

FsoV



# MaBrune : Marqueurs diagnostiques des résistances à la rouille brune dans le blé tendre

Coordinatrice  
Henriette Goyeau



Thierry C. MARCEL, INRAE Bioger



C. E. T. A. C.



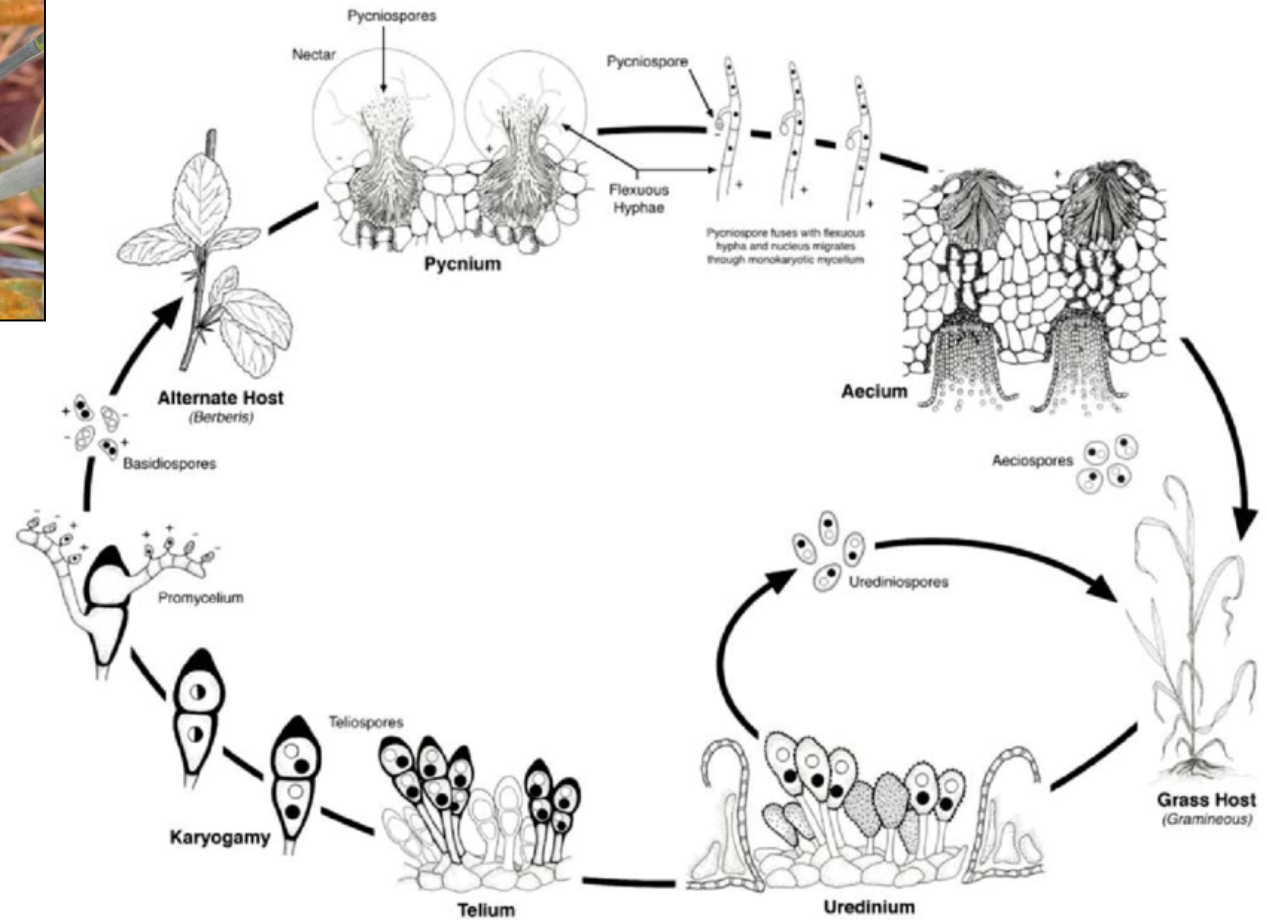
# Pathosystème blé tendre – *Puccinia triticina*

## La rouille brune causée par *Puccinia triticina*



### *Puccinia triticina*

- Phylum: Basidiomycota
- Ordre: Pucciniales
- Agent pathogène biotrophe
- Hétéroïque, avec un hôte alternant: *Thalictrum speciosissimum* (rue des prés)
- 80 gènes *Lr* identifiés



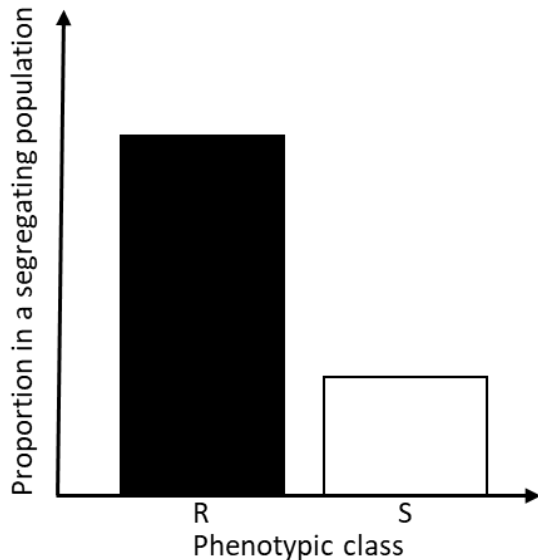
Life cycle of a heteroecious, macrocyclic cereal rust.

Illustration by Jackie Morrison, USDA-ARS.



# Définitions de qualitatif et de quantitatif en phytopathologie

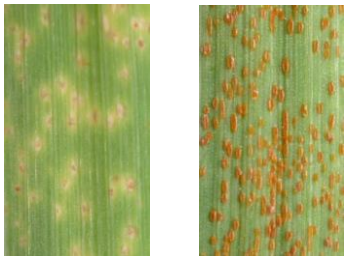
## Résistance Qualitative



*Vocabulary:*

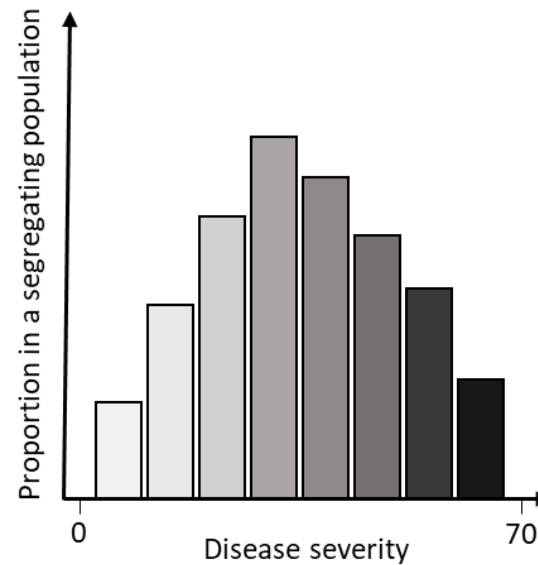
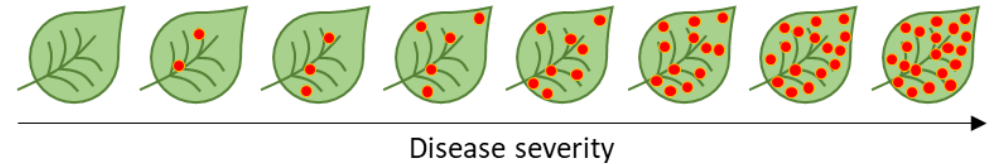
**Plant side:** Qualitative resistance; Vertical resistance; Total resistance; Monogenic resistance; Major gene resistance; *R*-gene resistance; Race/strain specific resistance; Resistance through hypersensitivity.

**Pathogen side:** Virulence; Avirulence



Gène *Lr*

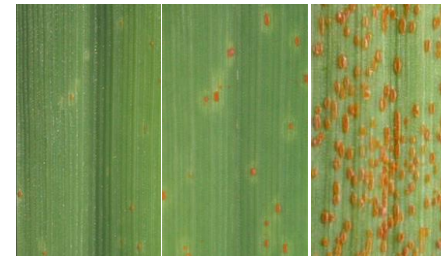
## Résistance Quantitative



*Vocabulary:*

**Plant side:** Quantitative resistance; Horizontal resistance; Partial resistance; Polygenic resistance; Minor gene resistance; Basal resistance; Broad resistance; Non-specific resistance; Field resistance; Tolerance.

**Pathogen side:** Aggressiveness



Quantitative Trait Locus (QTL)

*Lr34, Lr46, Lr67...*



## Continuité des projets FSOV

- FSOV 2004 K: Durabilité de la résistance partielle à la rouille brune du blé
- FSOV 2008 G: Résistance partielle à la rouille brune
- FSOV 2012 Q: Résistance durable à la rouille brune du blé
- **FSOV 2016 W: Marqueurs diagnostiques des résistances à la rouille brune dans le blé tendre**

## Ressources disponibles dans la communauté

- Suivi des populations fongiques et postulation des gènes de résistance *Lr* dans les variétés élités depuis 1999 (Goyeau *et al.*, 2006; Goyeau & Lannou, 2011; Papaix *et al.*, 2011; Fontyn *et al.*, 2022)
- Lignées isogènes Thatcher pour 38 gènes *Lr*
- Panel Breedwheat de 285 variétés élités (Touzy *et al.*, 2019)
- Population recombinante Renan/Chinese-Spring (Darrier *et al.*, 2017; Rimbart *et al.*, 2018; Langlands-Perry *et al.*, 2022)
- Illumina iSelect 90K (Wang *et al.*, 2014)
- Affymetrix Axiom 410K (Kitt *et al.*, 2021; Danguy des Déserts *et al.*, 2021; Paux *et al.*, 2022)



## Objectif

En se basant sur les acquis des projets précédents, MaBrune a pour objectif la réalisation d'une cartographie de précision de gènes *Lr* et QTL de résistance à la rouille brune présents dans les variétés élites de blé tendre en France.

## Enjeu

L'enjeu est l'identification de marqueurs moléculaires diagnostiques de la présence de ces gènes *Lr* et QTL afin de faciliter la sélection de variétés résistantes.

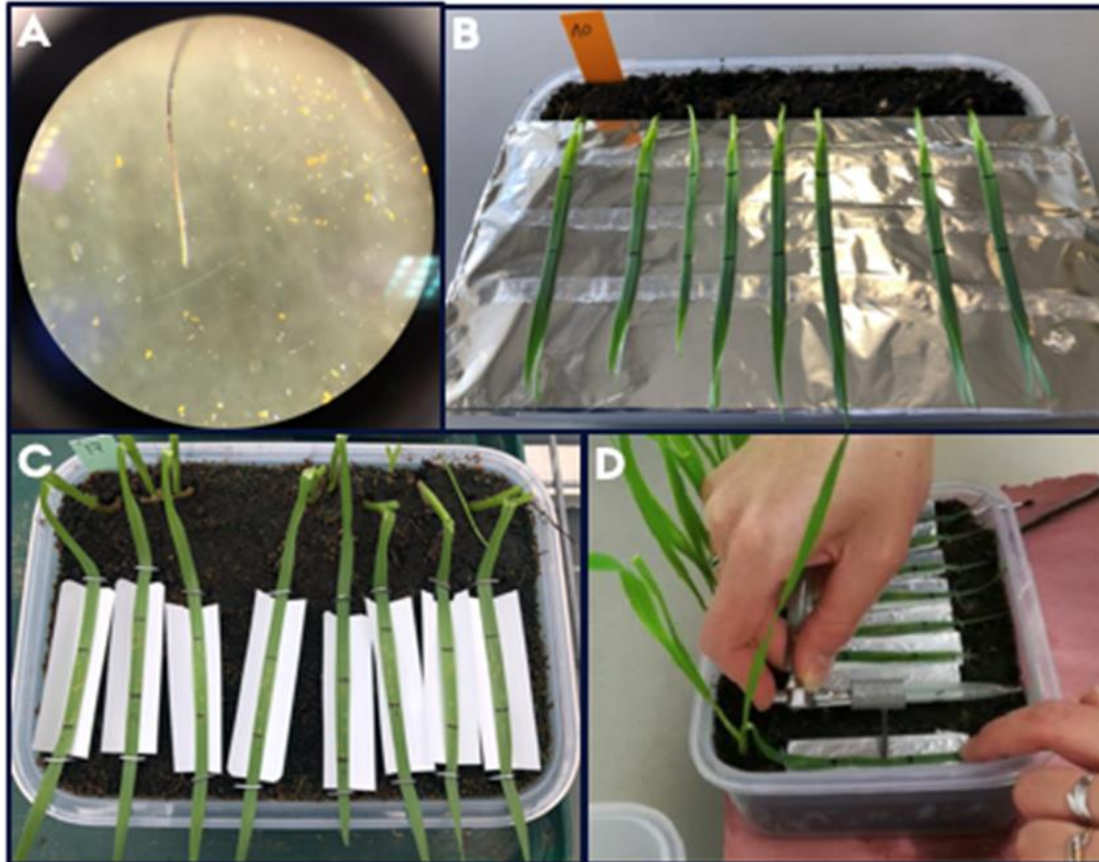
## Actions

- A. Actualisation des méthodologies de phénotypage et génotypage.
- B. QTLs de résistance partielle, cartographie fine et production de marqueurs.
- C. Production de marqueurs des gènes majeurs *Lr*.
- D. Validation des marqueurs identifiés sur un panel de variétés.



# Actualisation des méthodologies de phénotypage et de génotypage

## Phénotypage en serre au stade jeunes plantes



Protocole de mesure de l'agressivité. A : cil servant au prélèvement des spores vu sous loupe binoculaire, B : feuilles de blé fixées sur une plaque recouvert d'aluminium, C : gouttières placées sous les feuilles à J+9, D : aspiration des spores dans une paille

- > Accélérer le phénotypage du matériel
- > Réaliser des mesures plus précises des composantes de la résistance quantitative

A : inoculation, 10 spores/feuille  
→ efficacité d'infection

B : 8 feuilles par variété et par isolat, mise en chambre de rosée

Comptage pustules 2X/jour de J+6 à J+9  
→ période de latence

C : mise en place des gouttières à J+9

D : récolte des spores, aspiration avec paille J+12 → sporulation



Thèse de  
Cécilia Fontyn



# Actualisation des méthodologies de phénotypage et de génotypage

## Carte génétique intégrant les marqueurs des puces iSelect 90K et Axiom 410K

La population RIL Renan/Chinese-Spring a été génotypée avec les deux puces puis une carte génétique construite à l'aide du logiciel *Multipoint ultra-dense* (MultiQTL Ltd):

- 194,630 marqueurs SNP polymorphes
  - 10,857 SNP de iSelect 90K
  - 183,773 SNP de Axiom 410K
- 148,820 marqueurs SNP cartographiés
- 5,357 BIN génétiques
- 4,277 centiMorgans et 21 groupes de liaison

GCAT  
TACG  
GCAT  
*genes*



Article

Resistance of the Wheat Cultivar 'Renan' to Septoria Leaf Blotch Explained by a Combination of Strain Specific and Strain Non-Specific QTL Mapped on an Ultra-Dense Genetic Map

Camilla Langlands-Perry<sup>1,2</sup>, Murielle Cuenin<sup>1</sup>, Christophe Bergez<sup>1</sup>, Safa Ben Krima<sup>1</sup>, Sandrine Gélisse<sup>1</sup>, Pierre Sourdil<sup>3</sup>, Romain Valade<sup>2</sup> and Thierry C. Marcel<sup>1,\*</sup>



Thèse de Camilla Langlands-Perry

- > Comparer les QTL identifiés précédemment avec l'une ou l'autre des puces de génotypage
- > Vérifier la position des marqueurs SNP cartographiés *in silico* sur la séquence génomique de Chinese-Spring

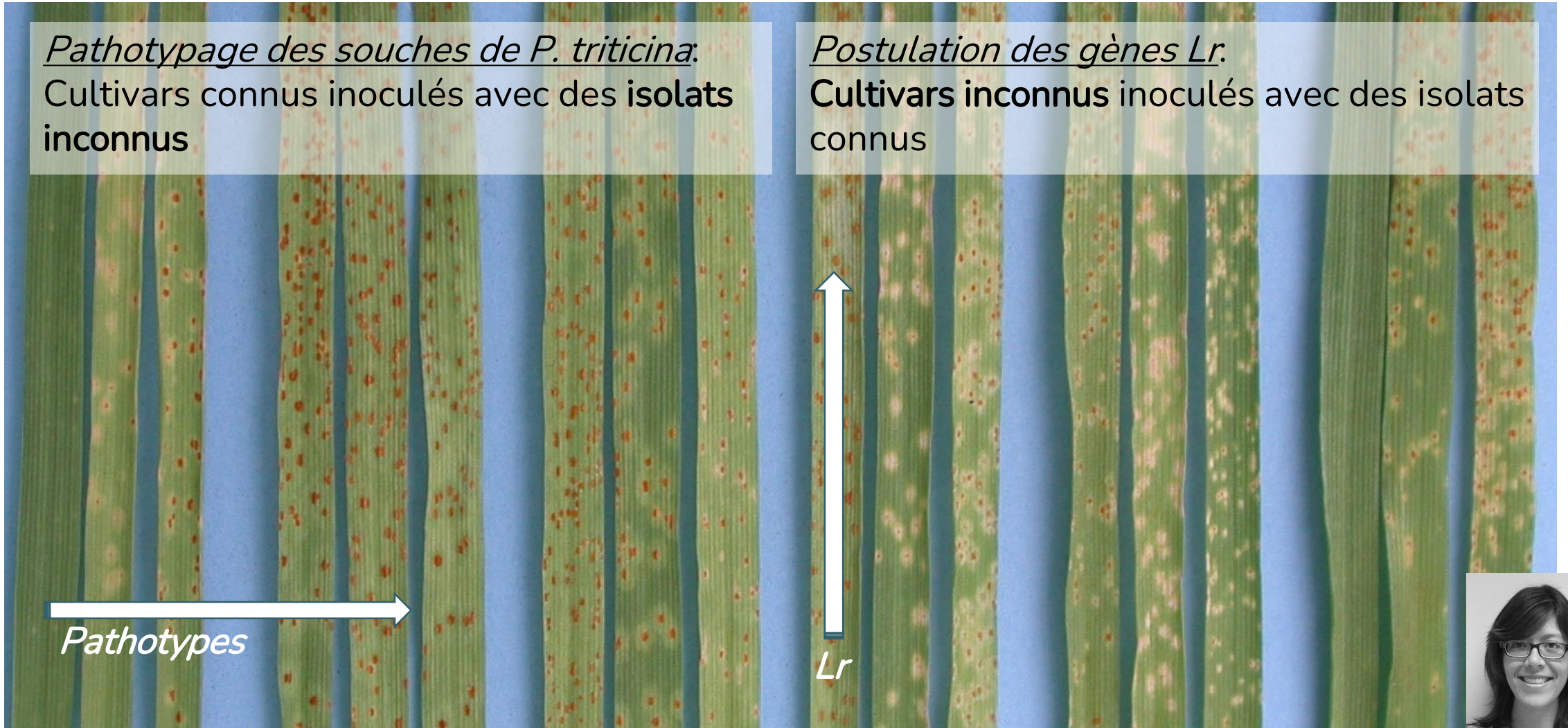


# Actualisation des méthodologies de phénotypage et de génotypage

## Suivi annuel des populations hôte et pathogène

Pathotypage des souches de *P. triticina*:  
Cultivars connus inoculés avec des **isolats inconnus**

Postulation des gènes *Lr*:  
Cultivars **inconnus** inoculés avec des isolats connus

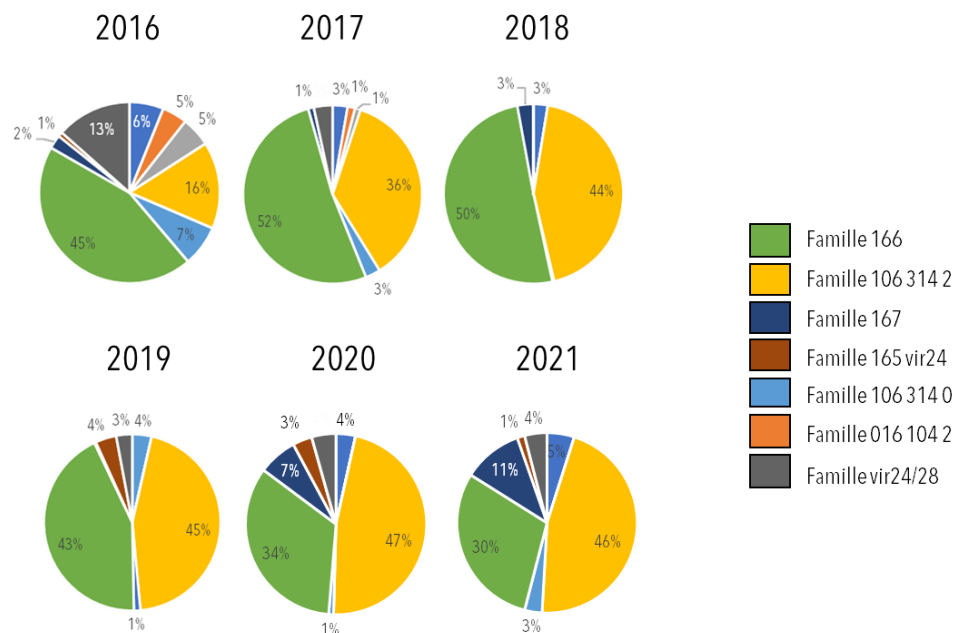




# Actualisation des méthodologies de phénotypage et de génotypage

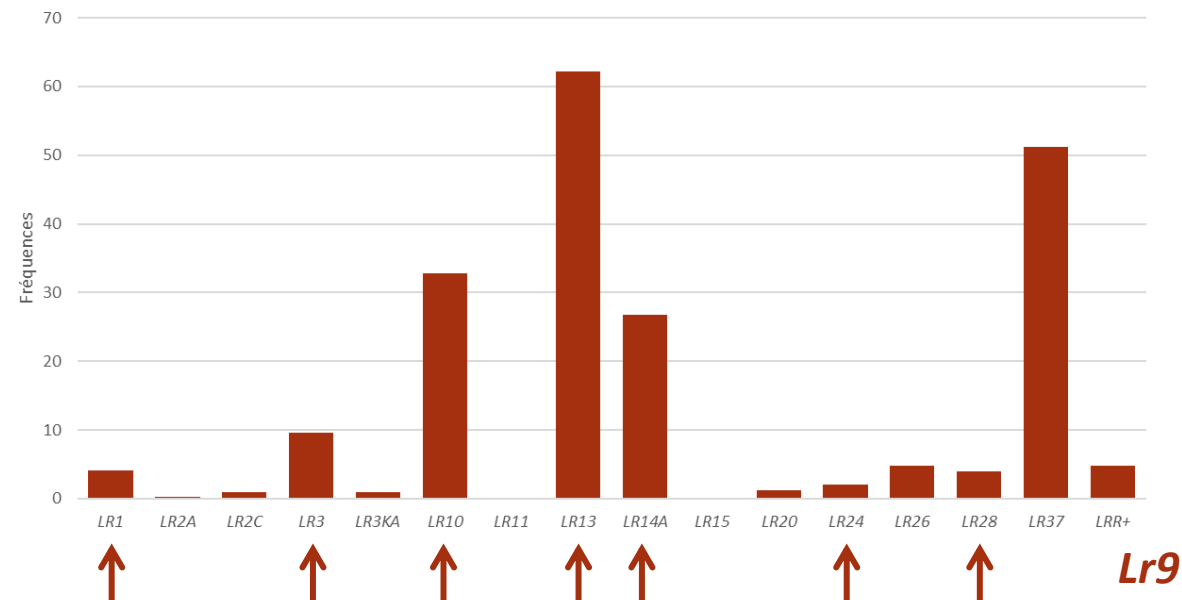
## Suivi annuel des populations hôte et pathogène

### Pathotypage des souches de *P. triticina*:



- > Connaitre l'efficacité des gènes de résistance
- > Détecter l'apparition de nouveaux contournements des résistances introduites

### Postulation des gènes *Lr*:











- > Connaitre les gènes présents dans les variétés
- > Evaluer la valeur diagnostique des marqueurs moléculaires développés



# Identification de marqueurs diagnostiques des gènes *Lr*

## Stratégie pour l'identification de marqueurs par « Bulk Segregant Analysis »

- 8 gènes retenus: présents dans les variétés françaises ou non contournés (*Lr9*)
- Populations F<sub>2</sub> issues du croisement entre lignées quasi-isogénique des gènes *Lr* et Thatcher
- Phénotypage de 140 individus F<sub>2</sub>, Constitution de bulks de 30 individus
- Génotypage de Thatcher, des NILs et des « bulks » (R, S et I) sur la puce Axiom TaBW410K

Gène	Déterminisme génétique	Bulks retenus	Type d'infection AVR avec B950019-A	Type d'infection AVR avec B950506-A
<i>Lr1</i> *	3:1 R dominant	1 R + 1 S		
<i>Lr3</i>	2:1:1 R dominant partiel	1 R + 1 S + 1 I		
<i>Lr9</i>	3:1 R dominant	1 R + 1 S		
<i>Lr13</i> *	3:1 R dominant	1 R + 1 S		
<i>Lr14a</i> *	3:1 R dominant	1 R + 1 S		
<i>Lr24</i>	3:1 R dominant	1 R + 1 S		
<i>Lr28</i>	1:2:1 R récessif partiel	1 R + 1 S + 1 I		
<i>Lr37</i>	1:3 R récessif	1 R + 1 S		

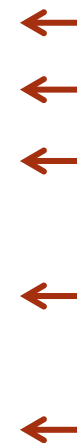


# Identification de marqueurs diagnostiques des gènes *Lr*

## Analyse des marqueurs polymorphes

- Sélection des marqueurs polymorphes entre Thatcher/Thatcher-*Lr*
- Sélection des marqueurs polymorphes entre bulk-R/bulk-S
- Sélection des marqueurs polymorphes localisés dans la région où le gène *Lr* a été cartographié

Gène	Chr	Origine	Introgression NIL (Mbp)	Introgression BSA (Mbp)	Nombre de marqueurs
<i>Lr1*</i>	5DL	<i>Triticum aestivum</i>	18	2	17
<i>Lr3</i>	6BL	<i>Triticum aestivum</i>	265	18	110
<i>Lr9</i>	6BL	<i>Aegilops umbellulata</i>	10	8,5	44
<i>Lr13*</i>	2BS	<i>Triticum aestivum</i>	534	534	637
<i>Lr14a*</i>	7BL	<i>Triticum aestivum</i>	25	16	18
<i>Lr24</i>	3DL	<i>Agropyron elongatum</i>	143	141	73
<i>Lr28</i>	4AL	<i>Aegilops speltoides</i>	137	70	104
<i>Lr37</i>	2AS	<i>Aegilops ventricosa</i>	128	128	31



- L'approche par BSA a permis de réduire l'intervalle de 5 des gènes *Lr* ciblés



# Identification de marqueurs diagnostiques des gènes *Lr*

## Analyse des marqueurs polymorphes

- Utilisation des données de postulation des gènes *Lr* dans les variétés françaises

Gène	Chr.	Nom du SNP	R	S	VD	FN	FP	Effectif
<i>Lr1</i>	5DL	cfn2809161	A	T	99.2 %	5.9 %	5.9 %	517
		cfn2809027	T	C	99.5 %	0 %	5.9 %	517
<i>Lr3a</i>	6BL	cfn3039991	A	G	99.7 %	0 %	3.1 %	203
		cfn0182781	G	C	99.7 %	0 %	3.0 %	306
		cfn0001653	G	C	99.7 %	0 %	2.9 %	298
<i>Lr9</i>	6BL	cfn2990662	A	G	100 %	0 %	0.0 %	53
		cfn0857299	T	A	100 %	0 %	0.0 %	53
<i>Lr24</i>	3DL	cfn2209796	T	C	99.3 %	0 %	8.3 %	145
		cfn0717832	T	C	98.1 %	0 %	26.6 %	308
<i>Lr28</i>	4AL	cfn2248852	C	G	100 %	0 %	0.0 %	402
		cfn2281514	A	C	100 %	0 %	0.0 %	306

- Marqueurs diagnostiques identifiés pour les gènes *Lr1*, *Lr3*, *Lr9*, *Lr24*, *Lr28*;
- *Lr13* (chr2BS), introgression de 534 Mbp (absence de recombinaison) dont 637 SNP;
- *Lr14a* (chr7BL), polymorphisme présence/absence (Kolodziej et al., 2021);
- *Lr37* (chr2AS), introgression de 128 Mbp dont 31 SNP.



# Cartographie de précision des QTL de résistance

## Stratégie suivie pour la cartographie génétique de précision des QTL de résistance

### > Identification de variétés de blé tendre partiellement résistantes

- Criblage des variétés élites pour leur niveau de résistance partielle

### > Cartographie génétique des QTL dans des populations recombinantes

- Construction des populations recombinants biparentales
- Génotypage et construction d'une carte génétique consensus
- Phénotypage des populations recombinants au champ

Résumé des  
projets 2004,  
2008, 2012

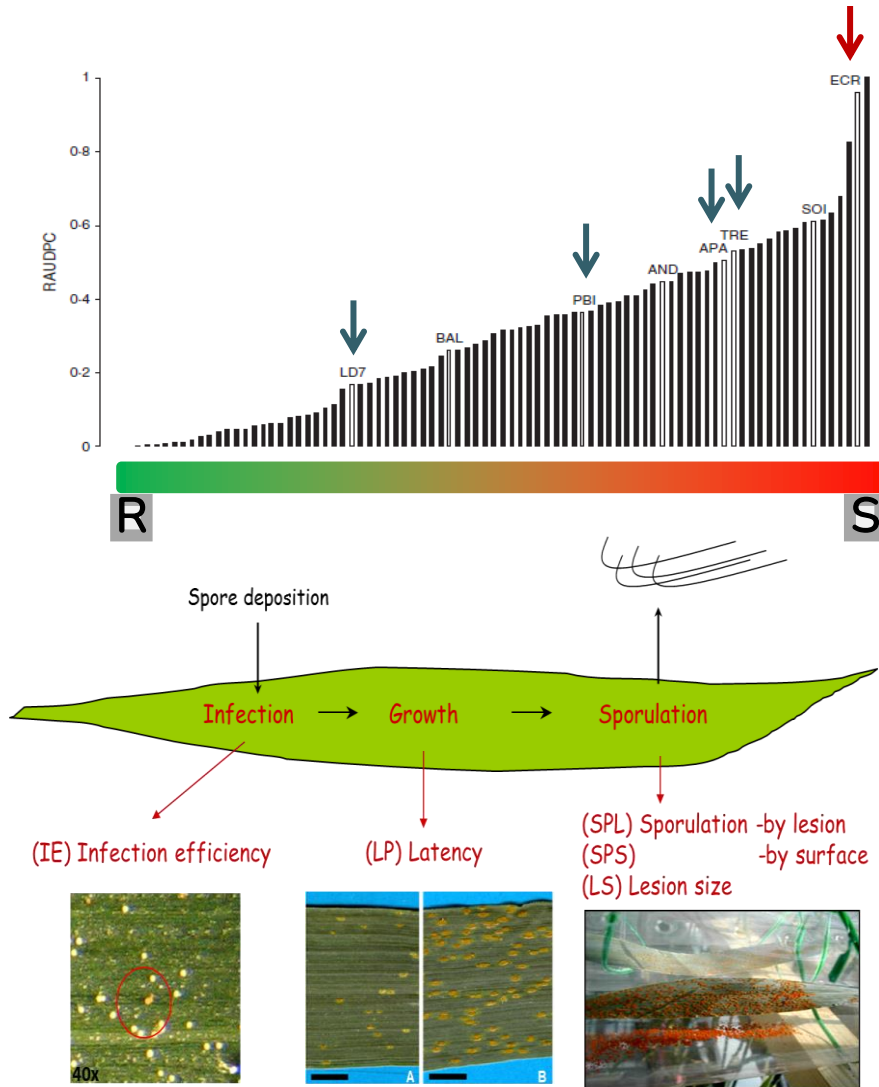
### > Cartographie de précision et production de marqueurs diagnostiques (2016-2020)

- Criblage des recombinaisons dans les intervalles QTL
- Génotypage locus spécifique des individus recombinants identifiés
- Evaluation phénotypique des individus recombinants au champ



# Cartographie de précision des QTL de résistance

## Identification de variétés de blé tendre partiellement résistantes



- 6 variétés avec des profils de résistance différents: Apache, PBI, Trémie, LD7, Sidéral, Renan
- 2 parents sensibles: Ecrin, Chinese Spring

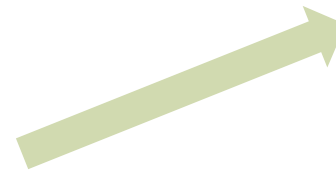


# Cartographie de précision des QTL de résistance

## Cartographie génétique des QTL dans les populations recombinantes

6 populations de cartographie biparentales :

- 6 parents partiellement résistants
- 2 parents sensibles
  - **Ecrin** (commun pour 5 populations)
  - **Chinese Spring**



Génotypage réalisé avec :

- Illumina iSelect 90K
- Affymetrix Axiom 410K

Populations	Abréviations	Type	Nombre lignées	Génotypage	Phénotypage
<b>Apache x Ecrin</b>	POP1 (AE)	SSD F7	180	iSelect 90k	2013
<b>PBI x Ecrin</b>	POP2 (PE)	SSD F7	115	iSelect 90k	2013
<b>Trémie x Ecrin</b>	POP3 (TE)	SSD F7	124	iSelect 90k	2013
<b>LD7 x Ecrin</b>	POP4 (LE)	HD	142	iSelect 90k	2012
<b>Sidéral x Ecrin</b>	POP5 (SE)	HD	98	iSelect 90k	2015
<b>Renan x Chinese-Spring</b>	POP6 (RCS)	SSD F6	298	TaBW420k	2015

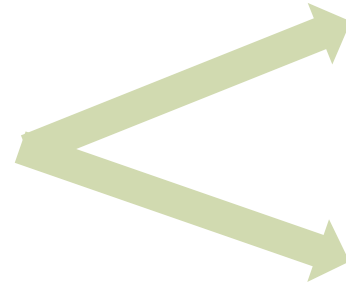


# Cartographie de précision des QTL de résistance

## Cartographie génétique des QTL dans les populations recombinantes

6 populations de cartographie biparentales :

- 6 parents partiellement résistants
- 2 parents sensibles
  - **Ecrin** (commun pour 5 populations)
  - **Chinese Spring**



Génotypage réalisé avec :

- Illumina iSelect 90K
- Affymetrix Axiom 410K

Phénotypage réalisé :

- Différentes localités au champ
- Différentes dates d'observation

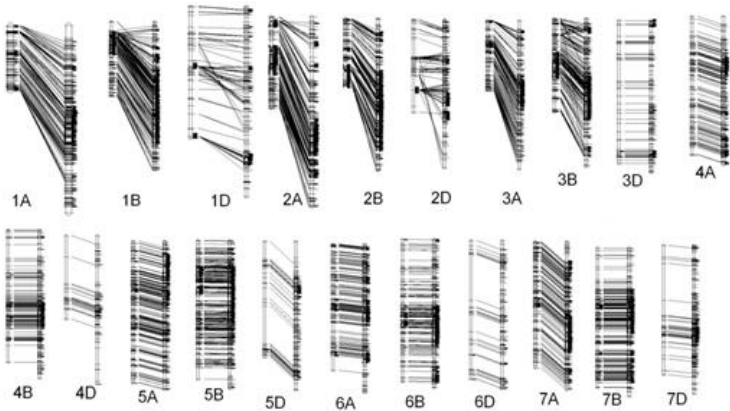
Populations	Abréviations	Type	Nombre lignées	Génotypage	Phénotypage
<b>Apache x Ecrin</b>	POP1 (AE)	SSD F7	180	iSelect 90k	2013
<b>PBI x Ecrin</b>	POP2 (PE)	SSD F7	115	iSelect 90k	2013
<b>Trémie x Ecrin</b>	POP3 (TE)	SSD F7	124	iSelect 90k	2013
<b>LD7 x Ecrin</b>	POP4 (LE)	HD	142	iSelect 90k	2012
<b>Sidéral x Ecrin</b>	POP5 (SE)	HD	98	iSelect 90k	2015
<b>Renan x Chinese-Spring</b>	POP6 (RCS)	SSD F6	298	TaBW420k	2015



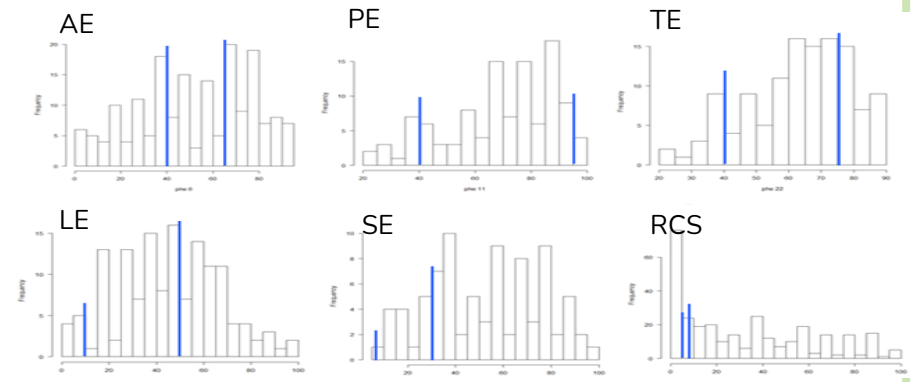


# Cartographie de précision des QTL de résistance

## Cartographie génétique des QTL dans les populations recombinantes biparentales

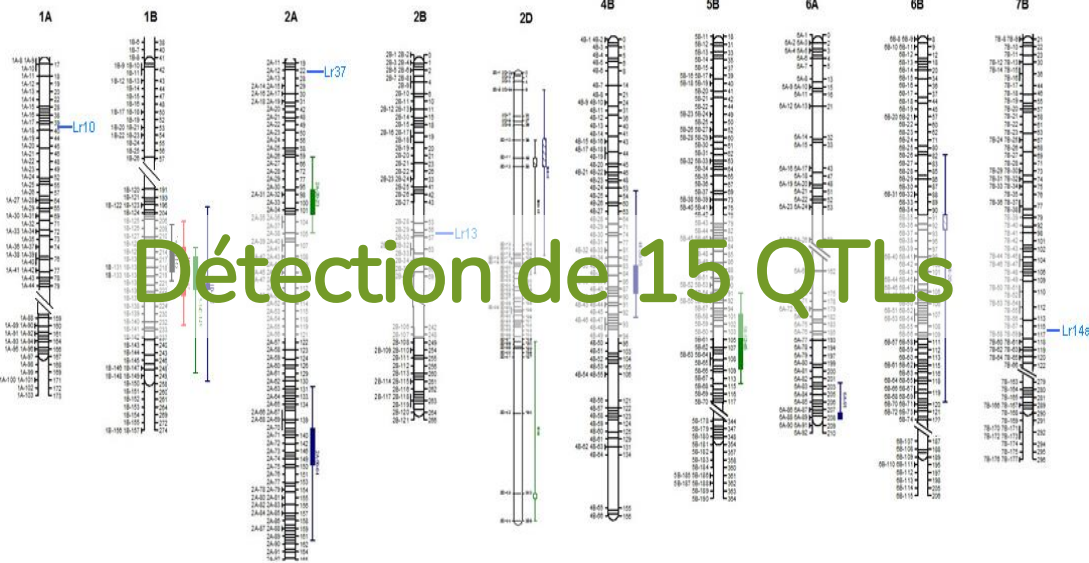


6 populations recombinantes biparentales



Construction d'une carte génétique consensus

Phénotypage de la population au champ



Détection de 15 QTLs



# Cartographie de précision des QTL de résistance

## Cartographie génétique des QTL dans les populations recombinantes

- 15 QTL de résistance détectés, dont:
  - 3 QTL robustes (4B, 5B, 6D)
  - 1 QTL détecté dans 5 populations (1B)
  - 3 QTL expliquent la résistance de Renan (2A, 2B, 3D)
- Est-ce que *Rptq-1B* explique un facteur de sensibilité ?
  - QTL stable et à effet fort
  - Aucune évidence pour de la spécificité d'isolat
  - Détecté dans les 5 populations ayant le même parent sensible Ecrin
- Sélection de 5 QTL pour la cartographie de précision \* .....

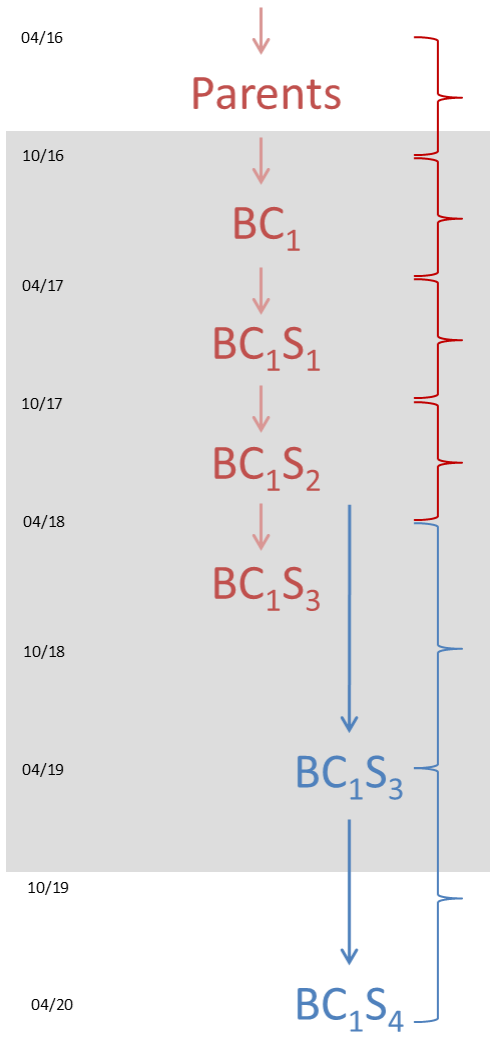
QTL	POP	R <sup>2</sup>
<i>Rptq-4B*</i>	LE	5-8%
<i>Rptq-5B*</i>	TE	10-16%
<i>Rptq-6D*</i>	SE	6-33%
<i>Rptq-2A*</i>	RCS	5-14%
<i>Rptq-2B</i>	RCS	6-10%
<i>Rptq-3D</i>	RCS	5-10%
<i>Rptq-1B*</i>	POP1-5	10-67%



# Cartographie de précision des QTL de résistance

## Criblage des recombinaisons dans les intervalles QTL

Sélection d'une lignée par QTL



- Pour chaque QTL ciblé, sélection d'un descendant RIL portant le QTL ciblé mais aucun des autres QTL détectés dans la même population;
- Rétrocroisement BC<sub>1</sub> du descendant sélectionné avec le parent sensible ECRIN ou CHINESE-SPRING;
- Criblage de la population BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> à l'aide de marqueurs bordant le QTL ciblé afin d'identifier des individus recombinants dans l'intervalle QTL;
- Criblage des familles BC<sub>1</sub>S<sub>2</sub> des individus recombinants afin d'identifier des individus recombinants homozygotes;
- Multiplication des semences des recombinants homozygotes (BC<sub>1</sub>S<sub>3</sub>);
- Evaluation phénotypique et génotypage des recombinants (BC<sub>1</sub>S<sub>4</sub>).



# Cartographie de précision des QTL de résistance

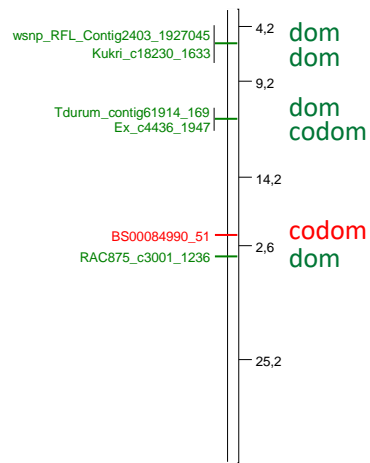
## Criblage des recombinaisons dans les intervalles QTL

- Criblage BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> et BC<sub>1</sub>S<sub>2</sub> avec 4 **marqueurs bordant** et 1 **marqueur pic**
- Marqueurs SNPs convertis en marqueurs KASP @ LGC Science



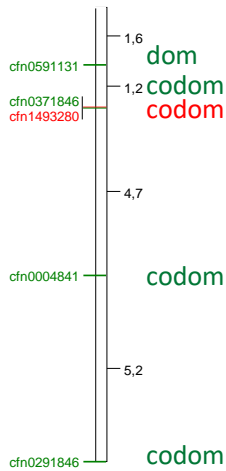
Pop_A	Pop_C	Pop_D	Pop_B	Pop_F	Pop_E
<i>Rptq-1B</i>	<i>Rptq-1B</i>	<i>Rptq-2A</i>	<i>Rptq-4B</i>	<i>Rptq-5B</i>	<i>Rptq-6D</i>

**Chr1B**



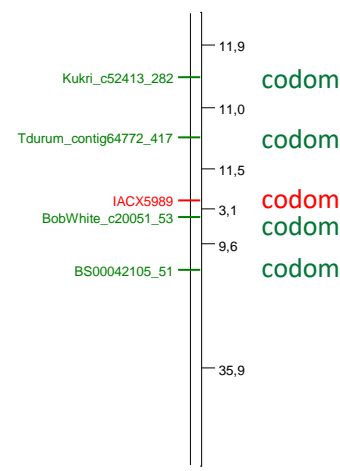
7 SNPs pour LD7/Ecrin

**Chr2A**



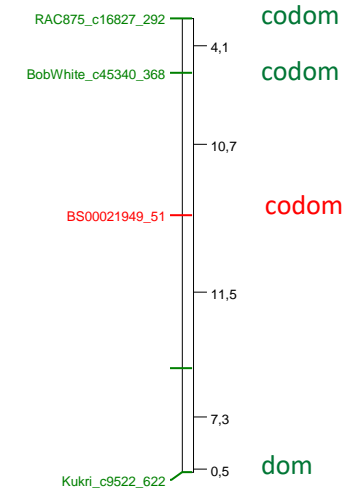
121 SNPs pour Renan/CSS

**Chr4B**



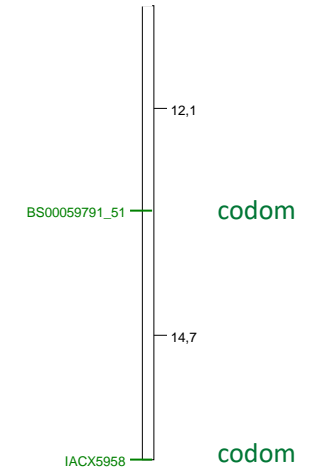
165 SNPs pour LD7/Ecrin

**Chr5B**



774 SNPs pour Tremie/Ecrin

**Chr6D**



96 SNPs pour Sideral/Ecrin

**SNPs disponibles**



# Cartographie de précision des QTL de résistance

## Criblage des recombinaisons dans les intervalles QTL

- Criblage BC<sub>1</sub>S<sub>1</sub> et BC<sub>1</sub>S<sub>2</sub> avec 4 **marqueurs bordant** et 1 **marqueur pic**
- Marqueurs SNPs convertis en marqueurs KASP @ LGC Science

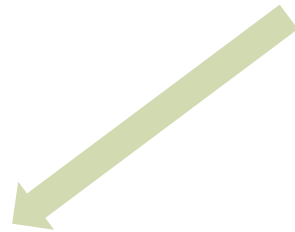


<i>Population</i>	<i>QTL</i>	<i>Cross</i>	Criblage BC <sub>1</sub> S <sub>1</sub> 2017		Criblage BC <sub>1</sub> S <sub>2</sub> 2018		BC <sub>1</sub> S <sub>3</sub> 2019	BC <sub>1</sub> S <sub>4</sub> 2020
			<i>Plant NR</i>	<i>Recomb.</i>	<i>Plant NR*</i>	<i>Recomb. NR</i>	<i>Recomb. NR</i>	<i>Recomb. NR</i>
Pop_A	<i>Rptq-1B</i>	LE106	599	182	499	63	72	72
Pop_C	<i>Rptq-1B</i>	LE146	596	48	356	45	44	43
Pop_B	<i>Rptq-4B</i>	LE116	627	181	1135	139	148	145
Pop_F	<i>Rptq-5B</i>	TE162	614	79	578	72	64	64
Pop_E	<i>Rptq-6D</i>	SE031	609	170	1041	128	115	114
Pop_D	<i>Rptq-2A</i>	RC3146	544	108	844	105	106	106
			<b>3 589</b>	<b>768</b>	<b>4 453</b>	<b>552</b>	<b>549</b>	<b>544</b>



### Populations recombinantes

Génotypage et  
construction de  
cartes génétiques



SNPseq



### Populations recombinantes

#### Génotypage

- Cartographie de saturation avec tous les marqueurs disponibles sur les puces SNPs dans les intervalles QTL (n=1137)
- SNPseq (design ST5229G\_2): amplification ciblée des séquences contextes des marqueurs SNPs suivie de séquençage haut-débit
- Les 544 recombinants homozygotes (BC<sub>1</sub>S<sub>4</sub>) ont été génotypés avec 1137 marqueurs SNP ciblés; taux de réussite 57%

Genotyping seqSNP: 544 genotype\_ 649 seqSNP

Chromosome	Population	markers	LGC_v2	LGC_failed
1B	A	168	116	65
1B	C			
2A	D	236	160	79
4B	B	223	98	139
5B	F	306	155	169
6D	E	204	120	97
	544	1137	649	549

↑ Successful      ↑ Failed



Cartographie de précision et production de marqueurs diagnostiques

## Populations recombinantes



Génotypage et construction de cartes génétiques

SNPseq



Phénotypage des populations au champ



Isolat BT06M140





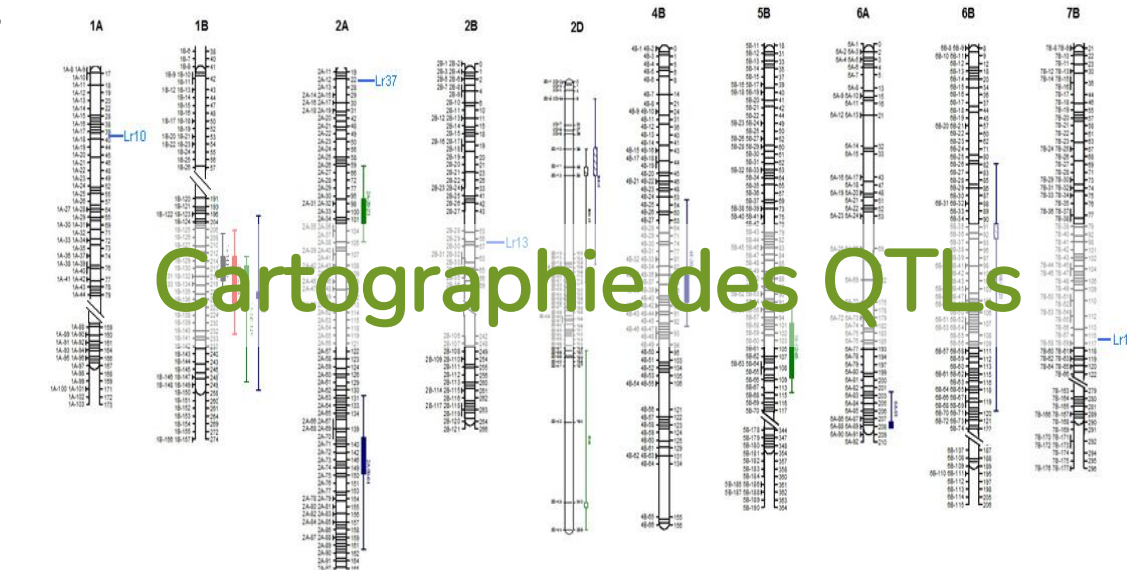
# Cartographie de précision des QTL de résistance

Cartographie de précision et production de marqueurs diagnostiques

## Populations recombinantes

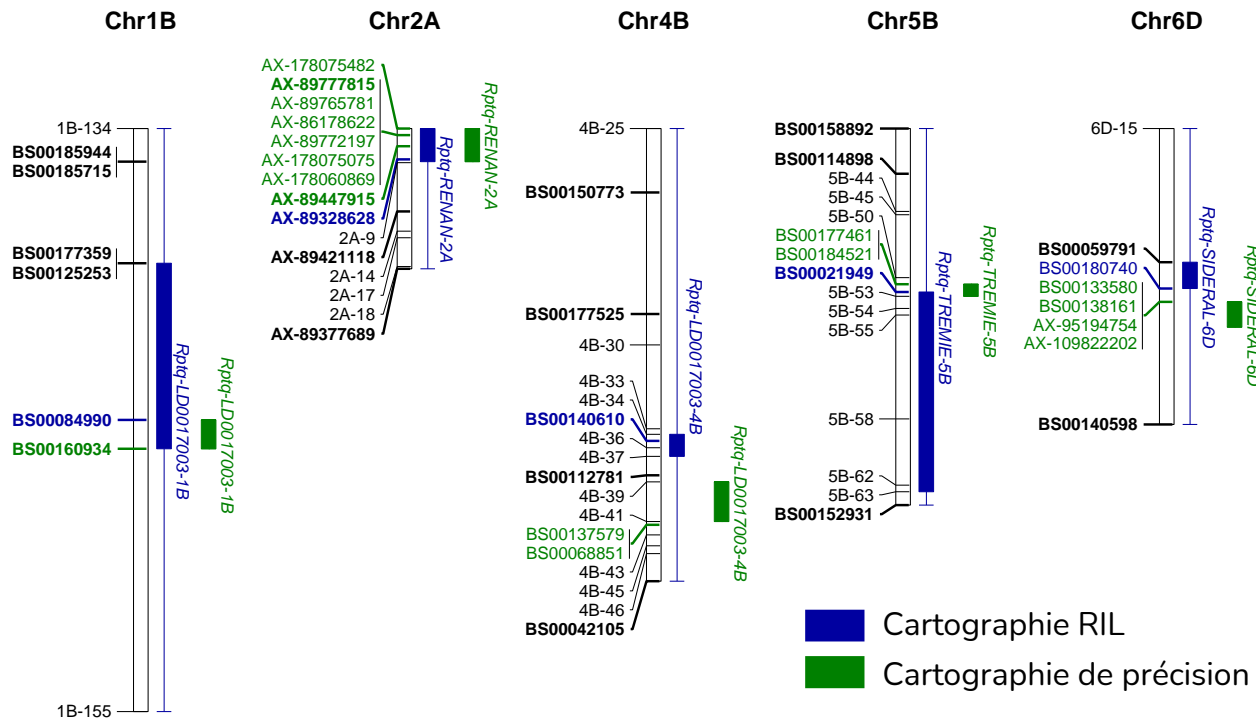
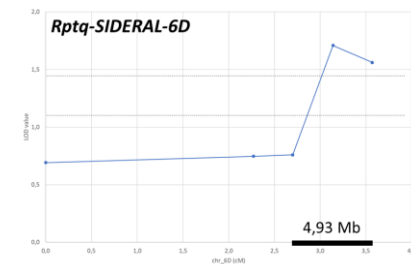
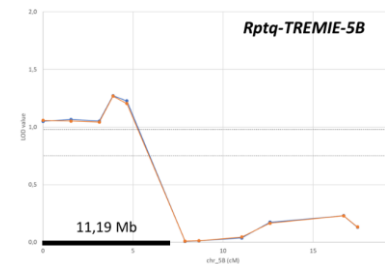
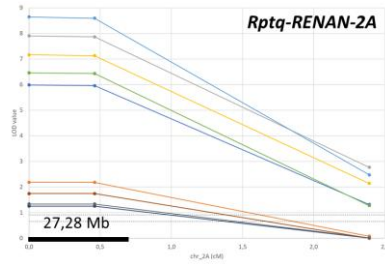
Génotypage et construction de cartes génétiques

Phénotypage des populations au champ



# Cartographie de précision des QTL de résistance

## Cartographie de précision et production de marqueurs diagnostiques



- Les intervalles de 4 QTL sont réduits à des régions comprises entre 1,23 et 11,19 Mb.
- *Rptq-2A* pourrait correspondre à *Lr37*, introduit dans Renan via une petite translocation d'environ 27,28 Mb provenant de *Aegilops ventricosa*.



## Ce qu'il faut retenir...

### Importance du suivi des populations de *Puccinia* sp. et des gènes *Lr*

- Le suivi des populations et la postulation des gènes *Lr* dans les variétés élites sont indispensables à l'identification puis à la validation des marqueurs moléculaires diagnostiques desdits gènes *Lr*.

### Identification de marqueurs diagnostiques des gènes *Lr*

- Dans 5/8 cas, l'approche par BSA a permis de réduire l'intervalle des gènes *Lr* correspondants puis d'identifier des marqueurs moléculaires diagnostiques.

### Identification de marqueurs diagnostiques des QTL

- Dans 4/5 cas, l'approche de cartographie de précision a permis de fortement réduire l'intervalle comprenant les QTL et d'identifier des marqueurs associés à ces résistances.

- Transformation des marqueurs identifiés en KASP ...



Philippe DU CHEYRON  
Faharidine MOHAMADI



### BIOGER

Henriette GOYEAU  
Anne-Lise BOIXEL  
Sabine CADOUX  
Roula SHAMSI

### GDEC

Pierre SOURDILLE

### IGEPP

Rémi PERRONNE  
Bernard ROLLAND



merci

C. E. T. A. C.



AgriObtentions  
Caussade Semences  
Florimond Desprez  
KWS-Momont  
Lemaire Deffontaines  
Lidea Seeds  
Limagrain  
RAGT 2n  
Secobra  
Syngenta  
Unisigma

