



HAL
open science

Diversité et stabilité des facteurs génétiques de résistance aux principales maladies fongiques du pois protéagineux

Marie-Laure Pilet-Nayel, Céline Hamon, Anne Moussart, M. Roux-Duparque, Caroline Onfroy, Christophe Le May, Bernard Tivoli, Alain Baranger

► To cite this version:

Marie-Laure Pilet-Nayel, Céline Hamon, Anne Moussart, M. Roux-Duparque, Caroline Onfroy, et al.. Diversité et stabilité des facteurs génétiques de résistance aux principales maladies fongiques du pois protéagineux. *Innovations Agronomiques*, 2014, 35, pp.27-38. 10.17180/7qc0-3377 . hal-01462724

HAL Id: hal-01462724

<https://hal.science/hal-01462724>

Submitted on 27 May 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.



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

Diversité et stabilité des facteurs génétiques de résistance aux principales maladies fongiques du pois protéagineux

Pilet-Nayel M.L.^{1*}, Hamon C.¹, Moussart A.^{1,2}, Roux-Duparque M.³, Onfroy C.^{1,2}, Le May C.⁴, Tivoli B.¹, Baranger A.¹

¹ INRA, UMR1349 IGEPP, F-35653 Le Rheu

Adresse actuelle : Céline Hamon : Vegenov-BBV, Penn ar Prat, F-29250, Saint Pol de Léon

² UNIP-CETIOM, 11 rue de Monceau, F-75378 Paris Cedex 08

³ GSP, Domaine Brunehaut, F-80200, Estrées-Mons

Adresse actuelle : Chambre d'Agriculture de l'Aisne, 1 rue René Blondelle, F-02007, Laon Cedex

⁴ Agrocampus-Ouest, UMR IGEPP, 65 rue de Saint Brieuc, F-35042 Rennes

* Correspondance : Marie-Laure.Pilet@rennes.inra.fr

Résumé

Le pois protéagineux est une culture d'importance économique en Europe, pour sa valeur protéique en alimentation animale et sa valeur environnementale dans les rotations céréalières. Cependant, le développement de la culture se heurte à plusieurs facteurs limitants, dont deux principales maladies fongiques, la pourriture racinaire due à *Aphanomyces euteiches* et l'ascochyte due à *Didymella pinodes*. L'amélioration génétique de la résistance quantitative partielle à ces deux maladies constitue un enjeu majeur pour le développement durable de méthodes de lutte intégrant la résistance variétale comme composante incontournable. Cet article dresse une synthèse de l'état des connaissances actuelles sur i)- la diversité des facteurs génétiques contrôlant la résistance quantitative à *A. euteiches* et à *D. pinodes* en fonction de la variabilité et de composantes du développement épidémique des deux agents pathogènes, ii)- la stabilité de leurs effets en fonction des environnements et des fonds génétiques et iii)- le niveau de conservation des locus de résistance à *A. euteiches* entre le génome du pois et celui de la légumineuse modèle *Medicago truncatula* pour approcher leurs fonctions. Il décrit les programmes de création de géniteurs exploitant les résistances génétiques étudiées, mis en place pour soutenir la création variétale, ainsi que les stratégies envisagées de cumul de QTL pour la construction de résistances efficaces et durables à ces principales maladies chez le pois.

Mots clés : ascochyte, *Aphanomyces*, QTL, sélection, création de géniteurs, populations pathogènes, composantes épidémiologiques, *Medicago truncatula*, synténie

Abstract: Diversity and stability of genetic factors controlling resistance to main fungal diseases in dry pea

Dry pea is an economically important crop in Europe, for its protein value in animal feed and its environmental value in cereal rotations. The development of the pea crop has been hampered by several limiting factors, among which two main fungal diseases, *Aphanomyces* root rot due to *Aphanomyces euteiches* and ascochyta blight due to *Didymella pinodes*. Plant breeding for quantitative partial resistance to both diseases is a high priority for the sustainable development of control methods integrating resistant varieties as an essential component. This manuscript draws up a synthetic state of current knowledge about i)- the diversity of genetic factors controlling quantitative resistance to *A. euteiches* and *D. pinodes* depending on the variability and components of epidemic development of the two pathogens, ii)- the stability of resistance QTL effects depending on environments and genetic backgrounds and iii)- the conservation level of *Aphanomyces* resistance loci between the pea and *Medicago truncatula* genomes for approaching resistance QTL functions. The manuscript describes pea germplasm breeding programs integrating the genetic resistances studied, for supporting breeding of pea varieties, as well as future QTL pyramiding strategies for the development of efficient and durable resistances to both diseases in pea.

Keywords: ascochyte, Aphanomyces, QTL, selection, germplasm breeding, pathogen populations, epidemiologic components, *Medicago truncatula*, synteny

Introduction

Dans un contexte d'incitation à la réduction d'usage des fongicides et de contournement fréquent des résistances génétiques en agriculture, la dissection génétique des résistances quantitatives aux maladies, *a priori* plus durables que les résistances monogéniques, a beaucoup progressé depuis une quinzaine d'années avec le développement des outils moléculaires et de la génomique. Cependant, même si de nombreux locus génétiques de résistance quantitative (ou QTL, Quantitative Trait Locus) ont été identifiés dans divers pathosystèmes, leur exploitation en sélection reste difficile du fait de l'instabilité de leurs effets, en partie due à leurs interactions avec l'environnement et le fonds génétique. Par ailleurs, leur diversité vis-à-vis du cycle et de la variabilité de la plante et de l'agent pathogène, ainsi que leurs fonctions, restent encore peu connues chez les plantes (Kou et Wang, 2010). Une meilleure connaissance de la diversité et de la stabilité des QTL de résistance aux maladies, ainsi que de leurs fonctions, notamment par exploitation de la synténie avec les espèces modèles, permettra d'optimiser les stratégies de combinaison et/ou de déploiement des locus de résistance, et ainsi d'augmenter les niveaux de résistance chez les plantes tout en limitant l'adaptation des populations pathogènes.

Le pois protéagineux est une culture d'importance économique en Europe, pour sa valeur protéique en alimentation animale et sa valeur environnementale dans les rotations céréalières (fixation d'azote atmosphérique). Depuis une quinzaine d'années, les surfaces cultivées en pois ont été fortement impactées par l'instabilité des rendements causée par différents stress biotiques et abiotiques, dont deux maladies fongiques majeures, la pourriture racinaire précoce due à *Aphanomyces euteiches* et l'ascochyte due à *Didymella pinodes*. En l'absence de lutte chimique efficace ou tolérable (plan Ecophyto) contre ces maladies, l'utilisation de facteurs génétiques de résistance quantitative partielle pour la création de variétés résistantes (Baranger et al., 2010) est considérée comme une stratégie majeure de lutte contre ces maladies, en combinaison avec des méthodes de lutte culturales et prophylactiques. Néanmoins, il n'existe aucune variété de pois résistante à l'une ou l'autre de ces deux maladies commercialisée à ce jour, notamment du fait des difficultés de la sélection à exploiter ces résistances quantitatives.

La connaissance i)- de la diversité des locus génétiques contrôlant ces résistances (§III) en fonction de la variabilité (§I) et de composantes du développement épidémique (§II) de l'agent pathogène, ii)- de la stabilité de leurs effets en fonction des environnements et des fonds génétiques (§III), et iii)- de leur niveau de conservation entre le génome du pois et celui de la légumineuse modèle *Medicago truncatula* pour approcher leurs fonctions (§IV), permettra d'envisager des stratégies de cumul de QTL pour la construction de résistances efficaces et durables aux principales maladies chez le pois (§V, §VI).

I- Diversité des populations pathogènes

I-1- Diversité des populations d'*A. euteiches*

Une première étude de diversité des populations d'*A. euteiches*, réalisée par Wicker et al. (2001), à partir d'une collection de souches françaises et américaines avait permis de mettre en évidence l'existence de deux pathotypes majeurs : le pathotype I, présent en France et aux Etats-Unis, et le pathotype III, présent uniquement aux Etats-Unis. Plus récemment, la variabilité du pathogène a été étudiée spécifiquement dans les pépinières de sélection françaises et américaines dans lesquelles ont été évaluées les populations de lignées recombinantes ayant permis de mettre en évidence des QTL de résistance à *A. euteiches*.

La virulence et l'agressivité de 51 isolats issus de trois pépinières françaises (25 isolats) et quatre pépinières américaines (26 isolats) naturellement infestées par *A. euteiches*, ont été évaluées sur une gamme différentielle de 6 génotypes de pois et une gamme différentielle de 5 génotypes de *M. truncatula*. Sur la gamme de génotypes de pois, aucun nouveau pathotype n'a été identifié : le pathotype I a été observé dans les pépinières françaises et américaines, et le pathotype III uniquement dans les pépinières américaines, certaines étant infestées par l'un ou l'autre des pathotypes, d'autres par les deux pathotypes. En revanche, l'utilisation de la gamme différentielle de génotypes de *M. truncatula* a permis la caractérisation de deux nouveaux groupes d'isolats, selon leur origine géographique, i.e. un groupe français et un groupe américain. Les isolats américains sont moins agressifs sur la gamme différentielle de pois que les isolats français, mais plus agressifs que les isolats français sur la gamme différentielle de *M. truncatula*. Par ailleurs, des différences d'agressivité ont été observées au sein des pépinières et entre pépinières étudiées, indépendamment de leur origine géographique. Enfin, les isolats français et américains présentaient également des optimums thermiques différents. Les résultats de cette étude suggèrent que les populations d'*A. euteiches* présentes en France et aux Etats-Unis ont été soumises à des pressions de sélection et des mécanismes d'évolution différents.

I-2- Diversité des populations de *D. pinodes*

L'analyse de 144 isolats de *D. pinodes* échantillonnés pendant la saison culturale dans une parcelle de pois d'hiver et dans une parcelle de pois de printemps a été effectuée afin de tester l'hypothèse de l'existence de deux populations différentes de *D. pinodes*, spécialisées sur culture de pois de printemps ou de pois d'hiver, soumises à des régimes d'humidité et de température différents. Les données de génotypage de l'ensemble des isolats, à l'aide de marqueurs dominants de type AFLP, ont montré que les populations de *D. pinodes* isolées de pois de printemps et d'hiver étaient génétiquement polymorphes, mais qu'aucune différenciation n'était observée entre populations d'isolats échantillonnés sur pois d'hiver et sur pois de printemps. Les données de phénotypage obtenues pour 35 isolats (18 isolats collectés sur pois d'hiver, et 17 isolats collectés sur pois de printemps), à l'aide d'un test sur feuilles détachées (Onfroy et al., 2007) sur une gamme de quatre génotypes résistants ou sensibles de pois soumis à trois régimes climatiques (hiver, hiver tardif, et printemps), ont montré que les isolats échantillonnés sur pois d'hiver et pois de printemps ne présentaient pas de spécialité selon le régime climatique ou le génotype de pois testé. Pour tous les isolats phénotypés, la sévérité de la maladie était moins importante i) en conditions « hiver » par rapport aux conditions « printemps » et ii) sur les génotypes de pois résistants par rapport aux génotypes sensibles. Les isolats phénotypés n'ont donc pas présenté de spécialisation aux conditions de développement ou à leur hôte. L'ensemble de ces résultats suggère ainsi que le développement de l'ascochytose sur pois d'hiver et de printemps est initié par une unique population de *D. pinodes*, dans laquelle la pathogénicité serait un trait de vie plastique et modulé par le statut physiologique de la plante hôte (Le May et al., 2012a).

L'ensemble des nouvelles connaissances ainsi acquises sur la variabilité des souches d'*A. euteiches* et de *D. pinodes*, en termes notamment de virulence et d'agressivité sont déterminantes, d'une part, pour l'identification de QTL spécifiques de certain(e)s souches/pathotypes et, d'autre part, pour la définition des critères de choix des QTL à suivre dans le cadre des programmes de sélection.

II- Composantes épidémiologiques de résistance

L'identification des composantes du développement épidémique d'un agent pathogène affectées par la résistance partielle passe par la mise au point de méthodes d'étude fine de l'évolution de la maladie, l'identification des composantes épidémiologiques associées à la résistance partielle sur une gamme de génotypes différentiels, et la mise au point d'un test simple et rapide applicable à des quantités importantes de matériel végétal.

II-1- Composantes épidémiologiques de résistance à *D. pinodes*

L'expression de la résistance partielle du pois en conditions de contamination par *D. pinodes* a été étudiée en utilisant une méthode fine, consistant à déposer une goutte de suspension de spores sur stipules de pois détachées maintenues en survie (Onfroy et al., 2007). Deux composantes du développement de l'agent pathogène impactées par la résistance partielle chez la plante ont été plus particulièrement identifiées et suivies : l'apparition des ponctuations et l'extension des lésions. Les facteurs déterminant les conditions optimales pour l'observation de la résistance partielle ont été identifiés : il s'agit de l'âge de la colonie fongique avant la récolte des spores, la concentration des spores, ainsi que la pathogénicité de l'isolat utilisé lors de l'inoculation. La résistance partielle ne s'exprime pas lorsque la concentration de spores est trop élevée ou lorsque l'isolat utilisé est trop agressif. Les résultats obtenus avec ce test rapide qui permet de décomposer les étapes du cycle épidémique affectées par la résistance sont significativement corrélés avec ceux obtenus en utilisant le test plus global de criblage sur jeunes plantes.

II-2- Composantes épidémiologiques de résistance à *A. euteiches*

Un test non destructif en rhizotrons, permettant l'identification de composantes du développement d'*A. euteiches* affectées par la résistance partielle du pois, a été mis au point. Le dispositif permet d'observer régulièrement au travers d'une plaque transparente, à la fois le développement des racines et l'évolution journalière de la maladie sur le système racinaire. Les observations portent sur des critères d'architecture racinaire (nombre de radicules visibles, longueur de la racine principale) et de maladie (apparition des premiers symptômes, évolution des nécroses sur la racine principale et les radicules). Les expérimentations réalisées sur une gamme différentielle de génotypes (Wicker et al., 2001) ont permis de mettre en évidence deux composantes du développement épidémique d'*A. euteiches* affectées par la résistance de la plante : la durée d'incubation et la vitesse d'extension des symptômes. Il apparaît que la résistance partielle de certains génotypes joue sur l'une ou l'autre de ces composantes, celle d'autres génotypes (tel que PI180693 présentant le niveau de résistance le plus élevé de la gamme différentielle) présente un effet sur les deux composantes.

Ces tests d'évaluation de l'évolution de l'ascochytose et de la pourriture racinaire sur pois, permettant d'identifier finement les étapes du développement épidémique affectées par la résistance partielle, peuvent désormais être utilisés en routine sur un grand nombre de génotypes. Notamment pour les études de génétique de la résistance, ils permettront d'identifier des QTL de résistance chez la plante présentant un effet sur les composantes du développement épidémique de *D. pinodes* et d'*A. euteiches* impactées par la résistance.

III- Diversité et stabilité des QTL de résistance

La diversité des locus génétiques de résistance à *A. euteiches* et *D. pinodes*, s'exprimant vis-à-vis des principales composantes de la variabilité et du développement épidémique des agents pathogènes décrits précédemment (§I, §II), a été étudiée dans différentes sources de résistance. Leur stabilité d'expression a également été analysée vis-à-vis de différents environnements.

III-1- QTL de résistance à *A. euteiches*

L'analyse génétique de la résistance à *A. euteiches* a été effectuée à partir de quatre populations de lignées recombinantes (LR) issues de croisements biparentaux entre quatre sources de résistance partielle identifiées aux USA (90-2079, 90-2131, PI180693, 552) et trois variétés sensibles (Puget, DSP et Baccara). A partir de l'ensemble des données de génotypage et de phénotypage obtenues sur ces populations (Tableau 1), un total de 27 méta-QTL de résistance a été identifié, incluant 7 régions génomiques majeures, détectée de manière très stable dans deux à quatre populations de LR à partir d'au moins 12 variables initiales (Hamon, 2010 ; Hamon et al., 2013 ; Figure 1).

Tableau 1 : Cartes génétiques et données de phénotypage obtenues à partir des différentes populations de lignées recombinantes (LR) étudiées pour l'analyse génétique de la résistance à *A. euteiches* et à *D. pinodes* chez le pois.

Croisement (souligné : lignée résistante)	Lignées recombinantes (Génération) - Origine	Carte génétique	Phénotypage au champ	Phénotypage en conditions contrôlées	Références
Résistance partielle à <i>Aphanomyces euteiches</i>					
Baccara x <u>552</u>	178 (F9) - INRA	224 mqs (1652 cM kos)	6 environnements FR/USA sur 4 lieux, 2 années	2 souches : RB84 (FR), Ae109 (USA)	Hamon et al., 2011
Baccara x <u>PI180693</u>	178 (F8) - INRA		8 environnements FR/USA sur 4 lieux, 3 années		
DSP x <u>90-2131</u>	111 (F10) - USDA	168 mqs (1046 cM kos)	11 environnements FR/USA sur 5 lieux, 4 années	6 souches : RB84, Ae78, Ae85, Ae106 (FR) ; Ae87, Ae109 (USA)	Hamon et al., 2013 Hamon, 2010
Puget x <u>90-2079</u>	127 (F10) - USDA	324 mqs (1094 cM kos)	4 environnements USA sur 2 lieux, 2 années	3 souches : Ae87, Ae109 (USA) ; Ae106 (FR)	Pilet-Nayel et al., 2002, 2005
Résistance partielle à <i>Didymella pinodes</i>					
<u>Champagne</u> x Térése	164 (F9) - INRA	262 mqs (1491 cM kos)	2 environnements FR, 2 années	3 souches, plantules entières et feuilles détachées	Giorgetti, 2013
J1296 x <u>DP</u>	135 (F9) - INRA	351 mqs (1992 cM kos)	2 environnements FR, 2 années	3 souches, plantules entières et feuilles détachées	Prioul et al., 2004
J1296 x <u>FP</u>	144 (F8) - INRA	216 mqs (1881 cM kos)	2 environnements FR, 2 années	3 souches, plantules entières et feuilles détachées	Giorgetti, 2013

(i) Une diversité modérée des locus de résistance a été observée vis-à-vis des sources de résistance, suggérant l'existence de bases génétiques communes entre les lignées parentales partiellement résistantes étudiées. La quasi-totalité des méta-QTL regroupant au moins deux QTL initiaux ont en effet été détectés à partir d'au moins deux populations de LR, chacun comportant deux à cinq allèles contribuant à la résistance, selon les méta-QTL, issus des parents résistants voire des parents sensibles.

(ii) Une faible spécificité des QTL de résistance a également été mise en évidence en fonction des deux principaux pathotypes d'*A. euteiches* décrits. En effet, les cinq régions génomiques détectées pour la résistance au pathotype III d'*A. euteiches* ont été également associées à la résistance au pathotype I (Hamon et al., 2011). La faible spécificité des QTL a également été observée vis-à-vis de différents critères de notations (racinaire, aérien) et conditions de test (chambre climatique, champ) réalisés à différents stades de développement de la plante. Par ailleurs, une grande stabilité d'expression de la

plupart des QTL vis-à-vis de différents environnements a été observée, seuls 5 des 27 méta-QTL identifiés ayant été détectés spécifiquement à partir d'environnements français ou américains.

(iii) Des associations négatives entre allèles de résistance et allèles de traits morphologiques ou phénologiques défavorables à la sélection du pois protéagineux ont été identifiées, spécialement dans la source de résistance PI180693 aux QTL *AePs1.2*, *AePs2.2* et *AePs3.1* (respectivement, associations résistance/feuilles normales, production d'anthocyanes et tardiveté). Des associations alléliques positives ont également été mises en évidence, particulièrement au QTL *AePs5.1* (association résistance/graines lisses) (Figure 1).

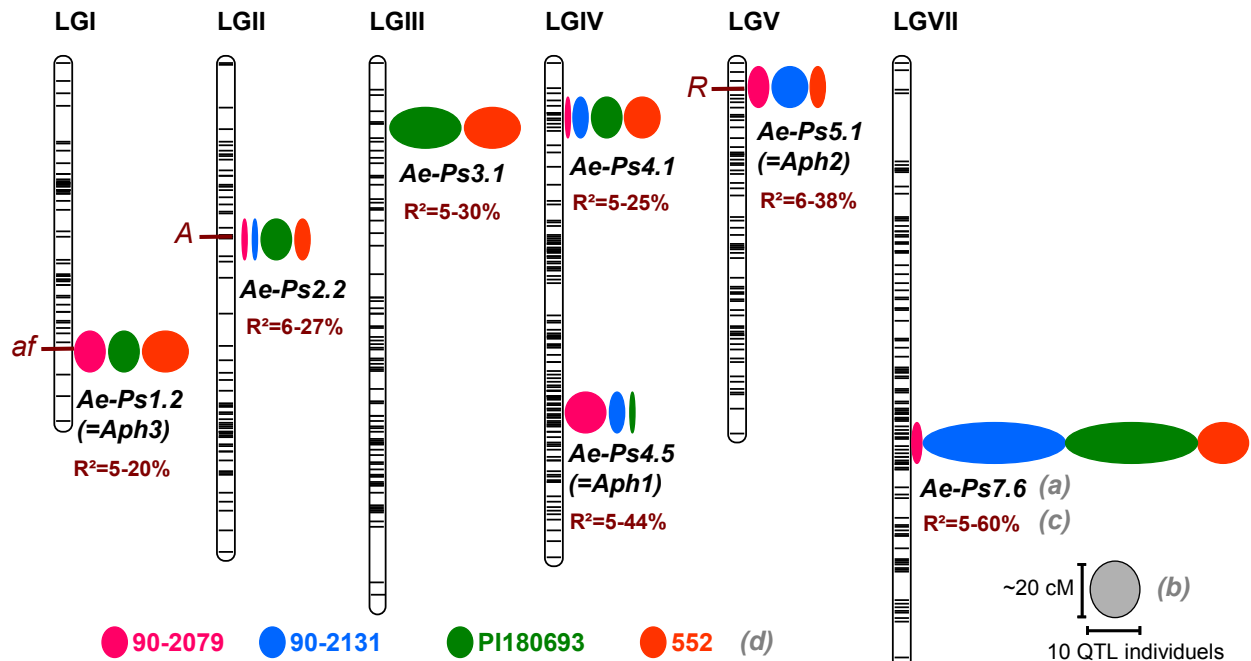


Figure 1 : Sept principales régions génomiques (QTL) identifiées pour la résistance à *A. euteiches* chez le pois, à partir de 4 populations de lignées recombinantes issues de croisements biparentaux impliquant 4 sources de résistance partielle (90-2079, 90-2131, 552, PI180693), évaluées dans des environnements multiples (Tableau 1).

(a) noms des QTL d'après Hamon et al. (2011) et entre parenthèses, d'après Pilet-Nayel et al. (2002). (b) = longueur de chaque ovale représentant l'intervalle de confiance de chaque QTL ; largeur de chaque QTL proportionnelle au nombre de variables ayant permis sa détection (variables = indexes de nécrose racinaire et/ou de dépérissement aérien obtenus dans 7 à 17 environnements différents en conditions contrôlées ou au champ, selon les populations de LR). (c) = % de variation phénotypique minimum et maximum expliqué par chaque QTL, selon les variables. (d) =sources de résistance. LG = groupes de liaison; Af, A and R : gènes codant pour des caractères morphologiques (feuilles normales/afila, production d'anthocyanes, graines lisses/ridées).

III-2- QTL de résistance à *D. pinodes*

L'analyse génétique de la résistance à *D. pinodes* a été réalisée à partir de de trois populations de lignées recombinantes issues de croisements biparentaux entre trois sources de résistance de pois fourrager (DP et Champagne) ou protéagineux (FP) et deux cultivars sensibles, l'un potager (JI 296) et l'autre protéagineux (Térèse). A partir de données de de cartographie génétique basées essentiellement sur des marqueurs microsatellites, et de phénotypage des populations en conditions contrôlées vis-à-vis de trois souches d'agressivité variée et au champ dans une gamme restreinte d'environnements (Tableau 1), quatre QTL principaux contrôlant la résistance à *D. pinodes* ont été identifiés sur les groupes de liaison III, V et VI. Ces QTL ont été caractérisés comme (i) stables vis-à-vis

des organes sur lesquels est évaluée la résistance (stipule ou tige), (ii) stables en fonction de l'agressivité des souches considérées (iii) stables vis-à-vis d'au moins deux des trois sources de résistance considérées. En outre, plusieurs QTL ont été caractérisés comme contrôlant soit spécifiquement soit conjointement les composantes de résistance identifiées par Onfroy et al (2007), i.e. l'apparition des ponctuations et l'extension des lésions. Enfin, deux QTL ont colocalisé avec deux gènes majeurs contrôlant l'élongation des entre-nœuds (*Le*) et la sensibilité à la photopériode pour l'initiation de la floraison (*Hr*) sur le groupe de liaison III (Figure 1bis) (Giorgetti, 2013). Le QTL de résistance à *D. pinodes* colocalisant avec le gène *Hr* a été identifié dans la même région génomique que le QTL *Ae-Ps3.1* de résistance à *A. euteiches*.

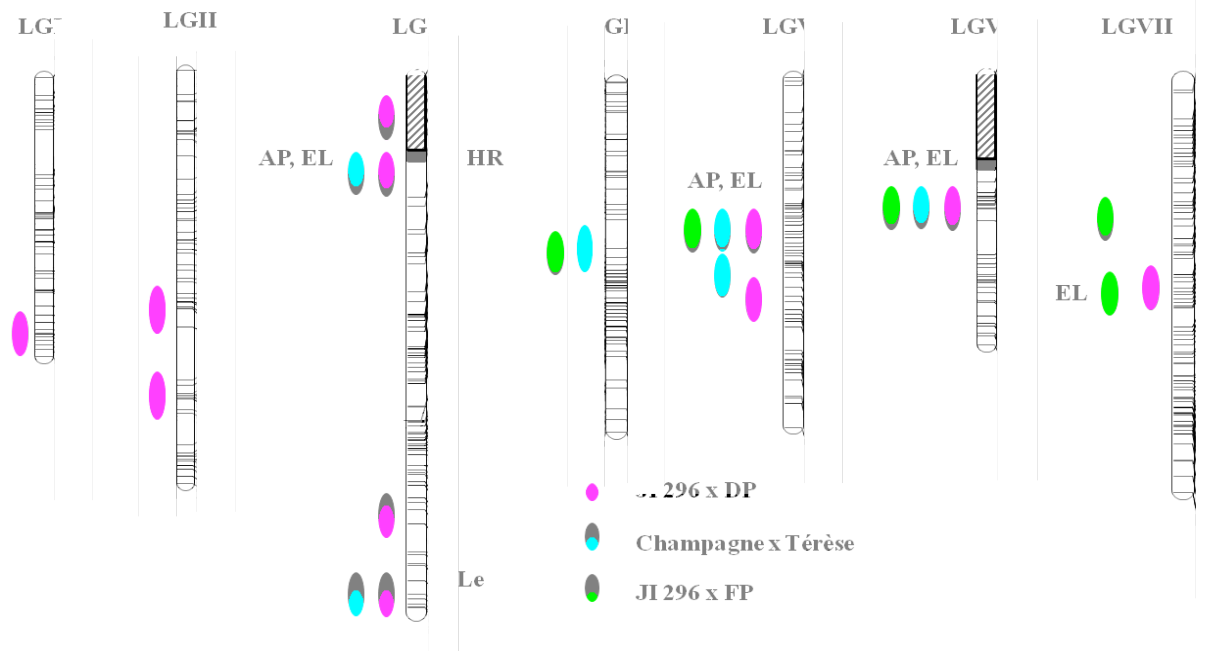


Figure 1 bis : Principales régions génomiques (QTL) identifiées pour la résistance à *D. pinodes* chez le pois, à partir de 3 populations de lignées recombinantes issues de croisements biparentaux impliquant 3 sources de résistance partielle (FP, DP, Champagne) (Tableau 1). AP : apparition des ponctuations ; EL : extension des lésions

IV- Cartographie comparée des locus de résistance entre le pois et *M. truncatula*

L'exploitation de l'espèce légumineuse modèle *M. truncatula* constitue une stratégie pour mieux identifier les bases moléculaires de la résistance aux stress chez le pois, du fait i) du niveau de conservation élevé (homologie de séquences, synténie) observé entre les génomes du pois et de *M. truncatula* (Choi et al., 2004; Aubert et al., 2006) et ii) des nombreuses ressources biologiques et génomiques développées chez cette légumineuse modèle depuis les années 2000 (Young et Udvardi, 2009, <http://www.medicago.org/>). Cette stratégie a été développée pour l'étude des bases génomiques de la résistance à *A. euteiches*. *M. truncatula* est hôte d'*A. euteiches* et présente une large variabilité génétique pour la résistance/sensibilité à cet agent pathogène (Moussart et al., 2007a). A partir de deux populations de LR, l'analyse génétique de la résistance réalisée chez *M. truncatula*, a permis de mettre en évidence une région génomique à effet majeur (locus *AER1*) ou partiel (locus *prAe1*), selon la population, à large spectre d'action vis-à-vis des pathotypes d'*A. euteiches* décrits chez le pois et la luzerne, ainsi qu'un réseau d'autres locus génétiques plus spécifiques de certaines souches (Pilet-Nayel et al., 2009; Djebali et al., 2009; Hamon et al., 2010). La région *AER1/prAe1* est en cours de clonage en vue d'identification et de validation fonctionnelle de gènes orthologues chez le pois.

Par ailleurs, le développement et la cartographie génétique ou *in silico* de 22 marqueurs «ponts» dans les zones génomiques associées à la résistance à *A. euteiches* chez *M. truncatula* et chez le pois a permis d'identifier à ce jour cinq régions potentiellement synténiques contrôlant la résistance à *A. euteiches* chez les deux espèces. L'une d'entre elles correspond à la région synténique *AER1/prAe1* co-localisant avec un QTL mineur identifié chez le pois (*Ae-Ps3.2*), ayant été spécialement détectée chez les deux espèces à partir de données de résistance à la souche française RB84 isolée du pois (Hamon, 2010, Figure 2).

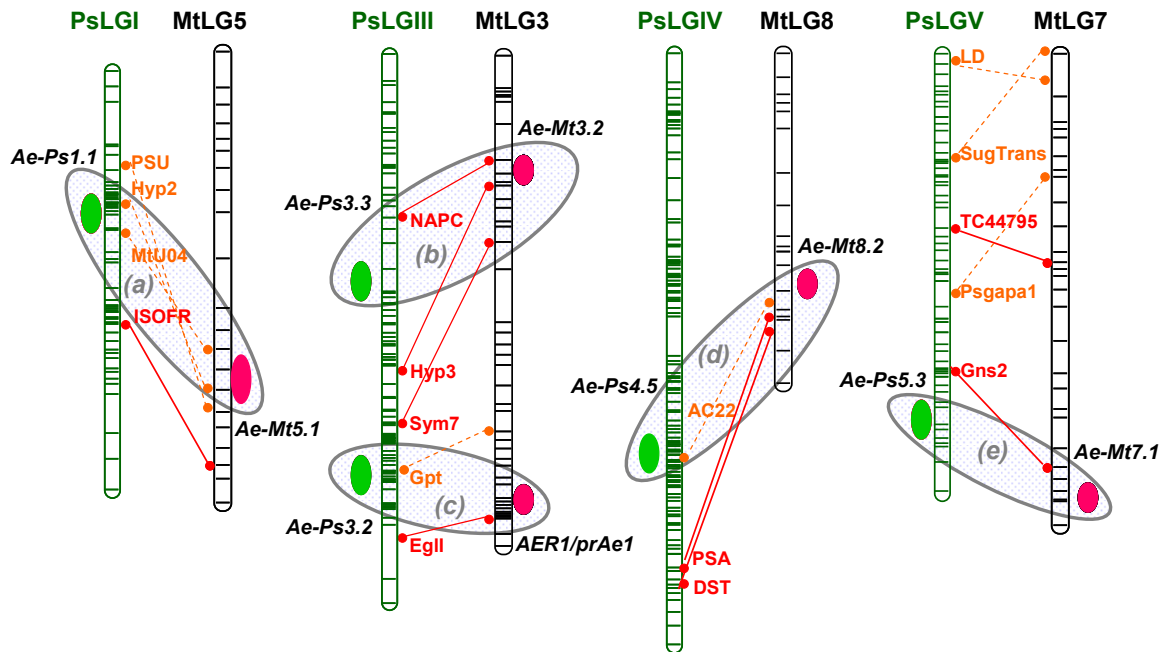


Figure 2 : Cartographie comparée de locus de résistance à *A. euteiches* identifiés à partir de 4 populations de LR chez le pois (Hamon, 2010 ; Hamon et al. 2011, 2013) et de deux populations de LR chez *M. truncatula* (Djebali et al. 2009 ; Hamon et al., 2010).

(a), (b), (c), (d), (e) : cinq zones génomiques de synténie potentielle entre des locus de résistance à *A. euteiches* identifiés sur les groupes de liaison du pois (PsLG) et de *M. truncatula* (MtLG). Les QTL de résistance à *A. euteiches* identifiés chez le pois et chez *M. truncatula* sont représentés, respectivement, par des ovales verts et rouges. Les marqueurs "ponts" cartographiés génétiquement chez les deux espèces sont indiqués en rouge, ceux cartographiés génétiquement chez le pois et *in silico* chez *M. truncatula* sont indiqués en orange.

V- Création de géniteurs de résistance

Les sources de résistance à *A. euteiches* et *D. pinodes* utilisées pour l'analyse génétique de la résistance chez le pois (§III, Tableau 1) ont été exploitées dans des programmes de sélection phénotypique récurrente, pour la création de géniteurs de bon niveau agronomique présentant des niveaux de résistance partielle, disponibles pour la sélection variétale.

V-1- Création de géniteurs de résistance à *A. euteiches*

Depuis 2001, 46 géniteurs issus de quatre programmes de sélection du GSP (Groupement des Sélectionneurs de Pois Protéagineux) initiés entre 1995 et 1999 à partir de croisements impliquant essentiellement les sources de résistance 90-2131, PI180693 et 552 (§III, Tableau 1), ont été identifiés pour leur niveau de résistance/tolérance à *A. euteiches*, d'une part, en conditions contrôlées et, d'autre part, sur un réseau multi-local et pluriannuel de pépinières infestées par *A. euteiches* (Roux-Duparque et al., 2004 ; Moussart et al., 2007b). Le matériel génétique issu du dernier programme (AeD99) présente un net progrès pour le niveau de résistance/tolérance à *A. euteiches*, associé à une

amélioration de l'aspect agronomique (matériel court, à grain lisse, de feuillage afila et à fleur blanche pour la majorité).

Une population de 110 lignées de validation de QTL (lignées parentales et lignées de sélection) a été établie, sur la base du matériel généré dans trois des quatre programmes de sélection du GSP. La stratégie employée a consisté à identifier ou sélectionner, deux pools de lignées, respectivement, résistantes et sensibles, dans lesquels les allèles de résistance aux principaux QTL identifiés pourront être tracés et leurs fréquences comparées.

En particulier, à partir du dernier programme de sélection (AeD99), 16 lignées sensibles et 37 lignées résistantes, issues de trois croisements impliquant essentiellement les meilleures F1 des programmes précédents, ont été créées en 2005 par sélection phénotypique divergente. Les trois croisements (nommés O, S et W) à l'origine de la sélection de ces lignées sont les suivants : O: (Rustic x 200) x (Capella x Mn314) ; S: (90-2131 x PI180693) x (Capella x Mn314) et W: (90-2131 x PI180693) x 552. PI180693, 90-2131 et 552 sont les témoins de référence partiellement résistants utilisés en France et constituent les parents résistants de trois des quatre populations de LR utilisées pour l'analyse génétique de la résistance à *A. euteiches* (§III, Tableau 1). La lignée 200 est issue du programme de sélection récurrente de E. Gritton (Wisconsin, USA ; Lewis et Gritton, 1992). La lignée Mn314 est issue du programme de sélection de D. Davis (Minnesota, USA, Davis et al. 1995). Rustic et Capella sont des variétés de pois protéagineux sensibles à *A. euteiches*. Les 53 lignées sélectionnées dans cette population divergente ont été évaluées en conditions contrôlées et au champ de 2005 à 2007, sur un réseau multi-local de sept sites fortement infestés par *A. euteiches* et cinq sites sains, répartis dans sept départements français. Parmi les lignées présentant un niveau de résistance intrinsèque en conditions contrôlées supérieur à celui du témoin PI180693, quatorze lignées, essentiellement issues du croisement W, ont également un niveau de résistance au champ sur racines supérieur ou égal à celui du témoin résistant 552. Ces résultats montrent i)- qu'il est possible d'augmenter les niveaux de résistance à *A. euteiches* par cumul d'allèles favorables et ii)- qu'un bon niveau de résistance intrinsèque n'est pas toujours suffisant pour conférer un bon comportement au champ. Les lignées présentant un bon comportement au champ présenteraient des combinaisons favorables d'allèles de résistance et/ou de tolérance à la maladie.

Ces populations de validation de QTL permettront d'identifier des combinaisons d'allèles de résistance aux sept principaux QTL, associées à un niveau élevé de résistance à *A. euteiches* en conditions contrôlées et au champ, ainsi que d'identifier des marqueurs d'intérêt pour remplacer au moins une partie des tests de résistance dans les programmes de sélection.

V-2- Programme de création de géniteurs de résistance à *D. pinodes*

Un programme de sélection récurrente pour la création de géniteurs de résistance partielle à *D. pinodes* a été développé à l'INRA, visant à créer des géniteurs agronomiques cumulant des comportements de résistance partielle à *D. pinodes* issus de différentes sources complémentaires, dont les sources FP et DP étudiées par ailleurs par analyse de liaison génétique. La démarche a consisté successivement en (i) la création d'une population de base issue d'un croisement pyramidal à huit parents résistants et/ou agronomiques, (ii) l'homogénéisation de cette population pour des caractères agronomiques indispensables pour l'intégration de ce matériel dans des programmes de création variétale, comme la précocité à la floraison, le feuillage afila, le nanisme ou la couleur blanche des fleurs, (iii) son criblage pour la résistance partielle en conditions contrôlées et au champ dans différents environnements, (iv) la réintégration en croisement des meilleures lignées pour la réalisation d'un second cycle de sélection, incluant de nouvelles sources de résistance et de nouveaux cultivars. Ce projet, mené en collaboration avec le GSP, a permis la production de 29 géniteurs agronomiques montrant une résistance partielle à l'ascochytose identique à celle des meilleurs témoins et des caractéristiques agronomiques acceptables, ce qui les rend directement utilisables en création variétale (Wissocq, 2003). Un deuxième cycle pyramidal réintégrant ces lignées a été engagé au cours du contrat de branche 2006-2008 et a

permis la création d'hybrides 4 voies et l'engagement de leur fixation par autofécondation, mais ce programme a ensuite été interrompu faute de moyens.

VI- Perspectives : Vers la SAM pour la construction de résistances efficaces et durables

L'ensemble des résultats acquis de dissection génétique de la résistance quantitative partielle à *A. euteiches* et à *D. pinodes* et de création de géniteurs de résistance chez le pois permet d'envisager le développement de stratégies de cumul de QTL par Sélection Assistée par Marqueurs (SAM) pour la construction de résistances efficaces et durables. L'ensemble des marqueurs et géniteurs créés et décrits dans les parties §III et §V de cet article sont à disposition des sélectionneurs pour favoriser la SAM dans le domaine de la sélection privée.

L'introggression et le cumul de QTL de résistance à *A. euteiches* dans différentes lignées de pois de printemps et d'hiver agronomiques ou élites ont été initiés à l'INRA en 2008, par back-cross assisté par marqueurs. Le programme a consisté en cinq schémas parallèles de croisement visant, dans chaque schéma, à introgresser simultanément des allèles de résistance à un, deux ou trois des sept QTL principaux de résistance à *A. euteiches* décrits en §III, dans trois fonds génétiques (Contrat de Branche SAMPOIS 2009-2011). Des lignées quasi-isogéniques pour un à trois QTL seront ainsi créées et pourront être intercroisées en vue de sélectionner des lignées isogéniques cumulant plus de trois QTL de résistance. L'évaluation phénotypique des lignées créées permettra de valider l'effet des sept principaux QTL de résistance à *A. euteiches* dans différents fonds génétiques et d'identifier des combinaisons de QTL permettant d'augmenter les niveaux de résistance. Il permettra également d'obtenir du matériel végétal d'intérêt pour la sélection du pois protéagineux et pour la recherche, spécialement en vue de caractériser plus finement les modes d'action et les fonctions associé(e)s aux principaux QTL de résistance (ANR-PEAMUST 2012-2019).

L'utilisation des QTL identifiés de résistance à l'ascochytose en SAM doit tenir compte du rôle de l'architecture de la plante et du couvert sur le développement des épidémies d'ascochytose au champ. Ce point a été étudié dans le cadre du projet ANR Systerra Archidemio, qui visait notamment à proposer un modèle couplé du développement de la plante et du pathogène en conditions de culture en parcelles (Calonnec et al., 2013). Un volet du projet visait par ailleurs à comprendre si les colocalisations entre QTL de résistance et QTL/gène d'architecture sont dues à des effets pléiotropes de gènes/QTL d'architecture, ou à une liaison étroite entre QTL de résistance et QTL/gène d'architecture. Les conséquences en termes d'analyse génétique et d'usage en sélection sont importantes, notamment (i) pour la rupture éventuelle de liaison entre résistance et caractère délétère d'architecture pour la création variétale (ii) pour le cumul de facteurs génétiques contrôlant la résistance et de facteurs génétiques d'architecture, en vue d'un ralentissement plus efficace du cycle épidémique.

Afin de construire des résistances dont l'efficacité est durable, il sera enfin nécessaire d'analyser la durabilité des effets des QTL de résistance (et de ceux contrôlant l'architecture de la plante), seuls ou en combinaison, en situation de pressions pathogènes. Particulièrement, la mise en place de stratégies de gestion durable des principaux QTL de résistance à *A. euteiches* en cours d'intégration dans les schémas de sélection, constituera un enjeu majeur dès lors que les premières variétés résistantes à *A. euteiches* seront inscrites. En effet, dans un contexte où de nombreux contournements de résistances génétiques ont été observés chez les plantes, spécialement dans le cas de la résistance de la luzerne à la race 1 d'*A. euteiches* aux USA (Grau et al., 1991), préserver l'efficacité de la résistance partielle du pois à *A. euteiches* constituera un objectif incontournable pour maintenir le pois dans les assolements céréaliers. Un programme d'étude de la durabilité de la résistance partielle à *A. euteiches* et de ses composantes génétiques (QTL) dans des rotations à base de légumineuses hôtes d'*A. euteiches*, a été initié à l'INRA en 2012 (Le May et al., 2012b). Il consiste à analyser l'évolution des populations pathogènes et l'efficacité de la résistance dans différents scénarii de successions culturales à base de

légumineuses telles que le pois, la féverole, la luzerne ou la vesce, simulés par des cycles accélérés de cultures en conditions contrôlées de développement optimal de la maladie. Il permettra d'identifier des successions culturales dans les rotations visant à préserver la résistance partielle et l'efficacité des QTL de résistance à *A. euteiches* chez le pois.

Remerciements

Ces travaux ont été développés à l'Inra en collaboration avec l'UNIP, le GSP (France) et l'USDA (USA) et avec le soutien des projets UE-FP6-GLIP et contrat de branche MAAPAR 'stabilité des facteurs génétiques de résistance aux principales maladies fongiques du pois protéagineux.

Références bibliographiques

- Aubert G., Morin J., Jacquin F., Loridon K., Quillet M.C., Petit A., Rameau C., Lejeune-Hénaut I., Huguet T., Burstin J., 2006. Functional mapping in pea, as an aid to the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume *Medicago truncatula*. *Theor Appl Genet* 112, 1024-1041.
- Baranger A., Pilet-Nayel M-L., Lecomte C., Hanocq E., Moussart A., Lejeune-Hénaut I., 2010. Quel impact des innovations génétiques pour lever les facteurs limitant la production du pois protéagineux ? *Innovations Agronomiques* 11 : 59-78
- Calonnec A., Richard B., Andrivon D., Baranger A., Chauvin J.E., Faivre R., Casadebaig P., Guyader S., Bussièrè F., Langlais M., Tivoli B., 2013. Projet Archidémio : Modéliser les interactions entre développement de la plante, architecture du couvert et épidémies de maladies fongiques aériennes, pour une gestion durable des cultures. *Innovations Agronomiques* 28, 201-219.
- Choi H.K., Mun J.H., Kim D.J., Zhu H., Baek J.M., Mudge J., Roe B., Ellis N., Doyle J., Kiss G.B., Young N.D., Cook D.R., 2004. Estimating genome conservation between crop and model legume species. *PNAS* 101, 15289-15294.
- Davis D.W., Fritz V.A., Pflieger F.L., Percich J.A., Malvick D.K., 1995. MN 144, MN 313, and MN 314: garden pea lines resistant to root rot caused by *Aphanomyces euteiches* Drechs. *Hort Science* 30, 639-640.
- Djebali N., Jauneau A., Ameline-Torregrosa C., Chardon F., Jaulneau V., Mathé C., Bottin A., Cazaux M., Pilet-Nayel M.L., Baranger A., Aouani M.E., Esquerré-Tugayé M.T., Dumas B., Huguet T., Jacquet C., 2009. Partial resistance of *Medicago truncatula* to *Aphanomyces euteiches* is associated with protection of the root stele and is controlled by a major QTL rich in proteasome-related genes. *Mol Plant Microbe Interact* 22, 1043-1055.
- Giorgetti C., 2013. Part relative de l'architecture et de la résistance partielle dans le contrôle génétique du ralentissement des épidémies d'ascochytose à *Didymella pinodes* chez le pois. Thèse Agrocampus Ouest, 12 décembre 2013, 183p.
- Grau C.R., Muehlchen A.M., Tofte J.E., Smith R.R., 1991. Variability in virulence of *Aphanomyces euteiches*. *Plant Dis* 75, 1153-1156.
- Hamon C., 2010. Variabilité structurale des déterminants génétiques de la résistance à *Aphanomyces euteiches* chez le pois (*Pisum sativum*) et l'espèce légumineuse modèle *Medicago truncatula*. Mémoire de Thèse, Agrocampus-Ouest, soutenu le 07 janvier 2010, 202p.
- Hamon C., Baranger A., Miteul H., Lecointe R., Le Goff I., Deniot G., Onfroy C., Moussart A., Prosperi J.M., Tivoli B., Delourme R., Pilet-Nayel M.L., 2010. A complex genetic network involving a broad-spectrum and strain-specific loci controls resistance to different pathotypes of *Aphanomyces euteiches* in *Medicago truncatula*. *Theor Appl Genet* 120, 955-970.
- Hamon C., Baranger A., Coyne C.J., McGee R.J., Le Goff I., L'Anthoëne V., Esnault R., Rivière J.P., Klein A., Mangin P., McPhee K.E., Roux-Duparque M., Porter L., Miteul H., Lesné A., Morin G., Onfroy C., Moussart A., Tivoli B., Delourme R., Pilet-Nayel M.L., 2011. New consistent QTL in pea associated

with partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in controlled condition and multiple field environments from France and the United States of America. *Theor Appl Genet* 123:261-281

Hamon C., Coyne C.J., McGee R.J., Lesné A., Esnault R., Mangin P., Hervé M., Le Goff I., Deniot G., Roux-Duparque M., Morin G., McPhee K.E., Delourme R., Baranger A., Pilet-Nayel M.-L., 2013. QTL meta-analysis provides a comprehensive view of the moderately low diversity of loci controlling partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in four pea sources of resistance. *BMC Plant Biology* 13, 45

Kou Y.J., Wang S.P., 2010. Broad-spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance. *Curr Opin Plant Biol* 13:181-185

Le May C., Guibert M., Leclerc A., Andrivon D., Tivoli B., 2012a. A single, plastic population of *Mycosphaerella pinodes* causes Ascochyta blight on winter and spring pea (*Pisum sativum*) in France. *Appl Environ Microbiol* 78, 8431-8440

Le May C., Pilet-Nayel M.-L., Onfroy C., Moussart A., Tivoli B., Andrivon D., Baranger A., 2012b. Impact de successions culturales incluant des légumineuses sur la durabilité de la résistance partielle du pois à *Aphanomyces euteiches*. 4ème Journée des Porteurs de Projets SPE, 03-04 octobre 2012, Paris

Lewis M.E., Gritton E.T., 1992. Use of one cycle of recurrent selection per year for increasing resistance to *Aphanomyces* root rot in peas. *J Amer Soc Hort Sci* 117, 638-642.

Moussart A., Onfroy C., Lesné A., Esquibet M., Grenier E., Tivoli B., 2007a. Host status and reaction of *Medicago truncatula* accessions to infection by three major pathogens of pea (*Pisum sativum*) and alfalfa (*Medicago sativa*). *Eur J Plant Pathol* 117, 57-69.

Moussart A., Devaux C., Muel F., Pilet-Nayel M.L., Baranger A., Tivoli B., Roux-Duparque M., 2007b. Improving partial resistance to *Aphanomyces* root rot in GSP breeding program. Proc 3d International Workshop on *Aphanomyces* in Legumes, 07-09 novembre 2007, Rennes, France, pp 46-47.

Onfroy C., Baranger A., Tivoli B., 2007. Biotic factors affecting the expression of partial resistance in pea to ascochyta blight in a detached stipule assay. *Eur J Plant Pathol* 119, 13-27.

Pilet-Nayel M.L., Muehlbauer F.J., McGee R.J., Kraft J.M., Baranger A., Coyne C.J., 2002. Quantitative trait loci for partial resistance to *Aphanomyces* root rot in pea. *Theor Appl Genet* 106, 28-39.

Pilet-Nayel M.L., Muehlbauer F.J., McGee R.J., Kraft J.M., Baranger A., Coyne C.J., 2005. Consistent quantitative trait loci in pea for partial resistance to *Aphanomyces euteiches* isolates from the United States and France. *Phytopathol* 95, 1287-1293.

Pilet-Nayel M.L., Prosperi JM, Hamon C., Lesne A., Lecoïnte R., Le Goff I., Herve M., Deniot G., Delalande M., Huguet T., Jacquet C., Baranger A., 2009. *AER1*, a major gene conferring resistance to *Aphanomyces euteiches* in *Medicago truncatula*. *Phytopathol* 99, 203-208.

Prioul S., Frankewitz A., Deniot G., Morin G., Baranger A., 2004. Mapping of Quantitative Trait Loci for partial resistance to *Mycosphaerella pinodes* in pea (*Pisum sativum* L.) at the seedling and adult plant stages. *Theor Appl Genet*, 108, 1322-1334.

Roux-Duparque M., Boitel C., Decaux B., Moussart A., Alamie J., Pilet-Nayel M.L., Muel F., 2004. Breeding peas for resistance to *Aphanomyces* root rot: current main outputs of three breeding programmes. 5th European Conference on Grain Legumes, 7-11 juin 2004, Dijon, France, p133.

Wicker E., Rouxel F., 2001. Specific behaviour of French *Aphanomyces euteiches* Drechs. populations for virulence and aggressiveness on pea, related to isolates from Europe, America and New Zealand. *Eur J Plant Pathol* 107, 919-929.

Wissocq C., 2003. Sélection de géniteurs agronomiques de pois protéagineux pour la résistance à l'anthracnose à *Mycosphaerella pinodes*. Mémoire de fin d'étude ISAB. 57p.

Young N.D., Udvardi M., 2009. Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes. *Curr Op Plant Biol* 12, 193-201.