HAL open science

Stratégie de résistance durable aux nématodes à galles chez les porte-greffe de [i]Prunus[/i] par pyramidage : marquage à haute résolution d'un gène du pêcher et localisation fine d'un gène de l'amandier

Henri Duval, Cyril van Ghelder, Martin Masse, G. Roch, Hugo Hussie, Daniel Esmenjaud

To cite this version:

Henri Duval, Cyril van Ghelder, Martin Masse, G. Roch, Hugo Hussie, et al.. Stratégie de résistance durable aux nématodes à galles chez les porte-greffe de [i]Prunus[/i] par pyramidage : marquage à haute résolution d'un gène du pêcher et localisation fine d'un gène de l'amandier. Innovations Agronomiques, 2016, 50, pp.59-68. 10.15454/1.4721091038488276E12 . hal-01323663

HAL Id: hal-01323663

https://hal.science/hal-01323663

Submitted on 28 Feb 2023

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.

Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Stratégie de résistance durable aux nématodes à galles chez les porte-greffe de *Prunus* par pyramidage : marquage à haute résolution d'un gène du pêcher et localisation fine d'un gène de l'amandier

Duval H.[1], Van Ghelder C.[2], Masse M.[1], Roch G.[3], Hussié H.[1,3], Esmenjaud D.[2]

[1] INRA, UR1052, Unité de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes (GAFL), 84143 Montfavet, France
[2] INRA, UMR 1355 Institut Sophia Agrobiotech, 06900 Sophia Antipolis, France
Univ. Nice Sophia Antipolis, UMR 7254 Institut Sophia Agrobiotech, 06900 Sophia Antipolis, France
CNRS, UMR 7254 Institut Sophia Agrobiotech, 06900 Sophia Antipolis, France
[3] SARL 'CEP Innovation', 69364 Lyon, France

Correspondance : daniel.esmenjaud@sophia.inra.fr

Résumé

Les nématodes à galles (*Meloidogyne* spp.) sont de ravageurs extrêmement polyphages des racines et dont l'impact est très important à l'échelle globale. La stratégie de résistance aux espèces prédominantes *M. arenaria, M. incognita* et *M. javanica*, est une alternative prioritaire chez de nombreuses plantes cultivées confrontées au retrait des nématicides et notamment chez les arbres fruitiers du genre *Prunus*. Trois gènes majeurs dominants de résistance, *Ma* (prunier), *RMia* (pêcher) et *RMja* (amandier), ont été identifiés et cartographiés dans cet objectif. Le pyramidage de ces trois gènes, par exemple dans des hybrides 3-voies, ouvre la voie à la création de porte-greffe protégés par au moins deux gènes vis-à-vis de chacune des espèces de nématodes précitées. Du fait de l'interaction durable entre ces plantes pérennes et les nématodes, ce pyramidage garantit la création de matériels dotés d'une durabilité de résistance sans précédent au niveau mondial. La sélection assistée par marqueurs (SAM) du gène *Ma,* à spectre complet et cloné (famille des TIR-NB-LRRs (TNLs)), est possible grâce à des marqueurs SCAR intragéniques chez la source P.2175. Nous présentons donc ici les résultats des travaux sur les gènes *RMia* et *RMja* conduits dans le cadre d'un projet soutenu par le Ministère de l'Agriculture.

Une cartographie à haute résolution du gène *RMia* chez la source Nemared, par marqueurs SSR (simple sequence repeat) et SNP (single nucleotide polymorphism), a été entreprise notamment dans une descendance F2 [Montclar (sensible) x Nemared]. Des marqueurs SNP ont permis de localiser le gène dans un intervalle physique de 92 kb du génome de référence du pêcher Lovell contenant 3 gènes candidats de type TNL. Le gène *RMja* porté par l'amandier Alnem, dont le marquage fin est en cours à partir de 800 individus de la population F2 [Lauranne (sensible) x Alnem]), a été situé dans un intervalle d'environ 2 Mb contenant également l'orthologue de *Ma*. L'obtention prochaine de la séquence NGS des parents Lauranne et Alnem permettra d'assurer un marquage à haute résolution de *RMja* et ainsi de disposer des outils de SAM pour les trois gènes de résistance.

Mots-clés : *Meloidogyne* spp., *Prunus*, porte-greffe, résistance durable, gène majeur, pêcher, prunier, amandier

Abstract: Pyramiding strategy for durable resistance to root-knot nematodes in *Prunus* rootstocks: high-resolution mapping of a peach gene and fine location of an almond gene

Root-knot nematodes (RKN) (*Meloidogyne* spp.) are extremely polyphagous pests with a high economical impact at the global scale. In many crops and notably in fruit trees from the genus *Prunus*, the resistance strategy to the predominant species *M. arenaria, M. incognita* and *M. javanica* is a priority alternative to meet nematicide removal. The three major dominant resistance (*R*) genes, *Ma* (plum), *RMia* (peach) and *RMja* (almond), have been identified and mapped in this objective. Pyramiding all three *R* genes opens the way to breeding rootstocks protected by at least two of them towards each of

the RKN species previously mentioned and it will guarantee the creation of plant material with an unprecedented resistance durability worldwide. Marker-assisted selection (MAS) of the *Ma* gene (TIR-NB-LRR (TNL) family) with a complete spectrum, is possible using intragenic SCAR markers from the source P.2175. We report here the results of our work on the *RMia* and *RMja* genes conducted in a project funded by the French Ministry of Agriculture.

High resolution mapping with SSR and SNP markers was obtained for *RMia* in Nemared notably from an F2 population [Montclar (susceptible) x Nemared)]. This gene was localized within a 92-kb physical interval in the Lovell peach reference genome which contains 3 TNL candidate-genes. The fine mapping of the *RMja* gene, from the Alnem almond source, is still in progress. *RMja* was located in an approx. 2 Mb interval containing also the *Ma* orthologous gene. Next availability of the NGS sequence from the parents Lauranne and Alnem will make it possible to obtain high-resolution *RMja* markers and will permit MAS tools to be available for all three *R* genes.

Keywords: *Meloidogyne* spp., *Prunus*, rootstock, durable resistance, major gene, peach, plum, almond

Introduction

Les nématodes à galles (*Meloidogyne* spp.) sont de ravageurs polyphages des racines dont l'impact est estimé à l'échelle mondiale à plusieurs dizaines de milliards d'Euros par an (Jones et al., 2013). Les espèces dont les dégâts sont les plus élevés, *M. arenaria, M. incognita* et *M. javanica*, se reproduisent par parthénogénèse mitotique et ont une gamme d'hôtes comportant plusieurs milliers d'espèces végétales ((De Guiran et Netscher, 1970). La plupart des cultures maraîchères, fruitières ou ornementales conduites en zone de climat méditerranéen ou chaud sont affectées par ces graves ravageurs des cultures. Alors que ces espèces sont à ce jour rarement retrouvées en régions tempérées plus froides, hormis en culture sous abri, le réchauffement climatique contribuera de plus en plus à leur présence sous ces latitudes. Leur contrôle était assuré jusqu'à récemment par la lutte chimique mais le retrait des molécules nématicides en raison de leur toxicité élevée pour l'environnement rend désormais urgente la mise au point de méthodes alternatives. La polyphagie de ces nématodes ne permet pas d'utiliser la rotation culturale et la résistance naturelle des plantes apparaît donc comme une stratégie prometteuse.

Les cultures pérennes du genre *Prunus* en région méditerranéenne sont fortement atteintes par les nématodes à galles et sont souvent responsables, par les échanges à longue distance et dans le marché de plus en plus mondialisé des plants ligneux de pépinière, de la dissémination de ces ravageurs. Leur impact est largement documenté sur les principales espèces fruitières à noyau que sont le pêcher, l'amandier et le prunier. La création de matériel résistant aux *Meloidogyne* est un critère prioritaire dans les programmes d'amélioration des porte-greffe de *Prunus* dans de nombreux pays et notamment aux USA (Reighard, 2002).

Des sources de résistance ont été identifiées dans plusieurs espèces de *Prunus* (Nyczepir et Esmenjaud, 2007). Les travaux sur leur déterminisme génétique, entrepris dès la première moitié du 20ème siècle chez le pêcher (Weinberger et al., 1943), ont également concerné l'amandier (Kochba et Spiegel-Roy, 1975) et plus récemment le prunier (Esmenjaud et al., 1996b; Lecouls et al., 1999). Mais les informations permettant de conduire une sélection assistée par marqueurs ont d'abord été obtenues chez le prunier (Lecouls et al., 2004). Aujourd'hui, plusieurs gènes de résistance ont été identifiés : le premier d'entre eux, le gène *Ma* chez le prunier myrobolan, contrôle la totalité des espèces de nématodes à galles attaquant les *Prunus* (Esmenjaud et al., 2009; Lecouls et al., 2004; Nyczepir et Esmenjaud, 2007). L'intérêt de ce gène, aujourd'hui cartographié (chromosome 7) et cloné, est accru par le fait qu'aucune population le contournant, tant au champ qu'en conditions contrôlées, n'a été

détectée à ce jour (Esmenjaud et al., 1996a; Esmenjaud et al., 1994; Khallouk et al., 2013). Chez le pêcher un gène de résistance à *M. arenaria* et *M. incognita*, suspecté dès les années 1960 chez la source Nemaguard (Sharpe et al., 1969), a été cartographié sur le chromosome 2 (Claverie et al., 2004) : ce gène nommé *RMia* est donc indépendant de *Ma*. Chez l'amandier une résistance monogénique portée par les amandiers amers de la série Alnem (Kochba et Spiegel-Roy, 1975) et agissant sur l'espèce *M. javanica* a été identifiée en Israël et le gène correspondant nommé *RMja* est lié au gène *Ma* (Van Ghelder et al., 2010). La disponibilité de ces gènes chez trois espèces différentes de *Prunus*, mais qui peuvent s'hybrider, a permis de mettre en place un projet de création de porte-greffe de type interspécifique afin de cumuler leurs spectres de résistance. Lorsque les gènes seront pyramidés, le matériel obtenu permettra de contrôler chacune des trois espèces prédominantes de nématodes à galles, *M. arenaria, M. incognita* et *M. javanica*, par deux facteurs de résistance différents, ce qui représente une stratégie unique à ce jour vis-à-vis de ces nématodes chez les plantes (Tableau 1). C'est vers cet objectif que se sont focalisés les travaux de marquage rapportés ci-après.

Depuis 2011 des marqueurs SCAR sont disponibles pour le gène *Ma* (CT3-4N et NSCAFLP2) (Claverie et al., 2011) mais pour les gènes *RMia* et *RMja*, localisés grâce à des croisements trois-voies d'effectifs limités, on ne disposait pas de marqueurs de sélection assistée (SAM) fiables et d'usage aisé. La disponibilité du génome du pêcher (variété Lovell) a modifié le contexte de la recherche dans ce domaine en mettant un outil très performant à la portée des équipes d'amélioration des *Prunus* et notamment de celles qui travaillent sur les porte-greffe de pêcher (Gillen et Bliss, 2005; Lu et al., 1999; Yamamoto et Hayashi, 2002). Des marqueurs peuvent ainsi être générés afin de développer la SAM sur des gènes d'intérêt. Une des clefs du succès de ces travaux réside dans la capacité des équipes à phénotyper avec rigueur (choix et pureté des espèces appropriées de nématodes ; Tableau 1) le matériel végétal en ségrégation.

Sachant que des marqueurs sont à ce jour utilisables pour le gène *Ma* du prunier myrobolan (Claverie et al., 2011), nous présentons les recherches et résultats obtenus pour le marquage des deux autres gènes. Ils concernent le marquage du gène *RMia* chez le pêcher Nemared, conduit vis-à-vis de l'espèce *M. incognita,* et les travaux en cours dans cet objectif sur le gène *RMja* de la source Alnem, conduits sur l'espèce *M. javanica*. Lors du projet, les effectifs des descendances en ségrégation pour le gène *RMia* étaient immédiatement disponibles et ont permis le marquage haute résolution de ce dernier. En revanche, les semences F2 en ségrégation pour le gène *RMja* n'ont été récoltées qu'en 2014. Les travaux de phénotypage et de génotypage ont donc été mis en place en 2015 et nous rapportons ici les résultats partiels obtenus sur ce matériel à la date de rédaction de cet article.

Matériel et méthodes

Matériel animal

Un isolat de chacune des espèces de nématodes à galles, *M. incognita* et *M. javanica,* a été utilisé. Le premier isolat, *M. incognita* 'Avignon' est conservé au sein de l'Unité de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes (UGAFL) d'Avignon. Le second, *M. javanica* 'Higuera', fait partie de la collection de *Meloidogyne* spp. de l'UMR Institut Sophia Agrobiotech (ISA). L'identité des espèces a été confirmée par leur profil iso-enzymatique (esterases b) (Janati et al., 1982) et leur multiplication assurée sur des plants de tomate.

Matériel végétal

Deux types de matériel végétal intraspécifique ont été utilisés dans notre étude.

Nature et origine du matériel utilisé pour le marquage du gène *RMia* chez la source Nemared.

La source Nemared est issue de semis F3 entre le porte-greffe résistant Nemaguard et un pêcher sensible à feuilles rouges (Ramming et Tanner, 1983). Le matériel intraspécifique en ségrégation pour le gène *RMia* a été obtenu à partir de deux types de croisements. Le premier est un croisement F2

(dénommé F2 MN) entre Nemared (N) et le porte-greffe sensible Montclar (M) et comprend 373 individus. Le deuxième est une descendance de 2ème génération obtenue en croisant deux individus F1 : “Pamirskij x Rubira” et “Montclar x Nemared”, dénommée (PRMN) et comprenant 417 individus. Les accessions Pamirskij (P) and Rubira (R) sont sensibles à toutes les espèces de *Meloidogyne*. Ce croisement PRMN entre dans un projet de création variétale intraspécifique de porte-greffe pêcher portant les résistances monogéniques au puceron vert du pêcher *Myzus persicae* (source Rubira) et à l’oïdium du pêcher *Sphaerotheca pannosa* (source Pamirskij) (Lambert et Pascal, 2011; Pascal et al., 2010).

Nature et origine du matériel utilisé pour le marquage du gène *RMja* chez la source Alnem.

Parmi les semis résistants *RMja* de la population Alnem, les sources utilisées sont les clones Alnem1 et Alnem88, homozygotes au locus *RMja*. Ces clones ont été croisés avec la variété Lauranne, sensible aux nématodes puis plusieurs individus F1 ont été autofécondés pour donner des familles F2. Un effectif total d’environ 900 individus en ségrégation a été obtenu à partir des familles F2. Les résultats partiels rapportés ici concernent quatre familles représentant 428 individus (Tableau 2).

Tableau 1. Spectre de résistance aux *Meloidogyne* des sources *Prunus* du projet et des trois gènes majeurs correspondants et spectre attendu par pyramidage dans un exemple du type ‘hybride 3-voies’. R, resistant ; S, sensible

Porte-greffe	***M. arenaria***	***M. incognita***	***M. javanica***	***M. floridensis***
Pêcher, amandier ou prunier communs	**S**	**S**	**S**	**S**
Sources de résistance				
Prunier myrobolan **P.2175**	**R**	**R** *Ma*	**R**	**R**
Pêcher **Nemared**	**R** *RMia*	**R**	**R/S**	**S**
Amandier **Alnem1** **Alnem88**	**R** *?*	S	**R** *RMja*	**S**
Hybride 3-voies **P.2175 x Alnem x Nemared**	*RMia*		*RMja*	*Ma*

Tests de phénotypage

Evaluation des descendances en ségrégation de pêcher (gène RMia).

L’évaluation de chaque individu issu de semis a été conduite en pot et l’inoculation réalisée par inoculation de masses d’œufs de *M. incognita* isolées à partir de la plante-hôte tomate. L’inoculum moyen apporté est de 10 000 juvéniles et œufs par plante. Les quatre parents ont été évalués dans les mêmes conditions que les individus hybrides. Les plants, maintenus en serre à une température supérieure à 18 °C, ont été inoculés fin mars et évalués en juin après 75 jours par une notation présence-absence de galles sur les racines. Les plants dont le système racinaire est indemne de galles ont été classés comme résistants (R) alors que ceux portant une ou plusieurs galles ont été notés sensibles (S).

Evaluation des descendances en ségrégation d'amandier (gène *RMja*).

L'évaluation des semis d'amandier a été conduite selon une méthode basée sur l'application d'une pression élevée d'inoculum. A partir du mois de mai, les plants des descendances en ségrégation et leurs parents ont été associés par deux dans un même conteneur puis une tomate sensible a été repiquée dans chaque conteneur. En parallèle, un inoculum abondant de *M. javanica* a été produit sur d'autres tomates afin d'assurer une multiplication massive de ce nématode. L'inoculation des conteneurs de *Prunus* a été effectuée en début d'été par apport du substrat dans lequel les racines de tomate fortement attaquées (galles racinaires contenant les œufs et larves infectieuses du nématode) ont été soigneusement mélangées. Les larves infectieuses ont ainsi attaqué à la fois la tomate et les plants de *Prunus* de chaque pot. La tomate associée aux deux plants de *Prunus* dans chaque pot a été conservée durant deux mois afin de permettre le développement de deux cycles de multiplication et d'assurer ainsi une pression élevée d'inoculum sur les *Prunus* durant toute la durée du test. Cette méthode garantit un phénotypage extrêmement fiable après plusieurs mois qui compense notamment les différences très marquées de développement entre individus à l'intérieur d'une même famille ou entre familles différentes. La notation des attaques est effectuée sur la base d'un indice de galles (échelle de 0 à 5) qui peut être évalué tardivement en automne et permet de séparer la classe résistante (R), indemne de galles, et la classe sensible (S) dont les plants sont attaqués de façon significativement plus forte.

Extraction d'ADN et analyses PCR

De jeunes feuilles terminales ont été récoltées sur les jeunes plants issus de semis au printemps et congelées à -80°C jusqu'à l'extraction d'ADN. L'ADN génomique total a été extrait en utilisant des kits appropriés. Le dosage de l'ADN a été effectué et sa qualité évaluée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % et comparaison avec du lambda DNA. Les amplifications par PCR ont été réalisées comme décrit précédemment (Duval et al., 2014). Les produits PCR ont été séparés sur gel d'agarose ou au moyen d'un séquenceur capillaire utilisant une amorce marquée avec un fluorochrome (Applied Biosystems *3730* DNA Analyzer).

Développement de marqueurs

L'obtention de marqueurs de résistance s'est appuyée sur la séquence en ligne de la version V1 du génome du pêcher (variété sensible Lovell) à partir de la base GDR (Genome Database for Rosaceae: http://www.rosaceae.org) (Verde et al., 2013).

Marquage haute résolution du gène *RMia*.

Dans une première étape des marqueurs de type SSR (simple sequence repeat ; microsatellite) ont été dessinés dans l'intervalle physique contenant le gène. L'outil GDR SSR server tool a été utilisé avec les paramètres suivants : répétitions de di-nucléotides ou tri-nucléotides et longueur de l'unité répétée d'un minimum de 20 nucléotides. Les amorces spécifiques ont ensuite été dessinés avec le logiciel 'Primer3' (Rozen and Skaletsky, 2000). Le marquage haute résolution du gène a ensuite été effectué dans une deuxième étape par séquençage puis génotypage par la méthode KASP™. Pour cela des fragments de 1 kb répartis sur l'ensemble de l'intervalle encadrant le gène ont été générés avec des amorces spécifiques dessinées avec le logiciel Primer3. Les produits PCR ont été séquencés par Eurofins MWG Operon (Germany). La détection de marqueurs de type SNP (single nucleotide polymorphism) a été conduite en utilisant le logiciel Codon code aligner (http://www.codoncode.com/aligner). Le génotypage KASP™ a été conduit selon le protocole défini par LGC Genomics (http://www.lgcgenomics.com/genotyping/kasp-genotyping-reagents/).

Marquage du gène *RMja*.

Les marqueurs encadrants CPPCT022 et CPSCT026 définis par Van Ghelder et al. (Van Ghelder et al., 2010) comme polymorphes sur un croisement interspécifique impliquant amandier et prunier myrobolan ont été utilisés. Les marqueurs SSR, CPSCT004, CPPCT039, CPPCT050 et UDP98-405, localisés

dans la même région et issus de la carte amandier-pêcher Texas x Early Gold (Joobeur et al., 1998) ont également été sélectionnés pour réaliser une première carte locale du gène *RMja*. Leur polymorphisme de résistance vis-à-vis de *M. javanica* a été testé sur une sous-population avant d'être évalué sur la totalité des 428 individus phénotypés.

Résultats

Marquage haute résolution du gène RMia *du pêcher*

Le phénotypage des individus des deux descendances a permis de séparer clairement les individus sensibles et résistants et de confirmer la ségrégation F2 de type 3 R : 1 S dans la descendance F2 MN (274 individus résistants et 92 individus sensibles ; $\chi2=0.18$; $p > 0.96$) et de type 1R : 1 S dans la descendance PRMN (193 individus résistants et 219 individus sensibles ; $\chi2=0.70$; $p > 0.39$).

Avant le début de ces travaux, l'intervalle flanquant le gène était formé sur le chromosome 2, par le marqueur SCARMia, en position télomérique à 4 154 855 bp et le marqueur STS-OPS14a (Claverie et al., 2004) en position centromérique à 5 225 743 bp. La première étape du marquage a détecté cinq nouveaux marqueurs SSR dans cet intervalle. Des fragments spécifiques de Nemared ont été obtenus pour chacun de ces marqueurs polymorphes (AMPP115 à AMPP119). Les 10 individus recombinants entre les deux marqueurs extrêmes AMPP115 et AMPP119 ont réduit l'intervalle encadrant le gène à une distance de 300 kb entre les marqueurs internes AMPP116 et AMPP117. Dans cet intervalle physique, les fragments de 1 kb amplifiés et séquencés environ tous les 20 kb ont permis de définir des SNPs. Le polymorphisme des couples de marqueurs SNP définis pour les quatre recombinants résiduels a réduit l'intervalle du gène à une distance de 92 kb située entre les SNPs 'SNP_A20' et 'SNP_A26' (marqueur KASP™_A26). L'examen de la séquence du fragment génomique a révélé la présence d'un cluster de gènes dans cet intervalle chez le pêcher. Il s'agit de quatre ORFs (ppa023253m, ppa018595m, ppa000501m et ppa023503m) qui correspondent à trois gènes candidats de type TIR-NB-LRR (TNL) (Figure 1). Le détail de ces résultats de marquage a été publié dans la revue Tree Genetics & Genomes en 2014 (Duval et al., 2014). Les deux premiers ORFs appartiennent vraisemblablement à un seul gène dans lequel s'est intégré un élément transposable. Un marqueur SNP (SNP_APP92) a été obtenu dans la région promotrice du gène-candidat ppa023253m (Figure 1).

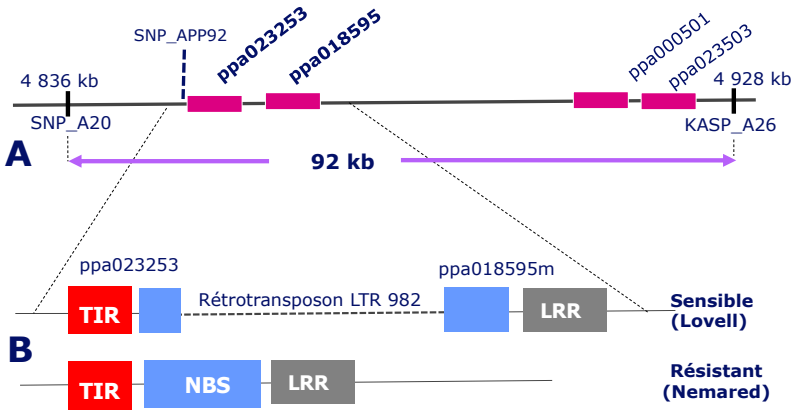

Figure 1. A - Intervalle final du gène *RMia* contenant des gènes TNL candidats. B - Polymorphisme d'un gène tronqué (rétrotransposon) dans le génome du pêcher sensible Lovell comparé avec le gène non tronqué du parent résistant Nemared. Les valeurs donnent les bornes de l'intervalle de 92 kb sur le chromosome 2 du génome de Lovell. La position du marqueur SNP_APP92 dans le promoteur du gène-candidat ppa023253 est indiquée.

Ségrégation, localisation du gène RMja *de l'amandier et liaison avec le gène* Ma *sur le chromosome 7*

Les 428 individus issus des quatre familles F2 évaluées sous pression forte et durable d'inoculum du nématode ont pu être phénotypés et répartis de façon nette dans les deux classes résistante (R) et sensible (S). Les effectifs sont distribués en 299 R : 129 S (Tableau 2). Les marqueurs CPSCT004, CPPCT039 et CPPCT022, localisés dans la région du gène sur le chromosome 7, se sont montrés polymorphes. A partir de ces marqueurs, une carte locale place le gène *RMja* à l'intérieur d'un intervalle de 1,9 Mb bordé par CPPCT039 (positionné à 8 339 000 pb) et CPPCT022 (positionné à 10 225 000 pb) (Figure 2). Dans cet intervalle, 23 individus recombinants ont été détectés (Tableau 2). Cet intervalle contient l'orthologue du gène *Ma* chez le pêcher. La définition de nouveaux marqueurs polymorphes dans cet intervalle permettra de préciser la localisation du gène à partir du phénotype des individus recombinants à chacun d'entre eux. Cette information de recombinaison (23 recombinants sur 428 individus, soit 5,4 %) diffère sensiblement de celle de distance physique (1,9 Mb sur 22,7 Mb de longueur totale du chromosome soit 8,4 %). Une analyse bio-informatique de la séquence dans cet intervalle met en évidence plusieurs clusters de gènes de résistance de type TNL auxquels il est vraisemblable que le gène *RMja* appartienne.

Tableau 2 : Ségrégation du gène *RMja* et recombinaison entre marqueurs encadrants (CPPCT039 et CPPCT022) au sein de quatre familles F2 issues du croisement entre Alnem (*RMja/RMja*) et Lauranne (*rmja/rmja*).

Famille	Effectif	Ségrégation R/S	Individus recombinants
115	89	57 R : 32 S	10
148	94	65 R : 29 S	2
166	191	139 R : 52 S	7
167	54	38 R : 16 S	4
Total	**428**	**299 R : 129 S**	**23**

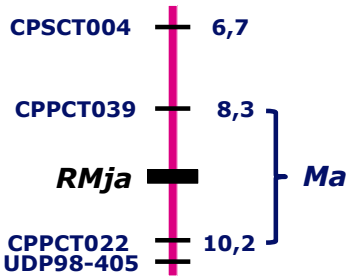

Figure 2. Carte locale du gène *RMja* sur le chromosome 7 du pêcher. Les chiffres à droite des marqueurs représentent la position en Mb de ces derniers sur le chromosome. L'intervalle contenant *RMja* contient également l'orthologue du gène *Ma*.

Conclusion - Perspectives

Réaliser des études sur le déterminisme génétique de l'interaction incompatible entre des ravageurs racinaires et leurs espèces-hôtes pérennes est difficile du fait de la durée des cycles des plantes. Vis-à-vis des nématodes, ces difficultés sont accrues par l'impossibilité d'une observation directe des symptômes étant donnée leur localisation sur les racines. Malgré cette limitation, plusieurs gènes de résistance ont pu être mis en évidence chez chacune des espèces principales de *Prunus,* prunier, pêcher et amandier. Chez le prunier, le gène TNL *Ma*, conférant un spectre complet, a été cloné et validé et son marquage est aujourd'hui acquis en utilisant des SCARs définis dans sa séquence génomique.

Afin de poursuivre dans cette voie, les travaux rapportés ici font état d'avancées majeures dans le marquage de la résistance conférée par les gènes *RMia* du pêcher et *RMja* de l'amandier. Les éléments principaux ont porté sur le marquage haute résolution du gène *RMia*. Celui-ci a été localisé dans un

intervalle final inférieur à 100 kb et 3 gènes de résistance y sont présents comme candidats à *RMia.* Le marquage de ce gène *RMia* peut être effectué au moyen d'un marqueur de type SSR proche tel que AMP117 ainsi que par deux marqueurs de type SNP encadrant l'intervalle final de 100 kb. Disposer de ces marqueurs garantit aujourd'hui la sélection assistée par marqueur de *RMia*.

L'obtention trop récente de grands effectifs en ségrégation pour le gène *RMja* n'a pas permis d'obtenir des marqueurs aussi résolutifs de ce gène. Toutefois le phénotypage et le génotypage du reliquat d'environ 400 individus se poursuit. Afin de détecter de nouveaux marqueurs dans la région *RMja*, les deux parents Lauranne et Alnem sont en cours de séquençage haut débit à la plate-forme génomique MGX de l'IGF de Montpellier. Les deux séquences obtenues seront alignées sur celle du génome de référence du pêcher. L'analyse des variants génomiques entre les deux génomes permettra de détecter des séquences répétées ou des SNPs pour la définition de marqueurs dans la région cible. Dans l'hypothèse où les séquences de l'amandier Alnem et du pêcher de référence sont très divergentes, la séquence du génome amandier, en cours de construction à partir de la variété sensible Texas, garantira l'alignement entre les deux génomes de la même espèce (l'un sensible et l'autre résistant). Des couples d'amorces spécifiques polymorphes de type SSR ou SNP seront définis afin de génotyper les recombinants disponibles et ainsi de marcher vers le gène. A ce stade de nos travaux, il n'est pas exclu que le gène *RMja* soit un paralogue ou un orthologue de *Ma*. Les marqueurs à haute résolution du gène *RMja* attendus ouvrent la voie à la sélection assistée de porte-greffe cumulant les trois gènes de résistance grâce à la disposition des outils de SAM pour chacun d'entre eux.

Remerciements

Ce travail a été effectué dans le cadre du Projet CASDAR 'Pyrédune' 2011-2014 (**Py**ramidage de gènes par sélection assistée pour une **ré**sistance **du**rable aux **né**matodes *Meloidogyne* chez les porte-greffe *Prunus*) financé par le Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (Projet CTPS n°C-2011-01).

Références bibliographiques

Claverie, M., Bosselut, N., Lecouls, A.C., Voisin, R., Lafargue, B., Poizat, C., Kleinhentz, M., Laigret, F., Dirlewanger, E., Esmenjaud, D., 2004. Location of independent root-knot nematode resistance genes in plum and peach. Theoretical and Applied Genetics 108, 765-773.

Claverie, M., Dirlewanger, E., Bosselut, N., Van Ghelder, C., Voisin, R., Kleinhentz, M., Lafargue, B., Abad, P., Rosso, M.N., Chalhoub, B., Esmenjaud, D., 2011. The *Ma* gene for complete-spectrum resistance to *Meloidogyne* species in *Prunus* is a TNL with a huge repeated C-terminal post-LRR region. Plant Physiology 156, 779-792.

De Guiran, G., Netscher, G., 1970. Les nématodes du genre *Meloidogyne* parasites des cultures tropicales. Cahiers de l'ORSTOM, Serie Biologie 3, 151-185.

Duval, H., Hoerter, M., Polidori, J., Confolent, C., Masse, M., Moretti, A., Van Ghelder, C., Esmenjaud, D., 2014. High-resolution mapping of the *RMia* gene for resistance to root-knot nematodes in peach. Tree Genetics & Genomes 10, 297-306.

Esmenjaud, D., Minot, J.C., Voisin, R., 1996a. Effects of durable inoculum pressure and high temperature on root galling, nematode numbers and survival of Myrobalan plum genotypes (*Prunus cerasifera* Ehr) highly resistant to *Meloidogyne* spp. Fundamental and Applied Nematology 19, 85-90.

Esmenjaud, D., Minot, J.C., Voisin, R., Bonnet, A., Salesses, G., 1996b. Inheritance of resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne arenaria* in Myrobalan plum. Theoretical and Applied Genetics 92, 873-879.

Esmenjaud, D., Minot, J.C., Voisin, R., Pinochet, J., Salesses, G., 1994. Inter- and intraspecific resistance variability in Myrobalan plum, peach, and peach-almond rootstocks using 22 root-knot nematode populations Journal of the American Society for Horticultural Science 119, 94-100.

Esmenjaud, D., Voisin, R., Van Ghelder, C., Bosselut, N., Lafargue, B., Di Vito, M., Dirlewanger, E., Poessel, J.L., Kleinhentz, M., 2009. Genetic dissection of resistance to root-knot nematodes

Meloidogyne spp. in plum, peach, almond, and apricot from various segregating interspecific *Prunus* progenies. Tree Genetics & Genomes 5, 279-289.

Gillen, A.M., Bliss, F.A., 2005. Identification and mapping of markers linked to the *Mi* gene for root-knot nematode resistance in peach. Journal of the American Society for Horticultural Science 130, 24-33.

Janati, A., Bergé, J.B., Triantaphyllou, A.C., Dalmasso, A., 1982. Nouvelles données sur l'utilisation des isoestérases pour l'identification des Meloidogyne. Revue de Nématologie 5, 147-154.

Jones, J.T., Haegeman, A., Danchin, E.G.J., Gaur, H.S., Helder, J., Jones, M.G.K., Kikuchi, T., Manzanilla-Lopez, R., Palomares-Rius, J.E., Wesemael, W.M.L., Perry, R.N., 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology 14, 946-961.

Joobeur, T., Viruel, M.A., Vicente, M.C.d., Jauregui, B., Ballester, J., Dettori, M.T., Verde, I., Truco, M.J., Messeguer, R., Batlle, I., Quarta, R., Dirlewanger, E., Arus, P., 1998. Construction of a saturated linkage map for Prunus using an almond * peach F 2 progeny. Theoretical and Applied Genetics 97, 1034-1041.

Khallouk, S., Voisin, R., Portier, U., Polidori, J., Van Ghelder, C., Esmenjaud, D., 2013. Multiyear evaluation of the durability of the resistance conferred by *Ma* and *RMia* genes to *Meloidogyne incognita* in *Prunus* under controlled conditions. Phytopathology 103, 833-840.

Kochba, J., Spiegel-Roy, P., 1975. Inheritance of resistance to the root-knot nematode (*Meloidogyne iavanica* Chitwood) in bitter almond progenies. Euphytica 24, 453-457.

Lambert, P., Pascal, T., 2011. Mapping Rm2 gene conferring resistance to the green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer) in the peach cultivar "Rubira". Tree Genetics and Genomes 7, 1057-1068.

Lecouls, A.C., Bergougnoux, V., Rubio-Cabetas, M.J., Bosselut, N., Voisin, R., Poessel, J.L., Faurobert, M., Bonnet, A., Salesses, G., Dirlewanger, E., Esmenjaud, D., 2004. Marker-assisted selection for the wide-spectrum resistance to root-knot nematodes conferred by the *Ma* gene from Myrobalan plum (*Prunus cerasifera*) in interspecific *Prunus* material. Molecular Breeding 13, 113-124.

Lecouls, A.C., Rubio-Cabetas, M.J., Minot, J.C., Voisin, R., Bonnet, A., Salesses, G., Dirlewanger, E., Esmenjaud, D., 1999. RAPD and SCAR markers linked to the *Ma1* root-knot nematode resistance gene in Myrobalan plum (*Prunus cerasifera* Ehr.). Theoretical and Applied Genetics 99, 328-335.

Lu, Z.X., Sossey-Alaoui, K., Reighard, G.L., Baird, W.V., Abbott, A.G., 1999. Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance, and its application to peach rootstock breeding. Theoretical and Applied Genetics 99, 115-122.

Nyczepir, A., Esmenjaud, D., 2007. Peach nematodes. In: Wayne, D.R., Bassi, D. (Eds.), The Peach: Botany, Production and Uses. CAB Editions, New-York, pp. 505-535.

Pascal, T., Pfeiffer, F., Kervella, J., 2010. Powdery mildew resistance in the peach cultivar Pamirskij 5 is genetically linked with the Gr gene for leaf color. Hortscience 45, 150-152.

Ramming, D.W., Tanner, O., 1983. Nemared peach rootstock. HortScience 18, 376.

Reighard, G.L., 2002. Current directions of peach rootstock programs worldwide. Acta Horticulturae 592, 421-427.

Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods in molecular biology 132, 365-386.

Sharpe, R.H., Hesse, C.O., Lownsbery, B.A., Perry, V.G., Hansen, C.J., 1969. Breeding peaches for root-knot nematode resistance. Journal of the American Society for Horticultural Science 94, 209-212.

Van Ghelder, C., Lafargue, B., Dirlewanger, E., Ouassa, A., Voisin, R., Polidori, J., Kleinhentz, M., Esmenjaud, D., 2010. Characterization of the *RMja* gene for resistance to root-knot nematodes in almond: spectrum, location, and interest for *Prunus* breeding. Tree Genetics & Genomes 6, 503-511.

Verde, I., Abbott, A.G., Scalabrin, S., Jung, S., Shu, S., Marroni, F., Zhebentyayeva, T., Dettori, M.T., Grimwood, J., Cattonaro, F., Zuccolo, A., Rossini, L., Jenkins, J., Vendramin, E., Meisel, L.A., Decroocq, V., Sosinski, B., Prochnik, S., Mitros, T., Policriti, A., Cipriani, G., Dondini, L., Ficklin, S., Goodstein, D.M., Xuan, P., Del Fabbro, C., Aramini, V., Copetti, D., Gonzalez, S., Horner, D.S., Falchi, R., Lucas, S., Mica, E., Maldonado, J., Lazzari, B., Bielenberg, D., Pirona, R., Miculan, M., Barakat, A., Testolin, R., Stella, A., Tartarini, S., Tonutti, P., Arus, P., Orellana, A., Wells, C., Main, D., Vizzotto, G., Silva, H., Salamini, F., Schmutz, J., Morgante, M., Rokhsar, D.S., 2013. The high-quality draft genome

of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. Nature genetics 45, 487-494.

Weinberger, J.H., Marth, P.C., Scott, D.H., 1943. Inheritance study of root-knot nematode resistance in certain peach varieties. Proceedings of the American Society for Horticultural Science 42, 321-325.

Yamamoto, T., Hayashi, T., 2002. New root-knot nematode resistance genes and their STS markers in peach. Scientia Horticulturae 96, 81-90.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL)