pour tous les clones maintenus sur

TM44, mais chez certains moins que chez d'autres. Quatre clones représentant la variabilité observée sur TM44 ont été confrontés à TM44, TM46, TM47 et Arminda, aucun clone n'a montré de forte adaptation à TM44, mais deux clones ont montré une adaptation partielle à TM46 qui reste cependant moins favorable qu'Arminda. Dans la même expérience, un clone maintenu pendant deux ans sur TM44 n'a pas montré d'évolution vers une meilleure adaptation à ce génotype (Di Piéto et Caillaud, 1998).

Aucune étude sur épis n'avait été réalisée sur ces génotypes de *Triticum monococcum* avant l'appel d'offre du FSOV qui a suscité ce projet.

► Objectif de l'étude

L'INRA avait comme objectif initial l'introduction de la résistance des deux lignées TM44 et TM46 de *T. monococcum* dans le blé tendre. Comme les croisements 'blé tendre × *T. monococcum*' étaient sub-létaux et de ce fait n'ont pas produit de descendance, le transfert a été initié dans le blé dur. La perspective était que, une fois la résistance introgressée dans le blé dur, son transfert dans le blé tendre pourrait être réalisé.

Dans le présent projet, nous nous proposons :

- d'évaluer la résistance au champ des génotypes qui ont été sélectionnés au laboratoire à partir de test sur jeunes plantes,
- de réaliser un marquage moléculaire de ces gènes de résistance dans le blé dur à partir de deux populations d'haploïdes doublés issue du croisement entre d'une part chacun des deux blés durs résistants au puceron des épis et d'autre part une variété de blé dur sensible, puis
- de sélectionner des génotypes blé tendre (42 chromosomes) dans la descendance d'un croisement entre un blé dur résistant et un blé tendre et ensuite de rechercher des blés tendres résistants.

Notre projet était ambitieux. Comme le déterminisme génétique de la résistance sur jeunes plantes pourrait être différent de celui sur épis, la résistance au champ a pris plus de temps que prévu et en conséquence, nous n'avons pu aborder les deux autres opérations.

2. Matériel et méthodes

► Matériel

Les deux lignées de *T. monococcum* TM44 et TM46 ont été respectivement croisées par les deux variétés de blé dur cvs Prodigal et Lloyd, ces dernières étant les parents femelles. Deux semaines après la pollinisation, les embryons interspécifiques ont été cultivés in vitro. Par la suite, les jeunes plantes hybrides F1 (2n=21, AA^mB) ont été traitées à la colchicine. Au sein de leurs descendance autofécondées, deux amphiploïdes ont été sélectionnés par dénombrement chromosomique sur cellules méristématiques radiculaires : *T. monococcum* 44 × Prodigal et *T. monococcum* 46 × Lloyd. Ces deux amphiploïdes sont hexaploïdes (2n=42, AAA^mBB).

Un test de résistance à *Sitobion avenae* de jeunes plantes de ces deux génotypes a montré que la résistance ne s'exprimait pas. Nous avons fait l'hypothèse que l'inhibition de la résistance était due à des phénomènes de dominance/récessivité entre les génomes A et A^m, et donc que la résistance pourrait s'exprimer chez des lignées de blé dur introgressées obtenues dans la descendance en rétrocroisement des deux amphiploïdes.

Les deux amphiploïdes ont été rétrocroisés par leur parent blé dur. Les plantes BC1F1 (2n=35, AAA^mBB) ont été cultivées et autofécondées. Dans la génération BC1F2, des plantes à 28 chromosomes ont été sélectionnées.

Pendant les trois générations suivantes (BC1F3, BC1F4, BC1F5), une sélection a été pratiquée à l'aide du test de résistance sur jeunes plantes, les deux critères de sélection étant : la durée de vie des pucerons déposés sur les jeunes plantes et la fécondité des adultes aptères. En BC1F5, ont été retenues :

- 3 lignées en ségrégation Prodigal × TM44
- 9 lignées en ségrégation et une fixée Lloyd × TM46.

Ce matériel constitue le matériel de départ du programme FSOV.

Après un premier test, trois lignées, une issue de TM46 et les deux autres de TM44 semblaient les plus prometteuses. Les caractéristiques de résistance de la lignée fixée BC1F5 'Lloyd × 46 - 8' et de deux lignées Prodigal × TM44 en ségrégation sont données dans le Tableau 1 :

	Fécondité moyenne des adultes aptères	Durée de vie moyenne du puceron (larve et adulte) en jours
(Lloyd × TM46) - 45.4.8	2.7	16.4
Lloyd	12.3	32.1
TM46	0.3	12.3
(Prodigal × TM44) - 7 - 2	11.15	21.7
(Prodigal × TM44) - 3 - 1	11	25.7
Prodigal	19.3	29.6
TM44	0	12.4

Tableau 1. Fécondité et durée de vie moyenne du puceron *Sitobion avenae* sur les feuilles des lignées Lloyd × TM46 et Prodigal × TM44 les plus résistantes dont on a analysé la résistance de la descendance dans le projet.

► Méthodes

Les tests ont été effectués avec le clone Sa1 de *S. avenae*, originaire de la région de Rennes (Dedryver *et al.*, 1998), dont le taux d'accroissement sur jeunes plantes à 20°C est de 0.15 sur TM44 et 0.19 sur TM46 (0.26 sur blé hexaploïde). Sa1 fait partie des 25% de clones les moins sensibles à TM44 et TM46, phénotypés lors d'une expérimentation en conditions contrôlées (Caillaud *et al.*, 1995b).

Sa1 est maintenu et multiplié sur des jeunes plantes de blé de la variété Orvantis sous forme de femelles parthénogénétiques, dans des conditions n'induisant pas la production d'individus sexués mâles et femelles (20°C, 16h de photopériode). Un mois avant la contamination des plantes à tester, une production massive de pucerons était initiée.

Les expérimentations sur jeunes plantes ont été faites en chambres climatisées (20°C, 16h de photopériode). La contamination était réalisée par dépôt d'une larve à ptérothèques de puceron (larves du 4e stade, précurseur d'adultes ailés) sur chaque plante, puis la plante entière était enveloppée dans un sachet en Cellophane micro-perforé (perméable à l'air mais pas aux pucerons). Chaque plantule était observée toutes les semaines et l'on notait si le puceron apporté était encore vivant, s'il avait mué en adulte, ainsi que le nombre de larves qui avaient été produites et leur stade larvaire. Chaque année, une vingtaine de plantes par génotype de blé [descendance] étaient soumises à ce protocole

Les expérimentations sur plantes adultes (épis et feuilles) devaient primitivement être uniquement réalisées au champ, mais devant les difficultés d'obtention d'une contamination homogène et durable rencontrées en 2008 et 2009, l'essentiel des tests ont été effectués en serre ou en tunnel de 2010 à 2012.

Les tests sur épis réalisés en plein champ en 2009, ainsi qu'en tunnel en 2009, 2010, 2011 et 2012, sont effectués en déposant 2 larves à ptérothèques par épi sur un minimum de 10 épis par lignée. Chaque épi est ensuite recouvert d'un sac de Cellophane micro-perforé et les pucerons ainsi confinés sont laissés se multiplier pendant 21 jours à température extérieure (ou à la température du tunnel). Au bout de 21 jours, les épis sont coupés et les pucerons collectés, stockés en alcool (70%) et dénombrés. Du fait des différences climatiques entre les années, les résultats quantitatifs (nombre de pucerons par épi) de ces différentes expérimentations ne peuvent être comparés entre eux.

Les tests sur feuilles réalisés en tunnel en 2010, ont été effectués selon le même processus, en confinant les pucerons dans des microcages en plastique avec une toile à mailles très fines, enserrant une partie de la feuille drapeau.

Les plantes qui avaient le meilleur comportement dans le test jeunes plantes en 2010 ont été repiquées en serre pour produire des grains. En 2011 nous avons mis en place un essai pour évaluer la résistance des feuilles et des épis de descendance de six lignées issues de ces plantes, et des deux parents TM44 et Prodigal. L'essai était en blocs complets avec deux répétitions et huit plantes par génotype dans chaque répétition.

Les grains de treize épis de la lignée S10 ont été récoltés et un nouveau test a été effectué sur épis en tunnel au printemps 2012 avec les mêmes modalités qu'en 2011 (essai en blocs complets avec deux répétitions et 6 épis contaminés par génotype dans chaque répétition). Un témoin blé tendre (Folklor) a été également contaminé hors dispositif. Une observation de la contamination naturelle des mêmes lignées au champ a également été faite le 13 juin 2012 au Rheu (20 épis par parcelle, de 2 à 4 répétitions selon les variétés ou lignées).

2. Résultats

► Descendants du croisement Lloyd × TM46

Un test réalisé en 2007 sur des jeunes plantes avait permis de mettre en évidence deux familles sur lesquelles la durée de vie des pucerons était un peu supérieure à celle observée sur TM46 et de 40% plus courte que sur le blé dur et une fécondité quatre fois plus faible que sur le blé dur mais cependant plus élevée que sur *T. monococcum* 46.

En 2008, des descendants de ces deux familles ont été testés au champ pour leur aptitude à limiter la multiplication de *Sitobion avenae* sur les épis. La fécondité sur la meilleure lignée était quatre fois plus faible que sur le blé dur Lloyd et 40% plus élevée que sur TM46.

En 2009, le développement du puceron *S. avenae* a été faible avec un maximum de 35 pucerons par épi sur Lloyd contre jusqu'à 200 en 2008. Cependant, la multiplication des pucerons a été réduite de moitié par rapport à Lloyd sur une lignée issue de la famille la plus résistante (Tableau 2).

Les descendants de la lignée 45-4-8-1-2 ont été étudiés de nouveau en 2010. Le test sur épis réalisé en serre sur les descendances de la meilleure lignée et d'une lignée plus

sensible a montré qu'aucune lignée n'était résistante, et que la lignée de *T. monococcum* 46 d'un niveau élevé de résistance sur feuilles n'était pas plus résistante que Lloyd lorsqu'on contaminait les épis. (Tableau 3)

Génotypes	Nombre moyen de pucerons par épi trois semaines après dépôt de deux pucerons (<i>Sitobion avenae</i>) par épi à la fin de la floraison en 2009
Lloyd	7.9
(Lloyd×TM46)-45-4-8-1-1	9.0
(Lloyd×TM46)-45-4-8-1-2	4.0
(Lloyd×TM46)-45-4-8-1-3	5.6
(Lloyd×TM46)-45-4-8-1-4	6.3
(Lloyd×TM46)-45-4-8-1-5	9.4
(Lloyd×TM46)-45-4-8-1-6	9.1
(Lloyd×TM46)-45-4-8-15-x	7.6
sensible	8.6

Tableau 2. Fertilité de *Sitobion avenae* sur des épis de Lloyd et de descendants de croisements entre Lloyd et TM46 en 2009. (Expérimentation au champ)

Génotypes	Nombre moyen de pucerons par épi trois semaines après dépôt de deux pucerons (<i>Sitobion avenae</i>) par épi à la fin de la floraison
Apache	49.87
Lloyd	28.31
TM46	29.78
(Lloyd×TM46)-8-1 lig1	37.76
(Lloyd×TM46)-8-1 lig2	35.31
(Lloyd×TM46)-8-1 lig3	45.17
(Lloyd×TM46)-8-1 lig4	33.00
(Lloyd×TM46)-8-1 lig5	41.63
(Lloyd×TM46)-8-1 lig6	56.64
(Lloyd×TM46)-8-15 lig1	74.54
(Lloyd×TM46)-8-15 lig2	53.50

Tableau 3. Fertilité de *Sitobion avenae* (expérimentation en tunnel, en 2010) sur des épis de Lloyd et de descendants de la lignée 45-4-8-1-2 issue du croisements entre Lloyd et TM46.

Les deux familles testées en tunnel ont un comportement similaire à celui de Lloyd. La plante mère était donc probablement hétérozygote, et les descendants sensibles ont été retenus. Cette source de résistance est insuffisante et ne sera pas poursuivie.

► Descendants du croisement Prodigal × TM44

En 2010, des descendants de croisements de Prodigal avec TM44 ont été évalués en chambre climatisée pour la résistance à *S. avenae* au stade jeune plante (Tableau 4).

Génotypes	Fécondité			Durée de vie		
	moy	min	max	moy	min	max
TM 44	0.35	0	7	16.30	14	28
Prodigal	22.30	7	44	32.95	22	55
(Prodigal×TM44)-3-1-2	3.65	0	33	19.60	14	36
(Prodigal×TM44)-3-1-6	3.65	0	13	21.50	14	36
(Prodigal×TM44)-3-1-8	3.78	0	13	23.94	13	48
(Prodigal×TM44)-3-1-11	5.00	0	19	25.05	13	48
(Prodigal×TM44)-7-2-5	1.90	0	14	20.35	13	28
(Prodigal×TM44)-7-2-14	4.50	0	20	24.25	13	35
TM 46	0.65	0	6	16.80	14	22

Tableau 4. Fertilité et durée de vie de *Sitobion avenae* sur des feuilles de jeunes plantes de descendances du croisement (Prodigal × TM44), et des génotypes TM44, Prodigal et TM46 dans l'essai conduit en chambre de culture en 2010

On observe un niveau de résistance élevé des différentes lignées, dont 3 semblent fixées si l'on considère la valeur maximale de la fécondité qui est le double de celle de TM44, mais inférieure au tiers de celle de Prodigal. La durée de vie moyenne des pucerons est inférieure d'un tiers à celle de ceux élevés sur Prodigal.

Le résultat du test d'évaluation sur feuilles a été très peu fiable du fait d'une attaque importante à la montaison par une autre espèce de puceron, *Metopolophium dirhodum*, contre laquelle on ne connaît aucune source de résistance. Il était impossible d'appliquer un insecticide peu de temps avant de déposer des pucerons sur les feuilles et les épis. Seul le résultat des contaminations sur les épis est donc exploitable.

Code 2011	Génotype	N°	Plt	VA + L3 + L4		
				moyenne	mini	maxi
1	TM44			5.27	0	15
3	(Prodigal×TM44)-3-1-6	7	4	11.60	0	22
4	(Prodigal×TM44)-3-1-8	8	1	12.13	2	20
5	(Prodigal×TM44)-3-1-8	8	9	13.20	0	32
6	(Prodigal×TM44)-3-1-11	9	1	18.87	11	44
7	(Prodigal×TM44)-3-1-11	9	14	9.67	0	25
8	(Prodigal×TM44)-7-2-5	10	7	17.47	5	51
9	(Prodigal×TM44)-7-2-5	10	11	12.40	1	20
10	(Prodigal×TM44)-7-2-14	11	15	6.15	0	18
11	Prodigal	13	4	13.33	4	26
2	TM46			10.53	1	26

Tableau 5 : Contamination des épis en 2011 : Distribution du nombre total d'individus de deuxième génération virginipares aptères et larves âgées (stades L3 et L4) sur des génotypes descendants du croisement Prodigal × TM44.

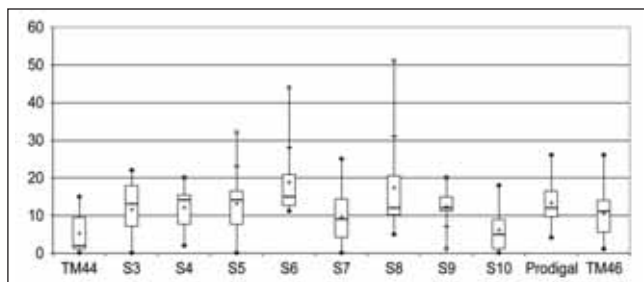


Figure 1 : Boxplot illustrant la distribution du nombre total d'individus de deuxième génération virginipares aptères et larves aux stades L3 et L4 par épi en 2011.

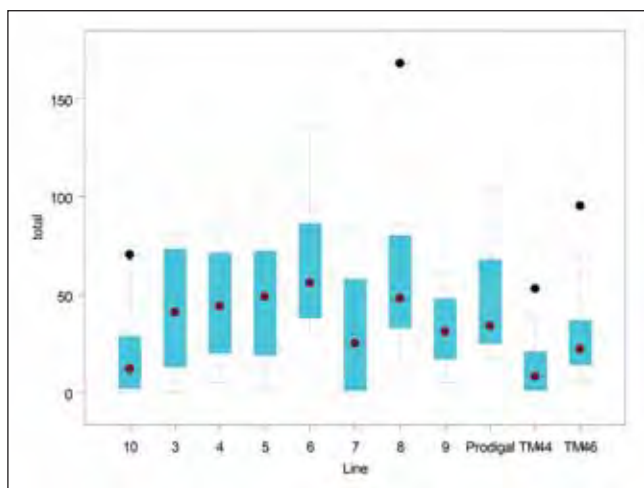


Figure 2 : Boxplot illustrant la distribution du nombre total d'individus de deuxième génération par épi sous tunnel en 2011.

Le test sur épis effectué en 2011 paraît indiquer que la lignée 10 (S10 = (P×44)-7-2-14) présente une résistance dont l'effet est comparable à celle de TM44 (populations totales moyennes 2 fois moindres que celles se développant sur Prodigal et sur les autres lignées (Tableau 5, et Figures 1 et 2). Néanmoins les variations interindividuelles restent importantes.

Code 2012	Génotype	Nbre plantes	VA + L3 + L4		
			moyenne	mini	maxi
TM44	TM44	10	3.5	0	11
S10-1	(Prodigal×TM44)-7-2-14-1	12	11.7	0	27
S10-2	(Prodigal×TM44)-7-2-14-2	12	20.8	0	71
S10-3	(Prodigal×TM44)-7-2-14-3	12	24.0	6	42
S10-4	(Prodigal×TM44)-7-2-14-4	12	25.6	0	47
S10-5	(Prodigal×TM44)-7-2-14-5	12	35.5	0	101
S10-6	(Prodigal×TM44)-7-2-14-6	11	27.0	12	65
S10-7	(Prodigal×TM44)-7-2-14-7	12	18.9	0	51
S10-8	(Prodigal×TM44)-7-2-14-8	12	21.3	0	47
S10-9	(Prodigal×TM44)-7-2-14-9	12	24.6	7	52
S10-10	(Prodigal×TM44)-7-2-14-10	12	22.4	0	51
S10-11	(Prodigal×TM44)-7-2-14-11	12	25.7	0	82
S10-13	(Prodigal×TM44)-7-2-14-13	12	22.5	10	37
S10-14	(Prodigal×TM44)-7-2-14-14	12	21.5	2	57
Prodigal	Prodigal	12	21.2	7	34
Folklor	Folklor	10	25.6	11	35

Tableau 6 : Contamination des épis en 2012 : Distribution du nombre total d'individus de deuxième génération virginipares aptères et larves âgées (stades L3 et L4) par épi.

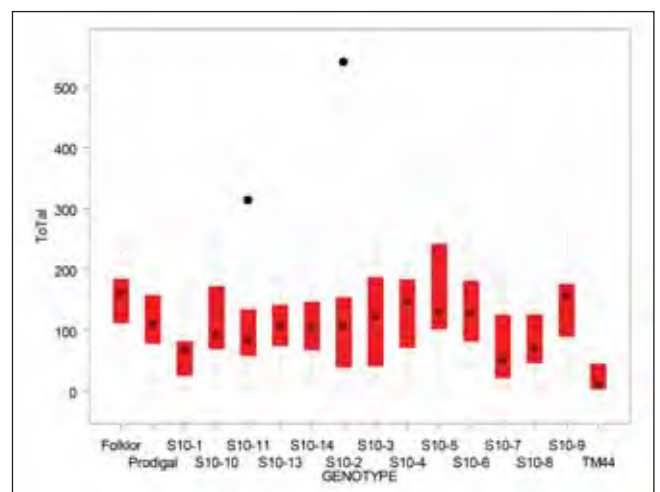


Figure 3 : Boxplot illustrant la distribution du nombre total moyen d'individus de deuxième génération par épi sous tunnel en 2012

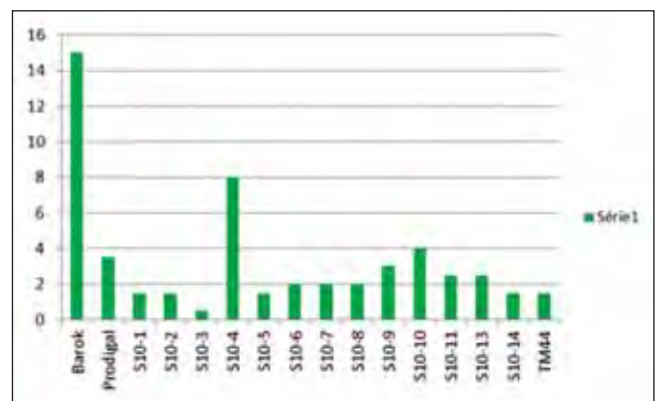


Figure 4 : Contamination naturelle moyenne au champ des différentes lignées par des ailés de *S. avenae* le 13 juin 2012 (en nombre de pucerons pour 20 épis).

Les résultats du test en tunnel effectué en 2012 (Tableau 6 et Figure 3) contredisent ceux obtenus en 2011, dans des conditions bioclimatiques difficiles : fortes chaleurs et sur-contaminations des blés par une autre espèce de puceron. La seule résistance qui se maintienne d'une année sur l'autre est celle du parent diploïde, TM44. La lignée S10-1 est globalement moins contaminée que les autres, mais les différences ne sont pas significatives.

Les observations de contaminations naturelles au champ (Figure 4) ne mettent pas en évidence de différences interlignées, à l'exception d'une contamination plus importante de la variété hexaploïde Barok.

3. Discussion & Conclusion

Lorsque le travail présenté dans cet article a débuté, seuls des tests de résistance au puceron des épis *Sitobion avenae* au stade jeune plante sur les premières feuilles apparues après la germination avaient été réalisés. Mais le niveau de résistance au stade adulte, sur les dernières feuilles ou les épis était inconnu. Cependant, lors d'observations d'accessions de ressources génétiques de blé semées au champ, on observait régulièrement un développement beaucoup plus faible de *S. avenae* sur les feuilles sommitales et les épis des génotypes de blés diploïdes (l'engrain : *T. monococcum*) que sur les blés tétraploïdes (blés durs et amidonniers) et hexaploïdes (blés tendres et épeautres). Ceci pouvait signifier qu'il existait une résistance génétique chez les blés diploïdes, s'exprimant dans les feuilles sommitales et les épis. La collection étant disposée au champ groupée par espèces, cela pouvait aussi signifier que l'attractivité des engrains pour *S. avenae* était plus faible ou que l'engrain étant plus tardif à la montaison il était moins attractif au moment des vols de *S. avenae*. La non (plus faible) expression du mécanisme conduisant à la mort des pucerons d'inanition, ou à limiter fortement leur reproduction, peut aussi venir d'interactions entre les génomes du blé dur et celui

de l'engrain qui inhibent le mécanisme de résistance. La pénétrance, proportion de plantes porteuses du gène de résistance qui expriment un phénotype résistant pourrait aussi être une cause de cet échec. Des pénétrances incomplètes sont signalées pour des résistances à des insectes, il s'agit souvent de gènes venant d'espèces apparentées au blé tendre. Liu *et al.* (2005) ont montré que le gène dominant de résistance à la mouche de Hesse (*Mayetiola destructor*), *Hdic*, venant de *Triticum dicoccum*, lorsqu'il est à l'état hétérozygote pouvait donner des plantes entièrement résistantes ou entièrement sensibles, mais pas de plantes de phénotype intermédiaire. Buntin *et al.* (1990) ont aussi montré que certains gènes de résistance à la mouche de Hesse étaient sensibles à la température. Ces phénomènes pourraient aussi se produire pour la résistance du blé au puceron *S. avenae*.

L'objectif de cette étude qui était d'introduire la résistance à *Sitobion avenae* portée par quelques génotypes de *Triticum monococcum* chez le blé tendre en utilisant le blé dur comme espèce-pont n'a pas abouti. Cela tient peut-être à une pénétrance incomplète du (des) gène(s) de résistance dans le blé dur. Néanmoins nous avons confirmé que TM44 était une excellente source de résistance à *S. avenae* au stade jeune plante et montré pour la première fois qu'elle l'était aussi au stade adulte (épiaison-floraison). Le matériel a d'abord été sélectionné uniquement au stade jeune plante avant de l'être sur les épis en faisant l'hypothèse que les gènes de résistance au niveau des feuilles et des épis étaient identiques. Nos résultats pourraient indiquer le contraire.

Cependant, début 2012, Liu *et al.* ont décrit une résistance chez le blé dur, cette résistance est monogénique et localisée sur le chromosome 6A. Elle s'exprime dans les feuilles et les épis dans une lignée de blé dur. Sa pénétrance apparaît supérieure à celle de *T. monococcum* dans le blé dur. Son transfert dans le blé tendre pourrait être envisagé. Elle serait peut-être plus facile à introduire chez le blé tendre que la résistance de TM44.

Références bibliographiques

Butault J.P., Dedryver C-A., Gary C., Guichard L., Jacquet F., Meynard J.M. et al. (2010) Ecophyto R&D. Quelles voies pour réduire l'usage des pesticides ? Synthèse du rapport d'études, INRA Editeur (France), 90p.

Buntin G.D., Bruckner P.L., Johnson J.W., Foster J.E. (1990) Effectiveness of selected genes for Hessian fly resistance in wheat. *J. Agric. Entomol.* 7, 283-291

Caillaud C-M. (1994) Analyse des mécanismes de la résistance de lignées de blé *Triticum monococcum* au puceron des céréales *Sitobion avenae*. Thèse de Doctorat Université Paris Sud-Orsay, 83pp.

Caillaud C-M., Dedryver C-A., Simon J-C. (1994) Development and reproductive potential of the cereal aphid *Sitobion avenae* on resistant wheat lines (*Triticum monococcum*). *Ann. appl. Biol.* 125, 219-232.

Caillaud C-M., Pierre J-S., Chaubet B., Di Piéto J-P. (1995a) Analysis of wheat resistance to the cereal aphid *Sitobion avenae* using electrical penetration graphs and flow charts combined with correspondence analysis. *Entomologia experimentalis et applicata* 75, 9-18.

Caillaud, C-M., Dedryver C-A., di Pietro J-P., Simon J-C., Fima F., Chaubet B. (1995b) Clonal variability in the response of *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae) to resistant and susceptible wheat. *Bull. Entomol. Res.* 85: 189-195.

Dedryver C-A. (2004) Resistance of Poaceae to virus vectors. In Lapiere H., Signoret P. eds *Viruses and Virus Diseases of Poaceae*. Paris, France: Editions INRA, 198-204.

Di Pietro J-P, Caillaud C-M. (1998) Response to intracolonial selection for adaptation to resistant wheat in the English grain aphid (Homoptera : Aphididae). *Environ. Entomol.*, 27, 80-85.

Di Pietro J-P, Dedryver C-A. (1986) Relation entre les pucerons des céréales et leurs plantes-hôtes. 1. Mise au point d'une méthodologie de recherche de résistance à *Sitobion avenae* F. chez différents cultivars de blé d'hiver. *Agronomie* 5, 469-479.

Di Pietro J-P, Soster C., Chaubet B., Caillaud C-M. (1993) The resistance of different lines of *Triticum* species to the aphid *Sitobion avenae* Bull. OILB SROP, 16 (5), 110-116.

Fabre F., Leterrier J-L., Trottet M., Dedryver C-A. (2008) Infestations comparées de l'orge et du blé par les pucerons vecteurs de la JNO, en fonction de la date de semis : conséquences sur les taux d'infection et les rendements. In *Compte-rendus de la 8^{ème} conférence internationale sur les ravageurs en agriculture* Montpellier, France, octobre 2008. (CD-Rom-CIRA : ISBN : 2-905550-17-31).

Liu X.L., Yang X.F., Wang C.Y., Wang Y.J., Zhang H. and Ji W.Q. (2012) Molecular mapping of resistance gene to English grain aphid (*Sitobion avenae* F.) in *Triticum durum* wheat line C273. *Theor. Appl. Genet.* 124, 287-293.

Références bibliographiques (suite)

Liu X.M., Brown-Guedira G.L., Hatchett J.H., Owuoche J.O., Chen M.S. (2005) Genetic characterization and molecular mapping of a Hessian fly-resistance gene transferred from *T. turgidum* ssp. *dicoccum* to common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 111, 1308-1315.

Niemeyer H.M. (1991) Secondary plant compounds in aphid-host interactions. In: Campbell R.K., Eikenbary R.D., eds. *Aphid-plant genotype interactions*. New York, USA: Elsevier, 101-114.

Vereijken P.H. (1979) Feeding and multiplication of three cereal aphid species and their effect on yield of winter wheat. Wageningen, Netherlands PUDOC Agricultural Research Report 88.

Wratten S.D., Watt A.D., Carter N., Entwistle J.C. (1990) Economic consequences of pesticide use for grain aphid control on winter wheat in 1984 in England. *Crop Protect.* 9, 73-78.

Synthèse des programmes de recherche 2008



Retrouvez l'ensemble des informations
sur les programmes de recherches sur le site

fsov.org



Section Céréales et Protéagineux
44, rue du Louvre - 75001 Paris
Tél. : 01 42 33 79 09
E-mail : fsov@gnis.fr



ISBN - 978 - 2 - 36397 - 068 - 8



Juin 2013 - D0060

