

# DéLiBéRé-JNO : Développement de Lignées de Blé adaptées et Résistantes à la Jaunisse Nanisante (JNO)

Edouard PENEZ<sup>1\*</sup>, Philippe MOMONT<sup>1</sup>, Charles SNIJDERS<sup>1</sup>, Anne-Charlotte LOMBART<sup>1</sup>, Pascal GIRAudeau<sup>1</sup>, Romain LAMERAND<sup>1</sup>, Gemma MOLERO<sup>1</sup>, Patrice SENELLART<sup>1</sup>, Sylvie DUTRIEZ<sup>1</sup>, Matthieu MICHEL<sup>1</sup>, Raphael VEQUAUD<sup>1</sup>, Paul FORGEOIS<sup>2</sup>, Charlotte THIBAUT<sup>2</sup>, Torsten WILL<sup>3</sup>, Pierre SOURDILLE<sup>4</sup>

1 - CETAC - 7, rue du Coq Heron, 75030 Paris

2 - INSTITUT DE GENECH - rue de la libération, 59242 Genech

3 - JULIUS-KÜHN-INSTITUT - Erwin Baur Strasse 27, 06484 Quedlinburg, ALLEMAGNE

4 - INRAE - UMR 1095 Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales -

5, Chemin de Beaulieu, 63000 Clermont-ferrand

\*Coordinateur : Edouard PENEZ, edouard.penez@asur-plantbreeding.com

## 1 Introduction

L'amélioration génétique du blé tendre (*Triticum aestivum* L.) est devenue une préoccupation majeure afin de pourvoir à la consommation mondiale qui ne cesse d'augmenter (environ 2% par an) du fait d'une hausse de la population (estimée à 9 milliards d'habitants en 2050) et la multiplication des usages alimentaires mais aussi non-alimentaires (biocarburant, biogaz, bioplastic). Cependant, si les rendements ont régulièrement progressé entre 1950 et 2000, ils commencent à stagner depuis une vingtaine d'années (Figure 1) ce qui laisse craindre des pénuries dans les années à venir.

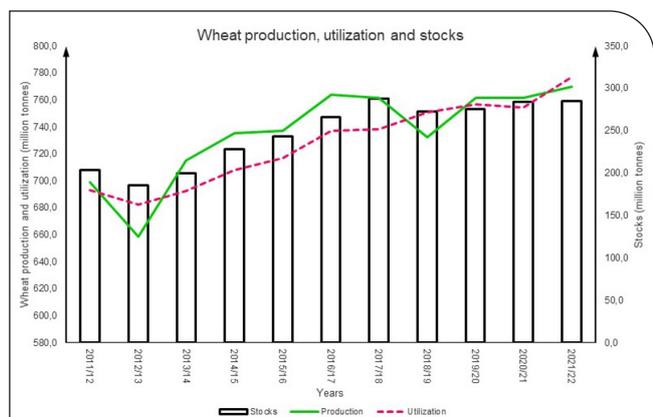


Figure 1 : Évolution de la production (en vert), consommation (en rouge) et stocks (histogramme) de blé dans le monde sur les 10 dernières années. (<http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>)

L'amélioration des rendements est donc une préoccupation majeure des filières de sélection. Cependant, cet accroissement de production doit s'effectuer en prenant en compte la nécessité d'une agriculture durable, respectueuse de l'environnement, utilisant moins d'intrants (engrais, pesticides, fongicides, eau). Elle doit également faire face au défi majeur du réchauffement climatique avec des épisodes plus fréquents et plus intenses de sécheresse et de canicule.

Le changement climatique induit également des hivers plus doux et des périodes de froid plus tardives qui se traduisent par une recrudescence des maladies virales sur blé, orge et avoine telles que la jaunisse nanisante de

l'orge (JNO), la plus grave causée par des virus (Barley yellow dwarf virus, BYDV) transmis exclusivement par pucerons (*Rhopalosiphum padi* L. et *Sitobion avenae* J.Fabr.). Cette virose impacte fortement la production céréalière et entraîne des pertes de rendements en moyenne de 30% dans les champs infectés qui peuvent, lors de fortes épidémies (campagne 2015-2016), atteindre plus de 80%. Si la lutte chimique contre les pucerons a été la réponse la plus efficace jusqu'à maintenant, la réduction recommandée de l'utilisation des pesticides (plan Ecophyto II) et l'interdiction à court terme de familles chimiques (néonicotinoïdes) changent la donne et imposent de se tourner vers de nouvelles solutions pour maintenir une production suffisante et de qualité.

Une façon séduisante de résoudre cette équation est d'exploiter le réservoir des résistances présentes dans des espèces sauvages apparentées au blé (*Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth & D.R.Dewey et *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn.) qui ont déjà servi par le passé à introduire des phénotypes de tolérance à la JNO. Cependant, l'inconvénient de cette approche est l'introduction simultanée de caractères délétères (pertes de rendement, verse...) qu'il est primordial d'éviter. Une façon d'y parvenir est de maîtriser les échanges (ou crossovers) qui ont lieu lors de la méiose entre les chromosomes issus des espèces apparentées et ceux du blé tendre. Une stratégie originale consiste à travailler sur des mutants des gènes qui contrôlent ces échanges et en particulier le gène *ph1* dont la mutation induit une hausse de la fréquence des crossovers entre chromosomes apparentés (appelés homéologues).

L'objectif global du projet DéLiBéRé-JNO était de développer des lignées de blé proches d'un matériel élite d'hiver employé dans les schémas de sélection Européens mais portant des introgressions issues d'espèces apparentées leur conférant un niveau de résistance à la JNO satisfaisant. Le projet repose sur la création et la caractérisation moléculaire et phénotypique d'une population de lignées recombinantes issues du croisement entre une variété proche de l'élite européenne (Cadenza) et mutée pour le gène *ph1*, et différentes variétés exotiques apportant une bonne tolérance à la JNO de par leurs introgressions issues de *Thinopyrum intermedium* et *Agropyron cristatum*, mais inadaptées aux pratiques culturales européennes.



## 2 Matériel et méthode

### ► 2.1. Matériel végétal

Pour le développement des populations, les croisements font intervenir deux lignées dérivées de la variété Cadenza mutée par Éthyle-Méthane-Sulfonate (EMS) au niveau du gène *ph1* (identifié comme étant *TaZip4-B2* ; Rey *et al.* 2017) : Cadenza-0348 et Cadenza-1691. Cinq lignées connues comme ayant un bon niveau de résistance à la JNO ont été choisies : Glover (*BYDV2*), Mackellar (*BYDV2*), P29 (*BYDV3*), P961341 (*BYDV3*), Zhong-4 (*BYDV4*). Afin d'optimiser les réalisations des croisements, un test pour déterminer les besoins en vernalisation a été effectué préalablement. Il montre que Cadenza, Glover et Zhong 4 sont de type printemps alors que Mackellar, P29, P961341 sont de type hiver et nécessitent une vernalisation. Les croisements par Zhong-4 ont été abandonnés pour cause de nécrose hybride.

Les croisements entre les deux individus Cadenza et les quatre lignées tolérantes ont été effectués dans les deux sens, en utilisant les individus Cadenza soit comme mâle, soit comme femelle. Par la suite, les individus hybrides ont été rétro-croisés par les individus Cadenza correspondant (génération BC1F1). Après, un tri moléculaire pour isoler les individus homozygotes mutants *ph1* et hétérozygotes au niveau des introgressions, ceux-ci ont été autofécondés pour générer une population en ségrégation (BC1F2). Les individus ont ensuite été conduits par autofécondations successives jusqu'en génération BC1F5.

### ► 2.2. Marquage moléculaire

Les ADN sont extraits à partir de feuilles de jeunes plantules au stade trois feuilles à l'aide d'un kit BeadX selon le protocole en vigueur sur la plateforme GENTYANE de l'UMR GDEC. Les ADN sont ajustés à 10ng/μL après extraction et 30ng sont utilisés pour la préparation des banques nécessaires au génotypage par puce.

Les parents des populations et les descendants ont été analysés à l'aide d'une puce SNP AXIOM™ comportant 35 000 marqueurs (Rimbert *et al.* 2018). La présence d'introgressions dans le génome de blé provenant d'espèces apparentées se traduit par un génotypage aberrant d'une succession de SNP localisés dans la région concernée (Off Target Variants : OTV). Brièvement, chaque SNP émet un signal fluorescent dont l'intensité varie selon les individus. L'intensité du signal est comparée à celle d'un génotype de référence (ici Cadenza) pour normaliser les données. Une valeur de normalisation négative traduit un signal d'intensité inférieur à la référence. Un algorithme de segmentation est ensuite appliqué sur la matrice des valeurs normalisées pour identifier les points de rupture correspondant aux introgressions. La position de chaque SNP étant connue à la base près sur la séquence de référence (Chinese Spring ; Zhu *et al.* 2020), cela permet de déterminer la position et la taille des différentes introgressions.

### ► 2.3. Phénotypage en conditions contrôlées

Les tests sur plantes juvéniles ont été effectués en serre sous conditions contrôlées (22 ± 2°C, 60% humidité, alternance jour/nuit 16h/8h) sur un panel d'accessions incluant des blés d'hiver et de printemps.

Dix plantules par accessions ont été inoculées, chacune par cinq pucerons *Rhopalosiphum padi* virulifères (BYDV-PAV). Après une incubation de sept jours, les pucerons sont tués par un traitement insecticide. Cinq semaines après inoculation, le BYDV est détecté par analyse sérologique (DAS-ELISA : double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay). Les données acquises donnent des informations sur le taux d'infection mais également sur la teneur relative du virus pour les accessions testées. La notation des symptômes sur une échelle de 1 (en bonne santé) à 9 (morte) soutiendra, en plus des données acquises par ELISA, la sélection des accessions résistantes au BYDV.

### ► 2.4. Phénotypage aux champs

Dans ce projet DéLiBÉRÉ JNO, un réseau conséquent d'expérimentations a été mis en place afin de multiplier les chances de pouvoir observer et caractériser des symptômes de JNO sur différents panels. Ainsi, nous disposons d'un réseau maximum de six lieux d'expérimentation entre les membres du groupe CETAC : Mons en Pévèle (59), Auchy Lez Orchies (59), Maule (78), Terminiers (28), Reclainville (28) et Aiguisy (60). En 2019, un premier panel de 30 accessions a été testé sur deux sites.

En 2020, un panel de 109 accessions (deux lignes de 1.5 m par accession) a pu être mis en place sur trois lieux avec un très bon niveau d'infection (Figure 2).

Enfin en 2023, deux panels d'environ 530 variétés (deux répétitions par variété) chacun, ont été évalués sur trois lieux différents.

Pour les notations de symptômes, la même échelle que pour les conditions contrôlées est utilisée.



Figure 2 : Expérimentation JNO blé 2019/2020 à Aiguisy (60).

## 3 Résultats

### ► 3.1. Évaluation et caractérisation des ressources génétiques aux champs et en conditions contrôlées

Le Tableau 1 donne un résumé du phénotypage des niveaux de résistance moyen sur les trois lieux d'expérimentation et pour deux stades de développement des plantes. Les essais ont été couronnés de succès. Il y avait un bon niveau

d'infection. Toute la gamme de résistance (1 à 9) a été observée. Une quinzaine d'accessions a montré un niveau de tolérance intéressant aux deux stades d'observation. Parmi les lignées parentales utilisées, OK7211542 et P29 ont montré le meilleur niveau de tolérance. Glover, P961341 et Mackellar sont d'un niveau inférieur. Zhong 4, qui a été également utilisée comme lignée parentale, a montré de bons résultats mais malheureusement les croisements n'ont pas pu être développés pour cause de nécrose hybride. La lignée Zhong 4 possédant le gène Bydv4 présente le plus haut niveau de résistance parmi les lignées parentales.

Génotype	Score 1	Écartype 1	Score 2	Écartype 1
AUS 11955	1,5	0,9	1,2	0,3
CPI 147233b	1,8	0,4	2,0	0,7
<b>ZHONG 4</b>	1,0	0,0	2,0	0,0
CPI 147251b	2,8	1,1	2,5	1,4
CPI 147236a	2,3	1,2	2,7	1,5
CPI 147242b	1,8	0,8	2,7	1,5
<b>OK7211542</b>	2,3	1,2	3,0	1,7
AUS 6770	2,7	0,3	3,2	0,6
CPI 147239b	1,7	1,2	3,2	2,0
CPI 147247a	1,7	1,2	3,3	2,1
CPI 147280b	2,3	1,5	3,5	2,5
CPI 147232 a/b	2,2	0,8	3,7	2,0
CPI 147238b	2,3	1,5	3,7	2,3
CPI 147231b	2,3	1,5	3,8	3,3
CPI 147234b	1,7	0,6	3,8	2,5
CPI 147250a	3,2	2,0	4,5	3,1
AABBVV	4,0	3,5	4,7	3,8
CPI 147247b	4,7	0,6	5,3	0,3
<b>P29</b>	3,2	1,6	5,3	2,4
<b>P961341</b>	6,3	2,5	7,2	3,2
<b>GLOVER</b>	6,0	2,8	7,5	2,1
<b>MACKELLAR</b>	6,5	0,7	8,0	1,4
Toluca.50	8,2	0,8	8,7	0,6
Ts'ao Yuan 2	8,2	1,0	8,7	0,6
FAO.33.316	8,8	0,4	8,8	0,4
I.BO.1828	8,5	0,9	8,8	0,3

**Tableau 1 :** Résultats obtenus après observation aux champs sur les lignées parentales (encadrées) et sur les meilleures ressources génétiques testées par le CETAC ; Moyenne sur trois lieux ; année 2019/20 (1 = tolérant / 9 = sensible)

Génotype	Titre du virus
<b>MacKellar</b>	0,34
<b>P 9613 41</b>	0,59
<b>Glover</b>	0,72
<b>Zhong 4</b>	0,72
Frontana Nr. 568	0,89
Spinebill	0,91
Milan 1	0,98
89 Zhong 2	0,98
<b>P 29</b>	0,98
Anza Lr 37Yr17 Sr 38	1,03
Hybnos	1,33
Condor 2	1,34
Anza 4	1,42
Condor 3	1,47
Anza 3	1,60

**Tableau 2 :** Valeurs du titre du virus BYDV pour chaque génotype à partir du test DAS-ELISA Les valeurs proches de 0 indiquent un bon niveau de tolérance. Les lignées parentales sont en gras.

En effet, un premier panel de 30 accessions en 2019 puis une sélection de six variétés sensibles et de six variétés tolérantes en 2020 ont permis de valider l'ensemble de nos notations. Le Tableau 2 reprend 15 des 30 accessions testées au JKI.

### ► 3.2. Production des populations

Les croisements initiaux ont été effectués dans deux environnements contrôlés à l'Institut de Genech et chez KWS Momont. Au total 963 grains BC1F1 ont été produits avec des variations selon les croisements allant de 39 grains pour le croisement P961341 x Cad-0348 à 195 grains pour le croisement P29 x Cad-1691 (Tableau 3).

Croisement	Genech	Momont	Total
Glover x Cad-0348	132	47	179
Glover x Cad-1691	99	46	145
Mackellar x Cad-0348	17	101	118
Mackellar x Cad-1691	41	68	109
P29 x Cad-0348	-	40	40
P29 x Cad-1691	31	164	195
P961341 x Cad-0348	3	36	39
P961341 x Cad-1691	15	123	138
Total	338	625	963

**Tableau 3 :** Résultat de la production des grains BC1F1 à partir des huit croisements initiaux dans deux environnements (Institut de Genech et KWS Momont) en conditions contrôlées.

Afin d'isoler les individus mutants homozygotes pour la mutation *ph1* et hétérozygotes aux introgressions, 40 grains pour chaque croisement ont été semés (319 grains) en équilibrant autant que possible les deux sources (Institut de Genech, KWS Momont). 274 plantules se sont développées (86% ; Tableau 4).

Croisement	Grains semés (Genech/KWS)	Plantules obtenues	Plantes pos.	Grains récoltés
Glover Cad-0348	40 (20+20)	38 (19+19)	11 (6+5)	240
Glover Cad-1691	40 (20+20)	39 (20+19)	12 (6+6)	926
Mackellar Cad-0348	40 (17+23)	37 (16+21)	5 (3+2)	55
Mackellar Cad-1691	40 (20+20)	37 (20+17)	9 (7+2)	177
P29 Cad-0348	40 (0+40)	32 (0+32)	4 (0+4)	0
P29 Cad-1691	40 (20+20)	39 (19+20)	4 (0+4)	26
P961341 Cad-0348	39 (3+36)	19 (1+18)	3 (1+2)	16
P961341 Cad-1691	40 (15+25)	33 (14+19)	5 (2+3)	314
Total	319	274 (109+165)	53 (25+28)	1754

**Tableau 4 :** Résultat des tests de génotypage pour sélectionner les individus mutants homozygotes *ph1* et hétérozygotes aux introgressions (Plantes pos.) et nombre total de grains récoltés par croisement.

Un échantillon de feuille a été prélevé pour l'extraction d'ADN et la réalisation des tests moléculaires. Les individus sont conservés en chambre à vernaliser (6°C, 8h jour/16h nuit) en attendant le résultat.

Sur les 274 individus testés, 53 sont conformes à l'attendu à savoir homozygotes pour la mutation *ph1* et hétérozygotes au niveau des introgressions supposées (19%) ce qui est légèrement inférieur au nombre espéré (25% soit 68).

Les plantules ont été cultivées en conditions contrôlées jusqu'à la récolte ce qui a permis de produire 1754 grains pour les huit croisements, un seul ayant été totalement stérile (P29 x Cad-0348 ; Tableau 4). Les grains ont été fournis à l'Institut de Genech pour la poursuite de la production des populations jusqu'au stade BC1F5. Au stade BC1F3, deux plantes par numéro ont été menées en parallèle chez KWS-Momont et à l'Institut de Genech. Au total, 1245 individus BC1F5 ont été développés.

### ► 3.3. Analyse des introgressions chez les parents par puce SNP

Afin de déterminer la position et la taille des introgressions chez les lignées parentales, celles-ci ont été génotypées à l'aide de la puce SNP AXIOM™ 35K. Cinq plantes différentes sont analysées pour chaque génotype de façon à éviter un manque d'homogénéité des lots de semences. L'introgression est validée lorsqu'elle est retrouvée sur au moins quatre des cinq plantes. Les résultats sont compilés dans le Tableau 5.

Géno-me	A	B	D
1	P29 (L 10.6)	<b>P96 (S 238.2)</b>	Glo/Mac (L 9.2)
2	Glo/P29 (S 2-5) Glo (L 2.8)	<b>P96 (683)</b>	Mac (L 16) <b>P29 (L 189.5)</b>
3	P29 (S 18.4)	P29 (S 10.6) P96 (L 3.2)	
4	Glo (S 2.5) P29 (L 31.1)		P29 (L 78.7)
5	Mac (S 0.5)	Glo/Mac (L 13-21)	
6	Glo (S 1 ; L1.8)	Glo (L 0.2)	P29 (L 28.7)
7	P29 (S 3.6)		<b>P96 (S 51.6)</b> <b>Glo (L 477.5)</b> <b>Mac (L297.6)</b> <b>P96 (L107.6)</b>

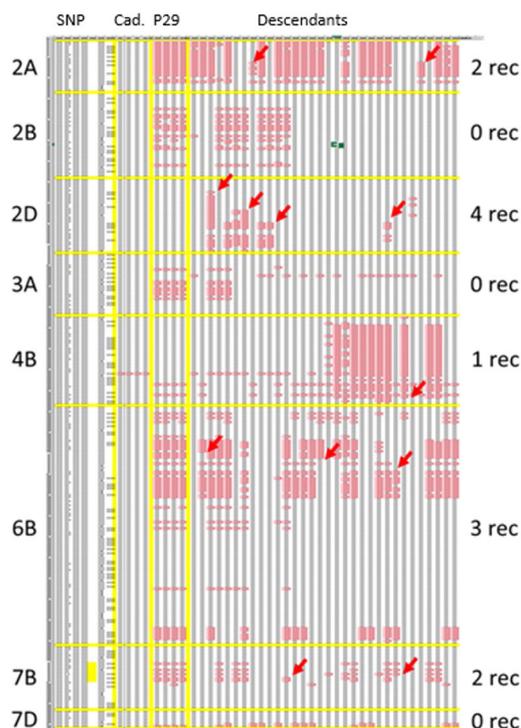
**Tableau 5 :** Résultat de l'analyse des lignées parentales à l'aide de la puce AXIOM™ 35K. Glo : Glover ; Mac : Mackellar ; P29 : P29 ; P96 : P961341. S : bras court ; L : bras long. La taille est donnée en Mégabases (Mb). Les données en rouge et gras sont les introgressions de plus grande taille.

L'analyse des données montre que chaque lignée parentale possède plusieurs introgressions de taille variable. Comme attendu du fait de la distribution de la recombinaison le long des chromosomes chez le blé, celles-ci sont en général distales et de petite taille (moins de 10 Mb). Cependant, certaines sont de très grande taille (>200 Mb) et la lignée P961341 a même probablement le chromosome 2B entier qui a été substitué. Toutes les lignées ont des introgressions au niveau du chromosome 7D ce qui suggère qu'elles possèdent toutes BYDV2 mais peut-être aussi BYDV3 (P961341). Les lignées P29 et P961341 qui ont de larges introgressions sur les chromosomes du groupe 2 (respectivement 2D et 2B) pourraient également être porteuses du gène BYDV4.

### ► 3.4. Analyse des introgressions dans la descendance

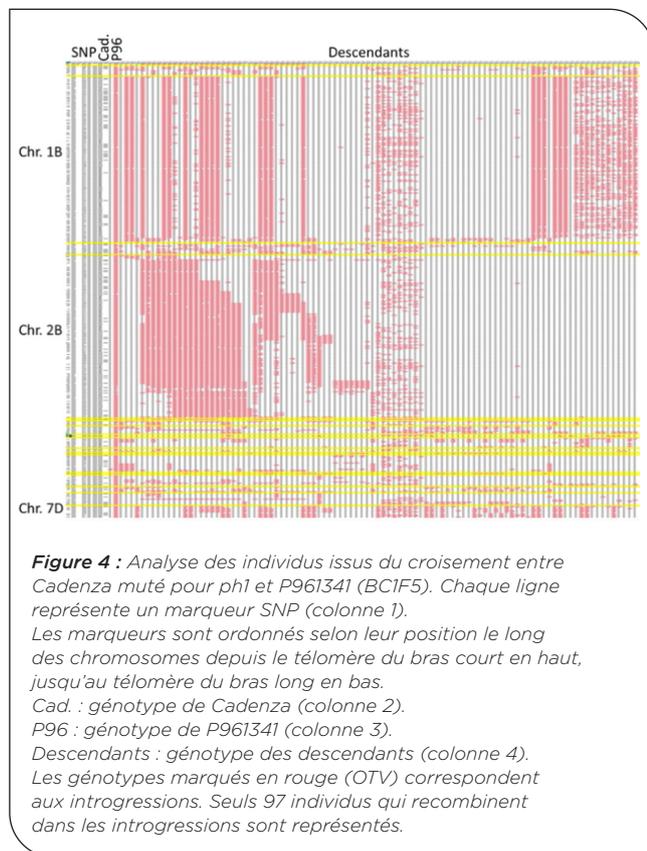
Suite aux analyses précédentes concernant les introgressions chez les lignées parentales, il a été décidé de focaliser le génotypage sur seulement quatre populations : P29 x Cad-0348, P29 x Cad-1691, P961341 x Cad-0348 et P961341 x Cad-1691. Au total, 965 descendants ont été produits pour ces quatre populations (68 pour les populations avec P29 et 897 avec P961341). Suite à la perte de quelques individus, 784 individus ont effectivement été génotypés sur trois puces SNP AXIOM™ 35K (32 avec P29 et 752 avec P961341). L'analyse comparative des parents (qui sont présents en duplicat sur chaque puce) montre que la reproductibilité est excellente entre les trois puces avec moins de 2% de données manquantes et 97.5% de données cohérentes, y-compris pour les OTV qui permettent l'identification des introgressions.

L'analyse des descendants issus des deux populations P29 (Figure 3) montre que 11 plantes sur les 32 recombinant dans les fragments introgressés de la lignée P29 (représentés en rouge sur la Figure 2, les recombinants sont identifiés par des flèches rouges également). Les fragments localisés sur les chromosomes 2B, 3A et 7D ne recombinent jamais.



**Figure 3 :** Analyse des individus issus du croisement entre Cadenza muté pour *ph1* et P29 (BC1F5). Chaque ligne représente un marqueur SNP (colonne 1). Les marqueurs sont ordonnés selon leur position le long des chromosomes depuis le télomère du bras court en haut, jusqu'au télomère du bras long en bas. Cad. : génotype de Cadenza (colonne 2). P29 : génotype de P29 (colonne 3). Descendants : génotype des descendants (colonne 4). Les génotypes marqués en rouge (OTV) correspondent aux introgressions.

De la même façon, l'analyse des descendants issus des deux populations dérivées des croisements entre Cadenza muté pour *ph1* et P961341 sont donnés dans la Figure 4. De façon intéressante, beaucoup plus d'individus recombinants sont observés (97). En particulier, les fragments introgressés du chromosome 2B sont régulièrement de taille plus réduite et les deux introgressions du Chromosomes 7D (Figure 4) sont séparées chez certains individus.



### ► 3.5. Phénotypage des populations recombinantes aux champs et en condition contrôlé

Malheureusement l'année 2023 ne nous a pas permis d'évaluer les individus avec autant de fiabilité qu'en 2020. Le taux d'infection n'a pas été aussi élevé et seuls deux lieux sur six ont pu permettre de dégager une tendance de tolérance. Notre sélection s'est donc portée d'abord sur les résultats obtenus en conditions contrôlées comme décrit dans l'annexe 1 (80 individus seulement sur 975). Une vingtaine d'individus a été sélectionnée de manière robuste. Pour les individus triés à partir des données d'expérimentation, nous allons devoir les tester de nouveau aux champs pour affiner notre sélection. Enfin, pour les individus pour lesquels nous n'avons pas pu déterminer le niveau de tolérance, nous allons grâce aux données de génotypages et l'ensemble des données de phénotypage, essayer de déterminer un profil génétique qui pourrait correspondre à nos attentes.

### ► 3.6. Analyses de la tolérance des descendants recombinants

Pour des raisons d'effectif, seulement 80 individus recombinants ont été phénotypés pour leur tolérance à la JNO en conditions contrôlées : 21 issus de la population Cadenza x P29 et 59 issus de la population

Cadenza x P961341. Pour chaque génotype, entre cinq et huit plantes sont testées (Annexe 1). Certains individus montrent un niveau de tolérance satisfaisant, en particulier dans la population issue de P961341. Une analyse rapide de leur génotype tend à montrer qu'ils ont probablement intégré le gène *BYDV2* sur le bras long du chromosome 7D et pour certains, peut-être même le gène *BYDV3* sur ce même chromosome mais sur le bras court. Une analyse plus approfondie devra être menée pour confirmer ces données.

### ► 3.7. Exploitation des résultats

Les données concernant le génotypage de tous les individus des deux populations Cadenza x P29 et Cadenza x P961341 ont été transférées aux partenaires du projet. En combinant les résultats de phénotypage et les données de génotypage, il sera possible pour chaque partenaire d'identifier les génotypes montrant le meilleur taux de résistance et ayant les fragments introgressés des deux lignées donneuses les plus courts de façon à revenir vers un génotype élite le plus rapidement possible. Tous les génotypes restent pour l'instant dans un fond génétique *ph1*. En continuant de maintenir ce fond, il est également possible de continuer de réduire la taille des introgressions de façon à limiter au maximum les effets négatifs du *linkage drag*.

## 4 Discussion et Conclusion

L'objectif du projet était de développer des génotypes adaptés aux pratiques culturales européennes et tolérants au virus de la jaunisse nanisante de l'orge (BYDV) à partir de nouvelles ressources génétiques exotiques (P29, P961341, Mackellar, Glover, Zhong-4), en utilisant une approche originale faisant intervenir des mutants du gène *ph1* impliqué dans le contrôle de la recombinaison entre chromosomes apparentés (homéologues). De ce point de vue, nous avons montré qu'il était possible de réduire par cette voie la taille des introgressions en produisant plusieurs dizaines de lignées ayant des fragments plus courts que ceux initialement présents chez les parents donneurs exotiques. La stratégie est donc tout à fait adaptée pour produire un matériel original à partir de ressources génétiques apparentées au blé.

Malgré les difficultés pour établir un phénotype précis de tolérance au virus, les essais pratiqués à la fois aux champs et en conditions contrôlées montrent que certains génotypes sont plus résistants ce qui suggère qu'ils ont bien intégré des facteurs favorables pour lutter contre cette virose. Certains génotypes semblent même avoir des introgressions différentes de celles connues portant le gène *BYDV2*. Cela suggère qu'il serait possible de combiner les deux pour produire des lignées avec un niveau de tolérance encore accru. Certains fragments restent néanmoins de grande taille et il conviendrait de poursuivre la démarche pour tenter de les réduire un peu plus de façon à éviter certains effets délétères apportés par les donneurs exotiques.

Globalement, le projet DéLiBéRé-JNO a permis de produire une collection relativement étendue de génotypes d'intérêt pour l'introduction de nouvelles sources de tolérance à la JNO dans les programmes de sélection développés en France et en Europe.

## Références bibliographiques

**Rey MD, Martin AC, Higgins JD, Swarbreck D, Uauy C, Shaw P, Moore G** (2017) Exploiting the ZIP4 homologue within the wheat Ph1 locus has identified two lines exhibiting homoeologous crossover in wheat-wild relative hybrids. *Mol Breed*, 37, 95.  
<https://doi.org/10.1007/s11032-017-0700-2>

**Rimbert H, Darrier B, Navarro J, Kitt J, Choulet F, Leveugle M, Duarte J, Rivière N, The International Wheat Genome Sequencing Consortium, The BreedWheat Consortium, Davassi A, Balfourier F, Le Paslier M-C, Bérard A, Brunel D, Feuillet C, Poncet C, Sourdille P, Paux E** (2018) High

throughput SNP discovery and genotyping in hexaploid wheat. *PLoS One*, 13(1): e0186329  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186329>

**Zhu T, Wang L, Rimbert H, Rodriguez JC, Deal KR, De Oliveira R, Choulet F, Keeble-Gagnere G, Tibbits J, Rogers J, Eversole K, Appels R, Gu YQ, Mascher M, Dvorak Jan, Luo MC** (2021) Optical maps refine the bread wheat *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring genome assembly. *The Plant Journal* 107, 303-314.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.15289>

## Annexe 1

P29			
Gen.	Nb. P	Tx. Inf.	Res.
90-3	7	100.00	1.19
90_1	8	100.00	1.45
90_2	8	87.50	1.39
91_2	7	100.00	1.08
92-3	8	100.00	1.58
92_1	8	100.00	1.39
92_2	7	100.00	1.32
93-3	8	100.00	1.18
95-4	8	100.00	1.44
95_1	8	100.00	1.30
95_2	8	100.00	1.23
96-4	8	100.00	1.13
96_1	8	100.00	1.36
97_2	6	100.00	1.60
99-4	8	100.00	0.86
99_2	8	100.00	0.97
101-3	8	100.00	1.64
101_1	8	100.00	1.31
102_1	8	100.00	1.33
103_2	7	85.71	1.26
106_2	8	87.50	1.35

P961341											
Gen.	Nb. P	Tx. Inf.	Res.	Gen.	Nb. P	Tx. Inf.	Res.	Gen.	Nb. P	Tx. Inf.	Res.
108-4	8	62.50	1.04	164_1	8	62.50	1.00	203_1	8	100.00	1.54
108_1	8	75.00	0.72	173_1	8	75.00	0.53	203_2	7	100.00	1.69
109_1	8	50.00	0.81	177_1	8	100.00	0.62	204-3	8	100.00	1.84
110_1	8	100.00	0.74	177_2	8	87.50	0.74	204_1	7	100.00	1.41
110_2	8	100.00	0.87	180_2	7	100.00	0.74	205-4	8	100.00	1.09
112_2	8	100.00	0.74	181_2	8	100.00	1.40	205_1	8	100.00	1.51
116_1	7	85.71	0.59	187_1	8	100.00	1.47	206-3	8	100.00	1.66
117_2	7	100.00	0.94	187_2	7	100.00	0.78	206-4	8	100.00	1.57
121_1	8	62.50	0.61	188_2	8	100.00	0.60	206_1	8	100.00	1.13
128_1	8	50.00	0.47	190-4	7	100.00	0.89	208_2	8	50.00	1.05
130_1	8	100.00	1.34	190_1	8	87.50	0.75	209-4	8	75.00	1.74
131-4	8	75.00	0.90	190_2	8	87.50	0.47	210-4	8	100.00	1.79
131_2	6	33.33	0.49	192_1	8	100.00	1.33	210_2	8	100.00	1.73
137-4	8	75.00	1.08	194_1	8	100.00	0.81	211_1	8	87.50	1.40
139-3	5	60.00	0.68	195_1	8	87.50	0.90	212_1	8	100.00	1.26
142_2	8	87.50	0.71	196_2	8	75.00	0.70	213_2	8	100.00	1.71
143_2	7	71.43	0.78	198_1	8	75.00	0.55	215_2	8	100.00	1.28
149_1	8	87.50	0.57	199_2	8	100.00	1.17				
156-4	8	87.50	1.33	201_1	8	100.00	1.59				
156_1	8	87.50	0.69	202_1	8	100.00	1.45				
162-3	8	87.50	0.50	203-4	8	100.00	1.57				

Valeur de résistance à la JNO des individus recombinants des deux populations dérivées des croisements entre Cadenza et P29 ou P961341 obtenues en conditions contrôlées (JKI).

Gen. Numéro de l'individu ; Nb. P : nombre de plantes semées ; Tx. Inf. : taux d'infection ; Res. : valeur de résistance (plus la valeur est proche de 0, plus la lignée est résistante).



# DéLiBéRé-JNO : Développement de Lignées de Blé adaptées et Résistantes à la Jaunisse Nanisante (JNO)

Edouard PENEZ<sup>1\*</sup>, Philippe MOMONT<sup>1</sup>, Charles SNIJDERS<sup>1</sup>, Anne-Charlotte LOMBART<sup>1</sup>, Pascal GIRAudeau<sup>1</sup>, Romain LAMERAND<sup>1</sup>, Gemma MOLERO<sup>1</sup>, Patrice SENELLART<sup>1</sup>, Sylvie DUTRIEZ<sup>1</sup>, Matthieu MICHEL<sup>1</sup>, Raphael VEQUAUD<sup>1</sup>, Paul FORGEOIS<sup>2</sup>, Charlotte THIBAUT<sup>2</sup>, Torsten WILL<sup>3</sup>, Pierre SOURDILLE<sup>4</sup>

1 - CETAC - 7, rue du Coq HERON, 75030 Paris

2 - INSTITUT DE GENECH - rue de la libération, 59242 Genech

3 - JULIUS-KÜHN-INSTITUT - Erwin Baur Strasse 27, 06484 Quedlinburg, ALLEMAGNE

4 - INRAE - UMR 1095 Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales, 63100 Clermont-Ferrand

\*Coordinateur : Edouard PENEZ, edouard.penez@asur-plantbreeding.com

## Résumé

L'objectif global du projet DéLiBéRé-JNO était de développer des lignées de blé proches d'un matériel élite d'hiver employé dans les schémas de sélection Européens mais portant des introgressions issues d'espèces apparentées leur conférant un niveau de résistance à la JNO satisfaisant. Le projet repose sur la création et la caractérisation moléculaire et phénotypique d'une population de lignées recombinantes issues du croisement entre une variété proche de l'élite européenne (Cadenza) et mutée pour le gène *ph1*, et différentes variétés exotiques apportant une bonne tolérance à la JNO de par leurs introgressions issues de *Thinopyrum intermedium* et *Agropyron cristatum*, mais inadaptées aux pratiques culturales européennes. Le projet DéLiBéRé-JNO a permis de produire une collection relativement étendue de génotypes d'intérêt pour l'introduction de nouvelles sources de tolérance à la JNO dans les programmes de sélection développés en France et en Europe.

## Introduction

La jaunisse nanisante de l'orge (JNO) est la plus grave maladie virale des céréales à paille. Causée par des virus (Barley yellow dwarf virus, BYDV) transmis exclusivement par pucerons (*Rhopalosiphum padi* et *Sitobion avenae* Fig.1), elle impacte fortement la production sans possibilité de lutter directement contre les virus. Par ailleurs, les recommandations du plan Ecophyto II (réduction de l'utilisation des pesticides) et l'interdiction des Néonicotinoïdes sur céréales à compter de l'automne 2018 imposent aux différents acteurs de la filière (de l'agriculteur à l'obteneur) la recherche de nouvelles solutions pour garantir la qualité sanitaire des cultures. De plus, le changement climatique induit également des hivers plus doux et des périodes de froid plus tardives qui se traduisent par une recrudescence des maladies virales. Cette virose impacte fortement la production céréalière et entraîne des pertes de rendements en moyenne de 30% dans les champs infectés qui peuvent, lors de fortes épidémies (campagne 2015-2016), atteindre plus de 80%.

Le développement de variétés résistantes/tolérantes à la JNO représente donc une priorité. L'introgression d'une résistance partielle à la JNO chez le blé à partir d'espèces apparentées s'accompagne de l'introduction de caractères délétères apportés par des allèles liés aux gènes d'intérêt (*linkage drag*). L'enjeu des programmes d'amélioration du blé pour la résistance à la JNO est donc de limiter la taille des introgressions de génomes d'espèces sauvages pour s'affranchir des conséquences du *linkage drag*.



Figure 1 : *Rhopalosiphum padi* et *Sitobion avenae*, vecteurs de la JNO.



Figure 2 : expérimentation JNO blé 2019/2020 à Aiguisy (60)

**WP1 : Caractérisation par phénotypage en conditions aux champs et en conditions contrôlées** des ressources génétiques :

En 2020, 109 accessions ont été évaluées aux champs avec un très bon niveau d'infection comme le montre la Figure 2, avec au centre de l'image, les ressources génétiques en évaluation, entourées d'orge présentant des symptômes caractéristiques de la JNO.

Le Tableau 1 reprend une partie des résultats obtenus sur 3 lieux d'expérimentation. Toute la gamme de résistance (1 à 9) a été observée avec un faible écart type entre les mesures. Pour consolider nos résultats, un panel de 6 variétés sensibles et de 6 variétés résistantes a été envoyé au JKI (Figure 3).

A partir de ces résultats, nous avons identifié les ressources génétiques (en gras dans le Tableau 1) à utiliser comme lignées parentales dans notre programme de croisements.

**WP2 : Développer du matériel végétal original résistant à la JNO** avec des introgressions de taille réduite en s'appuyant sur l'utilisation de lignées de blé ayant une aptitude à la recombinaison homologue : Pour le développement des populations, les croisements font intervenir deux lignées dérivées de la variété Cadenza mutée par Éthyle-Méthane-Sulfonate (EMS) au niveau du gène *ph1*: Cadenza-0348 et Cadenza-1691 avec cinq lignées connues comme ayant un bon niveau de résistance à la JNO : Glover (*BYDV2*), Mackellar (*BYDV2*), P29 (*BYDV3*), P961341 (*BYDV3*), Zhong-4 (*BYDV4*). Par la suite, les individus hybrides ont été rétro-croisés par les individus Cadenza correspondant (génération BC1F1). Après, un tri moléculaire pour isoler les individus homozygotes mutants *ph1* et hétérozygotes au niveau des introgressions, ceux-ci ont été autofécondés pour générer une population en ségrégation (BC1F2). Les individus ont ensuite été conduits par autofécondations successives (*Single Seed Descent*) jusqu'en génération BC1F5.

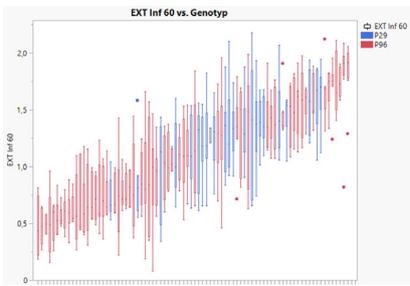


Figure 4 : Résultats obtenus après test ELISA, EXT Inf 60 : valeur de résistance (plus la valeur est proche de 0, plus la lignée est résistante) sur 80 individus recombinants BC1F5 issus de 2 sources P29 (en bleu) et P961341 (en rouge)

Génotype	Score 1	Écartype 1	Score 2	Écartype 2
AUS 11555	1.5	0.9	1.2	0.3
CPI 147233b	1.8	0.4	2.0	0.7
ZHONG 4	1.0	0.0	2.0	0.8
CPI 147251b	2.8	1.1	2.5	1.4
CPI 147236a	2.3	1.2	2.7	1.5
CPI 147242b	1.8	0.8	2.7	1.5
OKT11542	2.3	1.2	3.0	1.7
AUS 6770	2.7	0.3	3.2	0.6
CPI 147239b	1.7	1.2	3.2	2.0
CPI 147247a	1.7	1.2	3.3	2.1
CPI 147280b	2.3	1.5	3.5	2.5
CPI 147232 a/b	2.2	0.8	3.7	2.0
CPI 147238b	2.3	1.5	3.7	2.3
CPI 147231b	2.3	1.5	3.8	3.3
CPI 147234b	1.7	0.6	3.8	2.5
CPI 147250a	3.2	2.0	4.5	3.1
AABBVAV	4.0	3.5	4.7	3.8
CPI 147247b	4.7	0.5	5.3	0.3
P99	3.2	1.6	5.3	2.4
P961341	6.3	2.5	7.2	3.2
GLOVER	6.0	2.8	7.5	2.1
MACKELLAR	5.5	0.7	0.8	1.4
Toluca 50	8.2	0.8	8.7	0.6
Téap Yuan 2	8.2	1.0	8.7	0.6
FAO33316	8.8	0.4	8.8	0.4
IJO 1828	8.5	0.9	8.8	0.3

Tableau 1 : Résultats obtenus après observations aux champs sur les lignées parentales (en gras) et sur les meilleures ressources génétiques testées par le CETAC - Moyennes sur 3 lieux - année 2019/20 (1 = tolérant / 9 = sensible)

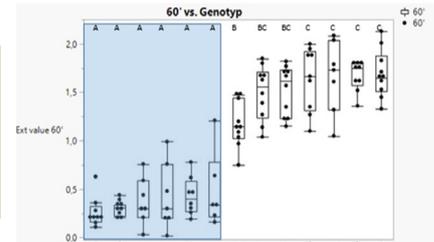


Figure 3: Représentation graphique du titre de virus après 7 jours d'inoculation en conditions contrôlées des 2 groupes des accessions. A gauche du graphique sur fond bleu, les accessions tolérantes et à droite les sensibles.

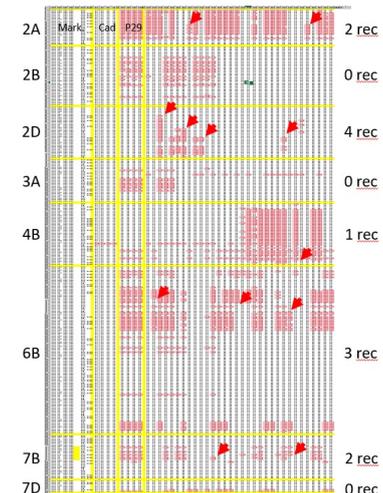


Figure 5 : Analyse des individus issus du croisement entre Cadenza muté pour *ph1* et P29 (BC1F5). Chaque ligne représente un marqueur SNP (colonne 1). Les marqueurs sont ordonnés selon leur position le long des chromosomes depuis le télomère du bras court en haut, jusqu'au télomère du bras long en bas. Cad : génotype de Cadenza (colonne 2). P29 : génotype de P29 (colonne 3). Descendants : génotype des descendants (colonne 4). Les génotypes marqués en rouge (OTV) correspondent aux introgressions.

**WP3 : Caractérisation phénotypique** (inoculations calibrées au laboratoire et champs) et **moléculaire** (taille et position des introgressions, marqueurs diagnostics) du matériel créé.

A partir des 975 plantes BC1F5 développées, 80 individus recombinants ont été sélectionnés par rapport à leur profil génétique. Ils ont été ensuite phénotypés pour leur tolérance à la JNO en conditions contrôlées : 21 issus de la population Cadenza x P29 et 59 issus de la population Cadenza x P961341. La Figure 4 reprend les résultats obtenus en conditions contrôlées, des 80 individus recombinants issus de 2 sources (P29 et P961341).

Concernant le phénotypage aux champs, malheureusement l'année 2023 ne nous a pas permis d'évaluer les individus (975 BC1F5) avec autant de fiabilité qu'en 2020. Le taux d'infection n'a pas été aussi élevé et seuls deux lieux sur six ont pu permettre de dégager une tendance de tolérance.

L'analyse des descendants issus des deux populations P29 (Figure 5) montre que 11 plantes sur les 32 recombinants dans les fragments introgressés de la lignée P29 (représentés en rouge sur la Figure 5), les recombinants sont identifiés par des flèches rouges également). Les fragments localisés sur les chromosomes 2B, 3A et 7D ne recombinent jamais.

## Conclusion

L'objectif du projet était de développer des génotypes adaptés aux pratiques culturales européennes et tolérants au virus de la jaunisse nanisante de l'orge (BYDV) à partir de nouvelles ressources génétiques exotiques (P29, P961341, Mackellar, Glover, Zhong-4), en utilisant une approche originale faisant intervenir des mutants du gène *ph1* impliqué dans le contrôle de la recombinaison entre chromosomes apparentés (homéologues). De ce point de vue, nous avons montré qu'il était possible de réduire par cette voie la taille des introgressions en produisant plusieurs dizaines de lignées ayant des fragments plus courts que ceux initialement présents chez les parents donneurs exotiques. La stratégie est donc tout à fait adaptée pour produire un matériel original à partir de ressources génétiques apparentées au blé.

