

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

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

1 - Florimond DESPREZ - BP41- 59242 Cappelle en pévèle

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

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

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

## 1 Introduction

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

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

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

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

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

synthétique SHW CW176364 x Seri (Crespo-Herrera *et al.*, 2014a). Il y a aussi quelques tolérances à *R. padi* dans des lignées de blé portant des translocations de seigle (Crespo-Herrera *et al.*, 2013; 2014b), mais aucune variété résistante à *R. padi* n'est disponible sur le marché. Une des raisons principales de cette absence est que le phénotypage de la tolérance aux aphides est très chronophage. D'autre part, les *R. padi* ne causent pas de symptômes facilement sélectionnables comme ceux qui ont permis la sélection de résistance contre *Schizaphis graminum* et *Diuraphis noxia* (Quisenberry and Ni, 2007). Un test efficace, mais très chronophage, de la tolérance à *R. padi* est basé sur la mesure de la croissance nymphal sur une période de 4 jours (Mehrabi *et al.*, 2014). Cette méthode a été utilisée avec succès pour améliorer la résistance au champ de blés et d'orges (Crespo-Herrera *et al.*, 2014b).

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

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

## 2 Matériel et méthode

### ► Matériel

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

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

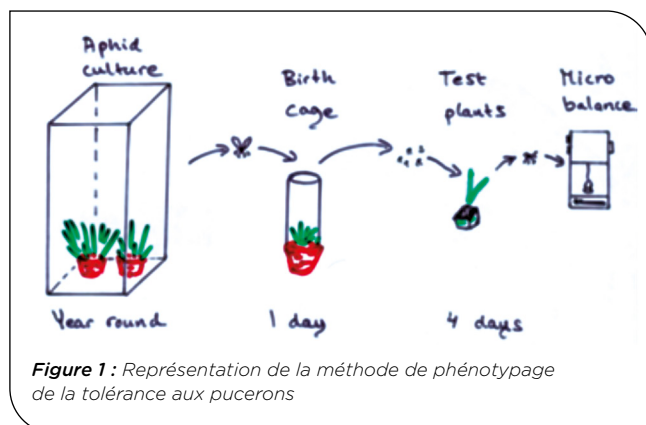


1B/1RS susceptible d'apporter la résistance à *R. padi*. L'accession porteuse du gène de résistance au BYDV, *Bdv2*, TC14-1-24-6, a également été ajoutée. Ce travail a été sous-traité à la plateforme de génotypage GENTYANE de l'INRAE à Clermont Ferrand.

## ► Méthodes

### Phénotypage de la résistance au puceron

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



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

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

### Phénotypage au champ de la jaunisse nanisante

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

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

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

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

### Dosage du virus BYDV

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

### Croisements

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

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

### Génétique d'association

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

### Génotypage

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

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

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

### 3 Résultats

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

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

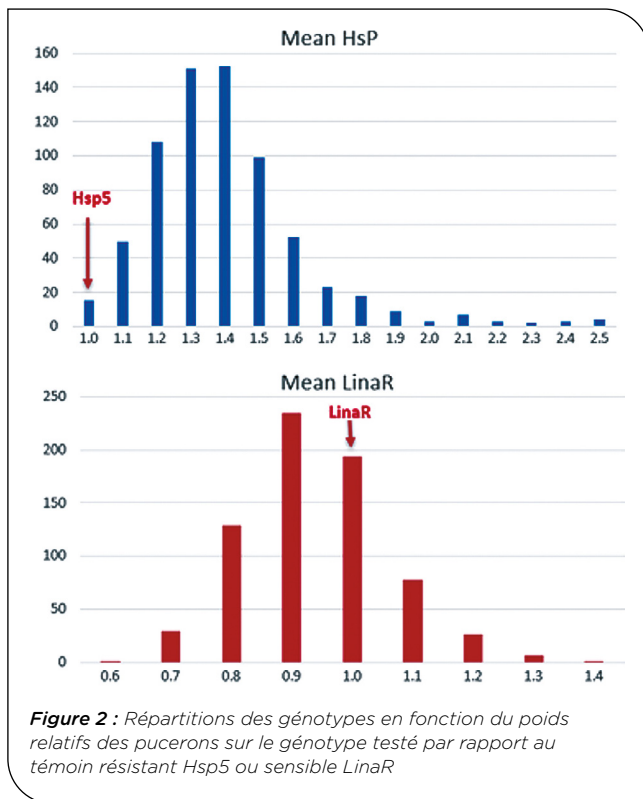


Figure 2 : Répartitions des génotypes en fonction du poids relatifs des pucerons sur le génotype testé par rapport au témoin résistant Hsp5 ou sensible LinaR

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

#### ► Phénotypage de la résistance au BYDV

##### Résistance au champ

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

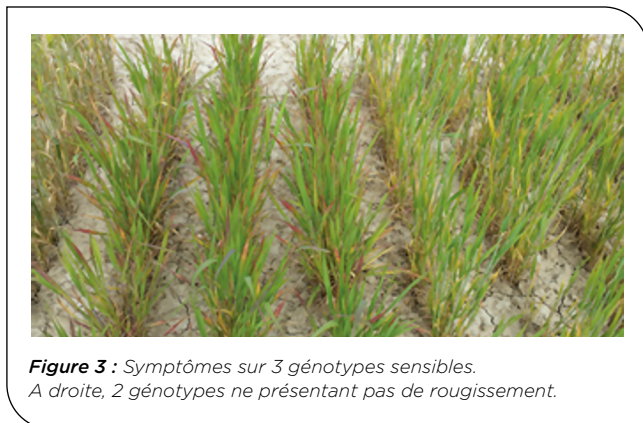


Figure 3 : Symptômes sur 3 génotypes sensibles. À droite, 2 génotypes ne présentant pas de rougissement.

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

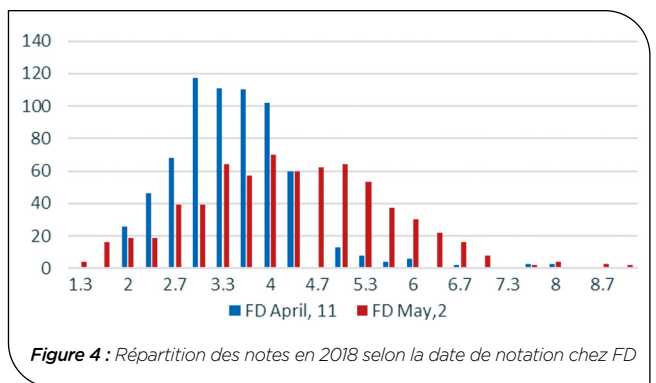


Figure 4 : Répartition des notes en 2018 selon la date de notation chez FD

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

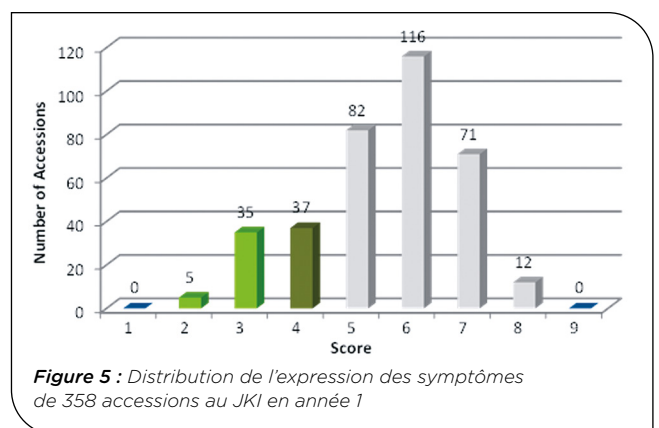


Figure 5 : Distribution de l'expression des symptômes de 358 accessions au JKI en année 1

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

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

##### Teneur en virus

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

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

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

### ► Corrélation des mesures

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

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

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

### ► Génétique d'association

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

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

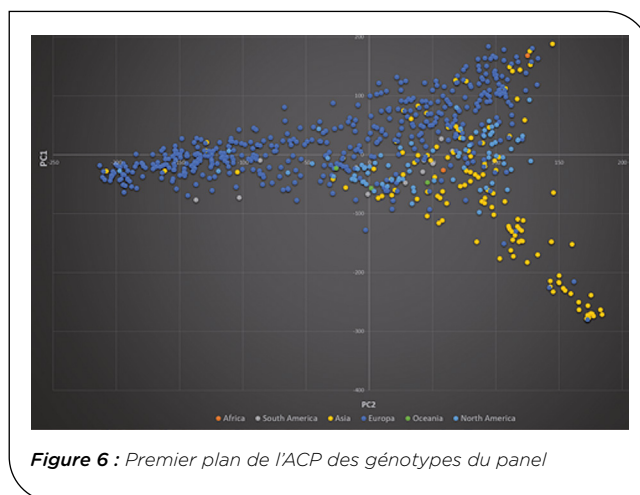


Figure 6 : Premier plan de l'ACP des génotypes du panel

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

Des marqueurs KASP de ces SNP associés ont été définis.

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

Tableau 1 : Corrélation des différentes mesures entre elles.

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

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



### ► Génotypage du panel

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

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

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

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

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

### ► Croisements

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

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

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

Tableau 3 : Croisement réalisés.

### ► Caractérisation des parents et des croisements

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

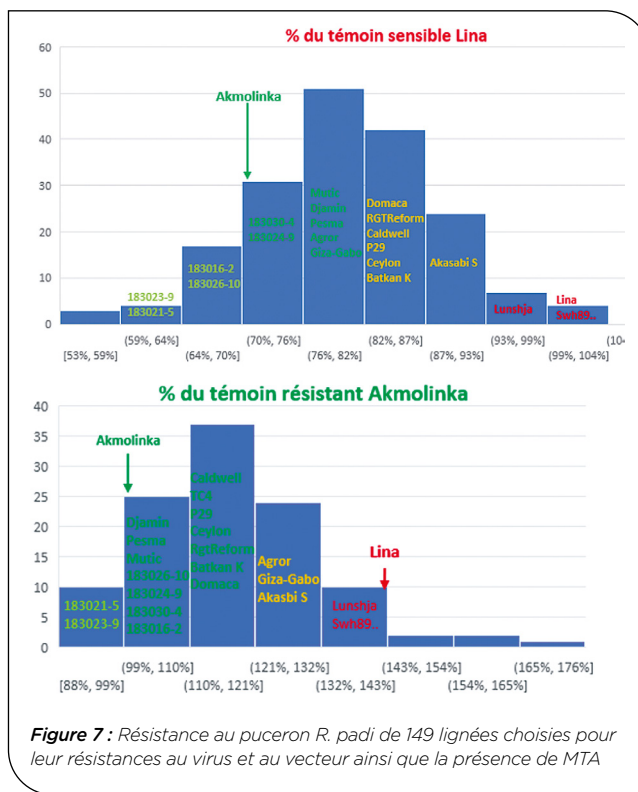
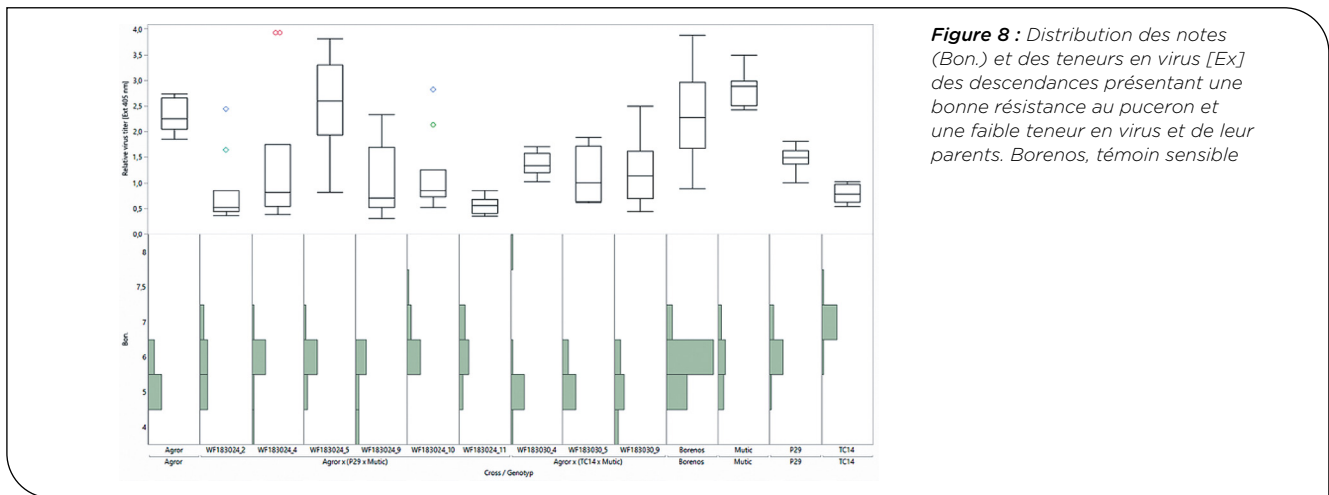


Figure 7 : Résistance au puceron R. padi de 149 lignées choisies pour leur résistances au virus et au vecteur ainsi que la présence de MTA

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

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



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

On peut remarquer que la descendance du croisement Agror x (P29xMucic) présente une forte variation de la teneur en virus à l'inverse de ce que l'on observe pour les descendants du croisement Agror x (TC14xMucic). Nous pouvons supposer que cet effet est dû à la combinaison des gènes *bdv2* et *bdv1* (MTA 7DS) de TC14.

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

#### 4 Discussion

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

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

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

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

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

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

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

#### 5 Conclusion

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

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

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

## Références bibliographiques

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



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

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

1 - Florimond DESPREZ - BP41- 59242 Cappelle en pévèle

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

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

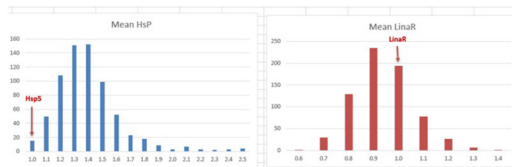
\*Coordinateur : Valérie LAURENT, valerie.laurent@florimond-desprez.fr

**Introduction:** Transmise par les pucerons *Rhopalosiphum padi* à l'automne, la jaunisse nanisante de l'orge (BYDV) peut provoquer des pertes de rendement pouvant atteindre 30 q/ha en blé d'hiver, le puceron pouvant causer des pertes de rendement allant jusqu'à 37% par sa seule alimentation. Le but du projet était d'identifier des génotypes résistants au puceron *R. padi* et au virus BYDV dans un panel de ressources génétiques afin de pyramider les résistances dans des génotypes élites pour obtenir des ressources génétiques résistantes au virus et à son vecteur utilisables.

**Résumé:** La résistance au BYDV de 700 génotypes de blé hiver, génotypés avec la puce AXIOM TaBW420K, a été phénotypé 2 années en France en infestation naturelle et en Allemagne en infection contrôlée; la teneur en virus a été mesurée par ELISA. Le panel a également été évalué pour sa tolérance au puceron en chambre de culture. Une analyse d'association a été menée avec le package R GAPIT. Des marqueurs KASP ont été développés pour les MTA. Les résistances au virus et tolérances au puceron identifiées ont été pyramidées dans les génotypes élites Mutic, RGTRreform et Ceylon.

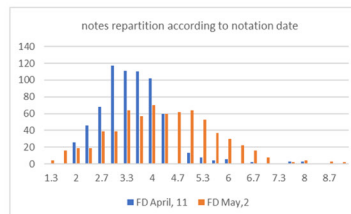
## Tolérance au puceron *R. padi*

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



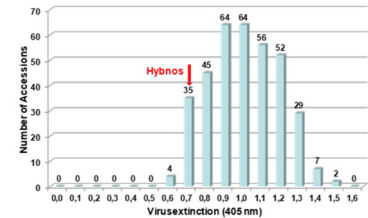
## Résistance au BYDV

Répartition des notes (1 = résistant à 9 = mort) en année 2 en France, à 2 dates de notation



## Titrage du virus

Valeur moyenne d'extinction du virus pour 358 individus. Plus la valeur est faible, moins la plante a de virus (Hybnos: témoin sensible).



**Résultats:** Le phénotypage de la tolérance au puceron est très chronophage (22 génotypes/semaine) et le phénotypage en champ de la jaunisse est difficilement reproductible qu'il s'agisse d'infestation naturelle ou d'infection contrôlée avec des *R. padi*-PAV. Les corrélations entre lieux et années sont faibles ( $\leq 0.327$ ). De même, le titre de virus et la note globale ne sont pas corrélés ( $\leq -0.154$ ).

Cinq génotypes présentent une meilleure tolérance au puceron que le témoin résistant Hsp5 et 8 individus ont été choisis pour leur bonne résistance globale à la jaunisse et leur faible titre de virus. A partir de ces génotypes résistants, 15 croisements 3 voies ont réalisés avec Ceylon, 22 avec RGTRreform et 32 avec Mutic.

Notes des individus sélectionnés pour les croisements 3 voies

	2017		2018				% padis	% padiR
	fd17	JKI17	FD April	FD May	JKI May	JKI June		
Agror	6	-	3.7	4.7	6	5	68	98
Akmolinka	7	-	4.3	5.3	6.5	6	64	90
Djamin	6	-	4.3	4.3	5	5.5	62	109
Domaca	7	-	2.7	6.7	-	-	77	90
Batkan K	5	-	2.7	4.3	-	-	76	89
TC14.1.24.6	2	-	2	1.7	6	6	75	155
Caldwell	2	4.7	3	2	5	5.5	100	143
P29	2	5.5	3.3	2	6	6	120	217
Pesma	2	4.8	3.3	3	4.5	5	99	179
Swm89y165h	3	4.2	3.7	3.3	5	6	102	147
Giza-Gabo	3	-	4.7	3.3	5	5	90	125
Lunshja	3	-	4	2.3	6	6	105	123
Akasa bi S	5	2.0	4	4	6	6	88	139

**GWAS:** L'étude de génétique d'association a été menée avec les résultats de phénotypage des 2 premières années avec 162723 SNP de la puce TaBW420K pour 689 individus. Quatre marqueurs situés au niveau du gène de résistance *bdv1* du chromosome 7DS se sont révélés associés à la résistance à la jaunisse au champ en 2017 chez FD, 2 marqueurs sur les chromosomes 5B et 5D sont liés à la note d'avril 2018 de résistance au champ chez FD et 5 marqueurs des chromosomes 1AL, 3B, 4AL, 4B et 2A sont liés à la résistance à la jaunisse en serre du JKI en 2017. Aucun marqueur n'est lié à la résistance aux pucerons. Des marqueurs KASP de ces MTA ont été développés.

**Discussion/Conclusion:** La combinaison d'une meilleure tolérance aux pucerons et des gènes de résistance à la jaunisse nanisante de l'orge, *bdv2/bdv3*, a permis d'améliorer la résistance des individus. En effet, des descendants de croisements combinant la meilleure tolérance aux pucerons d'Agror et la résistance apportée par les gènes *bdv2/bdv3* de TC14 ou P29 dans un receveur Mutic ont permis d'obtenir des teneurs en virus moindre que dans les individus résistants TC14 et P29.

Le phénotypage reste un frein majeur au développement de génotypes résistants au BYDV et *R. padi* car même en infections contrôlées, la résistance globale reste très difficile à évaluer. Seule la mesure Elisa semble donner une estimation stable de la résistance au BYDV.

