



# SYNTHESE DES PROGRAMMES DE RECHERCHE FSOV



Actes de la rencontre scientifique - 8 janvier 2008



*Fonds de soutien à l'Obtention Végétale*

# Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale

Dans l'accord interprofessionnel relatif au renforcement de l'obtention végétale dans le domaine du blé tendre, le Fonds de Soutien à l'Obtention Végétale (FSOV) a été défini comme un fonds destiné à financer des programmes de recherche collectifs dans le domaine du blé tendre, dont la finalité est la sélection de variétés adaptées à une agriculture durable plus respectueuse de l'environnement.

Pour être éligibles, les programmes doivent être originaux et aborder des thématiques conduisant à la création de variétés privilégiant les facteurs de régularité du rendement et permettant de répondre aux diverses qualités exigées par les marchés.

Depuis la création du FSOV, quatre appels à propositions (2003, 2004, 2006 et 2008) ont permis de financer 31 programmes de recherche.

Ces 31 programmes peuvent être regroupés en quatre thèmes principaux qui sont l'amélioration de la qualité technologique, l'amélioration de la qualité sanitaire, le développement de résistances aux maladies et ravageurs et, depuis 2008, un nouveau thème, la valorisation des intrants et des ressources naturelles.

Le partenariat de ces programmes de recherche concerne l'ensemble des sélectionneurs de blé tendre, soit au titre de l'AFSA, du CETAC, du GIE Bioplante ou du GIE CLUB 5, soit à titre individuel, 7 unités de recherche publique, la FNAMS, le GEVES, des instituts, ARVALIS - Institut du végétal et l'ITAB, des universités ou des écoles d'ingénieurs en agriculture.

Cette synthèse des programmes de recherche FSOV présente les résultats des programmes retenus lors des appels à propositions 2003 et 2004. Ils ont fait l'objet d'une communication orale lors de la rencontre scientifique du 8 janvier 2008 à Paris.



Robert PELLERIN  
Président du Comité d'engagement du FSOV



**Section Céréales et Protéagineux**  
44 rue du Louvre - 75001 Paris  
Tél. : 01 42 33 86 79 - E-mail : fsov@gnis.fr

# SOMMAIRE

---

|  |         |
|--|---------|
| Étude des populations françaises de septorioses<br>et recherche de sources de résistance chez le blé .....   | page 2  |
| Actions pour mieux exploiter et accroître la résistance<br>du blé au piétin-verse et à la jaunisse nanisante de l'orge .....   | page 8  |
| Analyse de la durabilité de résistances au virus<br>de la jaunisse nanisante de l'orge .....   | page 15 |
| Durabilité de la résistance partielle à la rouille brune du blé .....  | page 17 |
| Résultat d'étude en laboratoire de la sensibilité<br>variétale chez le blé tendre pour l'appétence aux limaces .....   | page 23 |
| Unravelling and exploitation of diversity for resistance<br>to <i>Mycosphaerella graminicola</i> and <i>Fusarium graminearum</i><br>in wheat and its progenitors ..... | page 31 |
| Méthodologie de caractérisation des variétés et proposition<br>de conduites culturales adaptées à une agriculture durable .....  | page 39 |
| Résistance à la fusariose et mycotoxines dans les grains de blé tendre .....   | page 46 |
| Comportement de variétés de blé tendre à la fusariose<br>des épis et à l'accumulation de mycotoxines dans les grains .....   | page 52 |
| Sensibilité à la germination avant récolte et aux bas temps<br>de chute de Hagberg : déterminants, enjeux et évaluation variétale .....                                | page 62 |
| Étude et prédiction des fractions protéiques de réserve<br>et indices de sélection pour la qualité .....   | page 68 |
| Amélioration conjointe de l'efficacité d'absorption<br>de l'azote et de la teneur en protéines chez le blé tendre .....  | page 74 |

# Étude des populations françaises de septorioses et recherche de sources de résistance chez le blé

Patrice HALAMA\*<sup>1</sup>, Daniel CARON<sup>2</sup>, Volker LEIN<sup>3</sup>, Philippe REIGNAULT<sup>4</sup>, Jean SANSENE<sup>5</sup>

\* Coordinateur : Patrice HALAMA, p.halama@isa-lille.fr, Tél. : 03 28 38 46 20

1 - ISA - 48 boulevard Vauban, 59046 Lille Cedex

2 - ARVALIS - Institut du végétal - Station Inter instituts, 6 chemin de Côte Vieille, 31450 Baziège

3 - CETAC - Saaten-Union Recherche Sarl, 163, avenue des Flandres, 60190 Estrées St Denis

4 - ULCO - 17, avenue Blériot, BP 699, 62228 Calais Cedex

5 - Instiut Polytechnique LaSalle Beauvais - rue Pierre Waguët, 60026 Beauvais Cedex

Deux parasites fongiques *Phaeosphaeria nodorum* (*Stagonospora nodorum*) et *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) sont à l'origine des septorioses du blé. Dans un contexte d'apparition et d'extension de résistances à certaines matières actives et de nécessité de diminution des intrants, la diversification des gènes de résistance apparaît comme une stratégie d'assurance, économe en intrants, pour limiter la progression des épidémies et augmenter la durabilité d'efficacité de résistances nouvellement introduites. La prise en compte de la variabilité parasitaire est essentielle dans les stratégies de sélection variétale ; celle-ci nécessite une collaboration étroite entre sélectionneurs et phytopathologistes.

L'objectif majeur de ce projet était de mettre en évidence chez les variétés actuelles et chez des lignées de blé, des résistances partielles, totales ou des tolérances aux septorioses dans la perspective de pouvoir intégrer ces génotypes dans les schémas de sélection. Si *S. nodorum* a longtemps été considérée comme préoccupante, il semble que depuis quelques années, *S. tritici* soit devenue en France l'espèce la plus fréquente. Les travaux réalisés à l'étranger mettent en évidence un rôle important de la phase sexuée dans la structure génétique des populations de ce parasite. En France, aucune étude récente de la population n'a été conduite au plan national. La première étape du projet a consisté à faire un inventaire des populations de septorioses rencontrées en France. A partir des souches collectées, une caractérisation a été entreprise ; celle-ci portant sur les types génétiques (microsatellites et PCR-SSCP), sur l'identification des *mating types* (espèces hétérothalliques) et sur l'évaluation du pouvoir pathogène. La recherche de résistance ou de tolérance s'est faite dès la première année dans le cadre d'essais multi-locaux sur une centaine de lignées au départ puis poursuivie avec les génotypes ayant exprimé des résistances ou des tolérances de bons niveaux. Pour les génotypes exprimant les résistances les plus élevées ou des tolérances, une étude des mécanismes impliqués a été réalisée par des approches cytologiques et physiologiques.

## 1. Échantillonnage et isolement des souches

### ► Matériel et méthodes

Durant avril-mai 2005 et avril 2006, un échantillonnage de feuilles de blé présentant des symptômes de type septoriose a été réalisé dans la plupart des grandes régions productrices de blé en France. Après réception au

laboratoire, une procédure d'identification et d'isolement des souches a été adoptée.

Des souches monosporiques ont été isolées puis conservées à -80 °C.

### ► Résultat

Seul *M. graminicola* (= *S. tritici*) a été identifié dans les échantillons prélevés. Au cours de la campagne 2005, 365 souches de *M. graminicola* ont été obtenues à partir des feuilles de blé échantillonnées. Ces feuilles avaient été récoltées dans 17 sites localisés en majorité dans la moitié nord de la France. Pour compléter cet échantillonnage et afin d'augmenter la représentativité au niveau de l'ensemble du territoire français, un autre prélèvement de 136 souches a été réalisé en 2006 sur 7 sites situés dans l'ouest et le sud de la France.

En 2005, la plupart des souches de *M. graminicola* collectées (303) ont été isolées à partir de cinq variétés de blé de référence : Apache, Caphorn, Orvantis, Charger et Soissons et 62 souches sont isolées à partir d'autres variétés : Robigus, Hammac, Calisto. En revanche, l'échantillonnage de toutes les souches de 2006 a été réalisé seulement sur les cinq variétés de référence dans la mesure où ce sont les variétés les plus représentatives de l'échantillonnage de 2005.

## 2. Caractérisation

### ► Aspects cultureux

Suite aux isollements, nous avons pu constater différents aspects cultureux lors de la croissance des souches sur le milieu PDA. Ces aspects cultureux sont conformes à ceux observés par Djerbi et al. (1974). Trois semaines après l'isolement, nous avons pu classer les phénotypes cultureux des souches lors de leur croissance sur PDA en 4 catégories : rose très clair, rose clair, rose foncé et brun noir.

### ► Hétérothallisme

#### Matériel et méthodes

Les *mating types* des souches isolées sont déterminés par amplification par PCR des deux *mating types* (MAT1-1 et MAT1-2) (Waalwijk et al., 2002). Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification de MAT1-1 sont : F (5'-CCGTTTCTGGCTTCTCGACTG-3', position des nucléotides entre 5.494 et 5.517 sur le locus *mat1-1*, numéro d'accès à Genbank : AF440399) et R (5'-TGGACACCATGGTGAGAGAACC-3',

position des nucléotides entre 5.812 et 5.834). Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification de MAT1-2 sont : F (5'-GGCGCTCCGAAGCAACT-3', position des nucléotides entre 10.048 et 10.065 sur le locus *mat1-2*, numéro d'accès à Genbank : AF440398) et R (5'-GATGCGTTCTGGACTGGAG-3', position des nucléotides entre 10.685 et 10.704).

La répartition des deux *mating types* est analysée avec le test de  $\chi^2$  au risque  $\alpha = 5\%$ . Afin d'augmenter la fiabilité du test statistique appliqué, certains départements à partir desquels moins de 10 souches ont été isolées sont regroupés avec les départements les plus proches géographiquement. Afin de caractériser des variations de séquences, les amplicons *mat1-1* et *mat1-2* obtenus sont analysés par PCR-SSCP.

### Résultats

Les 2 types hétérothalliques sont présents dans chacune des localités françaises, y compris dans les localités où les tailles des échantillons sont faibles. Parmi les 510 souches testées, 228 (45 %) sont de type MAT1-1 et 282 (55 %) sont de type MAT1-2. Le test statistique de  $\chi^2$  a révélé une légère différence significative sur cette répartition globale des 2 *mating types* ( $P = 0.017 < 0.05$ ). Par ailleurs, l'application du même test statistique au sein de chacune des localités a montré qu'à l'exception d'une localité où une différence significative est observée ( $P = 0.02 < 0.05$ ), les 2 *mating types* se répartissent en fréquence équivalente dans toutes les localités à partir desquelles l'échantillonnage a été effectué. Après l'élimination des souches originaires de cette localité, la distribution globale au sein de la population française de *M. graminicola* devient équivalente à  $P = 0.05$  ( $P = 0.09 > 0.05$ ). Sur les feuilles où deux souches ou plus ont été isolées, 42 % contenaient les 2 *mating types*, 28 % contenaient seulement MAT1-1 et 30 % contenaient seulement MAT1-2. L'application du test de  $\chi^2$  a montré que les 2 types hétérothalliques se répartissent en fréquence équivalente entre les différentes variétés de blé à partir desquelles l'échantillonnage a été réalisé. L'analyse statistique n'a montré aucune différence significative entre les phénotypes des colonies et les types hétérothalliques des souches testées.

En ce qui concerne le polymorphisme, l'analyse des fragments par PCR-SSCP a montré que sur les 228 amplicons *mat1-1* analysés, un seul a présenté un profil différent du profil commun observé sur le gel SSCP. En revanche, sur les 282 amplicons *mat1-2* testés, 6 profils différents sont observés. Chaque polymorphisme est présenté seulement par une seule souche, sauf 2 des 6 profils observés chez les *mat1-2*, qui sont présentés respectivement par 2 et 4 souches différentes. Les 2 *mat1-1* et *mat1-2* des isolats de référence IPO323 et IPO94269 ont présenté un profil identique aux 2 profils communs observés chez les souches MAT1-1 et MAT1-2 respectivement. Le séquençage a révélé que tous les polymorphismes observés sur le gel SSCP sont dus à des variations d'un seul nucléotide. De plus, les souches MAT1-2 qui ont présenté les mêmes profils sur le gel SSCP ont montré la même variation nucléotidique. Parmi les 7 variations nucléotidiques obtenues, seules 2 d'entre elles ne sont pas silencieuses. Chez la souche T0629, une transition d'une thymine par une cytosine à la position 5.627 sur le locus *mat1-1* (numéro d'accès Genbank : AF440399) induit une substitution d'une phénylalanine par une sérine à la

position 202 de la protéine *mat1-1*. Tandis que pour la souche T0146, une transition d'une guanine par une adénine à la position 10.680 sur le locus *mat1-2* (numéro d'accès Genbank : AF440398) induit une substitution d'une méthionine par une isoleucine à la position 321 de la protéine *mat1-2*.

### ► Structure génétique

#### Matériel et méthodes

Les départements ayant moins de 10 isolats ont été regroupés suivant les distances géographiques ; ainsi 12 localités ont été retenues. Les amorces PCR des 4 marqueurs microsatellites ST1A4, ST1E3, ST1E7 et ST1D7 (Owen *et al.* 1998) ont été retenues après une étude préliminaire car ils montraient le plus haut degré de polymorphisme. L'amplification des produits PCR des microsatellites sur le thermocycleur MJResearch PTC 200 et l'ajout du tampon ont été réalisés comme décrit par Razavi et Hughes (2004a). Deux types de gels sont utilisés pour la technique de microsatellites : un gel de résolution et un gel de concentration. Pour la révélation des profils au nitrate d'argent, le protocole de Bassam *et al.* (1991) a été appliqué.

Les deux amorces des séquences partielles de gènes,  $\beta$ -tubuline et actine (Banke *et al.*, 2004) étudiées par PCR-SSCP ont été synthétisées par Invitrogen®. L'amplification de la PCR-SSCP a été accomplie dans le même thermocycleur cité précédemment. Le gel de polyacrylamide non dénaturant (MDE 2x concentrate, FMC Bioproducts) a été préparé selon les instructions du fabricant. La coloration est réalisée au nitrate d'argent en appliquant une technique modifiée du protocole de Bassam *et al.* (1991).

La fraction clonale a été calculée suivant la formule de Jürgens *et al.* (2006). Pour éliminer tout risque d'erreur dû à la sur-représentation, les fréquences d'allèles des clones ont été corrigées, et le programme PopGene (Version 1.32; 2000, Yeh *et al.*, Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada, URL <http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>) a été utilisé pour évaluer les paramètres génétiques suivants : la fraction clonale (CF), l'indice de Nei, l'indice de Shannon, le GST, le flux de gène ( $Nm$ ), le déséquilibre gamétique et la distance génétique de Ney.

#### Résultats

Sur les 363 souches, 305 haplotypes (84 %) sont analysés, car 16 % des souches de la population formaient des clones. L'index de diversité génique a une moyenne de 0,70 ; le marqueur de microsatellite ST1E7 (0,38) était le moins polymorphe tandis que le gène d'actine (0,88) présentait le plus haut degré de polymorphisme parmi les 4 marqueurs microsatellites et les 2 séquences partielles des gènes étudiés.

En ce qui concerne la diversité génétique globale, les tests du déséquilibre gamétique entre chacun des allèles des marqueurs microsatellites et des gènes d'actine et de  $\beta$ -tubuline analysés par SSCP ont montré que des 1264 comparaisons d'allèles entre elles, seuls 136 tests (environ 18 %) sont statistiquement significatifs ( $P \leq 0,05$ ). Ceci prouve que la majorité des allèles des marqueurs microsatellites et des allèles des 2 gènes étudiés sont aléatoirement associés. Au niveau de la localité, aucun test de déséquilibre gamétique n'était significatif. Un haut degré de diversité génique pour l'indice de Nei (0,71) et l'index de Shannon (1,58) confirment le faible taux de

clonalité entre les localités. Le nombre moyen d'allèles observés est de 4,42 avec un minimum pour le marqueur de ST1E7 (1,66) et un maximum pour le gène d'actine (9,05).

En comparant les 12 localités entre elles, le nombre moyen d'allèles a varié entre 2.32 et 3.73. Les diversités géniques sont de 0,45 pour la valeur la plus faible et de 0,68 pour la valeur la plus élevée; tandis que pour l'index de Shannon, les valeurs extrêmes sont de 0,82 et de 1,36. Les valeurs du déséquilibre gamétique varient de  $1.10^{-3}$  à  $36.10^{-3}$ .

La différenciation des populations ( $G_{ST}$ ) entre toutes les localités présente une valeur minimale de 0,12 pour le gène d'actine et une valeur maximale de 0,36 pour le marqueur ST1A4. Tandis que pour le flux des gènes ( $N_m$ ), la valeur minimale est de 0,88 pour le marqueur ST1A4 avec une valeur maximale de 3,75 pour le gène d'actine. La moyenne de  $G_{ST}$  est de 0,18 avec un  $N_m$  de 2,25. En comparant les localités entre elles, la  $G_{ST}$  varie entre 0,44 et 0,19, les valeurs du  $N_m$  se situant entre 2,10 et 11,52.

La comparaison de l'identité génétique et de la distance génétique entre les différentes localités françaises décrites montre 3 groupes génétiques (Figure 1).

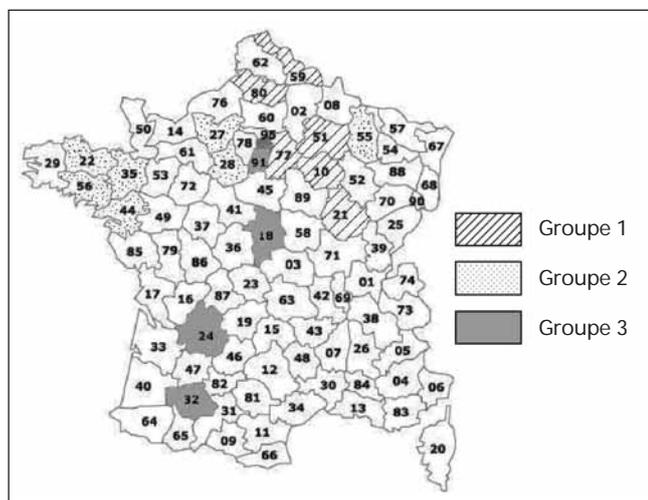


Figure 1 : Distribution géographique des groupes génétiques. Chaque groupe est formé de départements qui sont relativement proches suivant la distance génétique de Nei (1978) pour les loci de microsatellite et les séquences d'actine et de  $\beta$ -tubuline analysées par SSCP.

## ► Pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène a été évalué par les symptômes observés, la fréquence des pycnides accompagnée par des observations cytologiques (germination des spores, pénétration, invasion du mésophile) ainsi que la production des xylanases (Douaiher et al., 2007a et b).

## Matériel et méthodes

Des plantules de blé au stade 3 feuilles (4<sup>ème</sup> feuille émergente) sont inoculées en serre. L'évaluation a été effectuée sur la variété de blé SCORPION. Six pots à raison de 12 plantules/pot sont utilisés pour chaque souche ainsi que pour le témoin pour chaque jour d'étude. Les symptômes et la sporulation, exprimés par le pourcentage des nécroses foliaires contenant les pycnides, sont notés tous les 2 jours jusqu'à 22 jours post-inoculation sur les 3<sup>èmes</sup> feuilles des mêmes plantes utilisées pour les dosages enzymatiques. A partir des plantules de blé utilisées pour le dosage des activités enzymatiques, des segments de 2 cm sont coupés à partir des 3<sup>èmes</sup> feuilles inoculées et non inoculées (témoin). Pour évaluer la germination des spores et la pénétration des tissus foliaires, une coloration au Calcofluor a été effectuée. La colonisation du mésophile, quant à elle, a été évaluée par une coloration au bleu Trypan. Les protéines totales sont extraites suivant le protocole de Magro (1984) et sont quantifiées selon la méthode de Bradford (1976). Les activités enzymatiques ont été dosées suivant la méthode modifiée du 3,5-DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique) (Miller, 1959).

## Résultats

La pathogénicité de 22 souches représentatives de 22 groupes génétiques identifiés, suite à la caractérisation génétique ainsi que les 2 souches de référence, a été évaluée en serre sur le cultivar de blé SCORPION. Une variation très importante du niveau du pouvoir pathogène a été observée entre les souches appartenant aux groupes génétiques différents (Figure 2). En effet, aucun symptôme (chlorose ou nécrose) contenant des pycnides n'a été observé sur les plantules inoculées par certaines souches (ex. T0262, T0441...). En revanche, d'autres souches provoquent d'importants symptômes présentant des pycnides (ex. T049, T0491...). Une corrélation élevée a été observée entre ce dernier critère et l'activité xylanase mesurée *in vitro*.

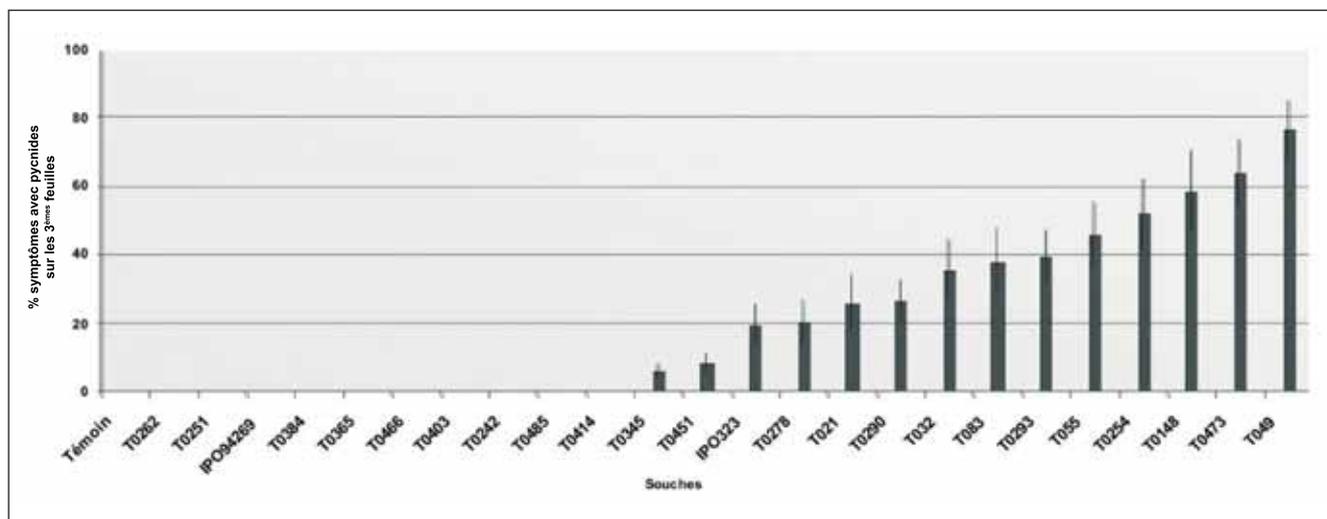


Figure 2 : Pourcentage des surfaces foliaires présentant des symptômes et des pycnides pour 22 souches représentatives de 22 groupes génétiques différents et les 2 souches de références (IPO).

### 3. Évaluation de la résistance et de la tolérance de génotypes de blé

#### ► Évaluation de la résistance

##### Matériel et méthodes

Des essais multisites ont été réalisés par le CETAC en 2005, 2006 et 2007 avec respectivement 4, 3 et 5 sites.

Les expérimentateurs ont effectué 1 à 5 notations sur la septoriose, l'épiaison et les autres maladies foliaires (oidium, rouille jaune et rouille brune). Les expérimentateurs se sont mis d'accord sur une notation avec une échelle linéaire allant de 1 (très résistante) à 9 (très sensible), (tableau 1).

| NOTE | Échelle linéaire (%) |   |      |
|------|----------------------|---|------|
| 1    |                      |   | 0    |
| 2    | > 0                  | - | 12.5 |
| 3    | > 12.5               | - | 25.0 |
| 4    | > 25.5               | - | 37.5 |
| 5    | > 37.5               | - | 50.0 |
| 6    | > 50.0               | - | 62.5 |
| 7    | > 62.5               | - | 75.0 |
| 8    | > 75.0               | - | 87.5 |
| 9    | > 87.5               | - | 100  |

Tableau 1 : Transformation de la notation en % surface présentant des symptômes.

##### Résultats

Sur la figure 3, on peut noter quelle que soit l'année, un bon comportement de résistance pour certains génotypes, en particulier pour Toisondor, Gen\_25, Gen\_49, Robigus, Gen\_30.

#### ► Évaluation de la tolérance

La tolérance peut être mesurée par la chute de rendement d'une variété inoculée par rapport à son statut sain. Comme le confirme Zuckerman et al. (1997) et Parker et al. (2004), les mécanismes de tolérance sont très peu étudiés et connus.

Afin de formaliser les déterminants de la tolérance du blé à la septoriose, nous avons évalué au champ le comportement de résistance et l'impact de la maladie sur le rendement et ses composantes pour vingt génotypes de blé d'hiver, au cours de deux années culturales (2005-2006 et 2006-2007).

##### Matériel et méthodes

Vingt génotypes, dont la plupart non encore inscrits, ont été implantés. Ces génotypes se caractérisent par leur différence de précocité (Précoces, 1/2 Précoces et Tardifs) et leur sensibilité à la septoriose. Les dates et densités de semis ont été adaptées à la classe de précocité de chacun des génotypes.

Un dispositif en blocs (répétitions) comprenant chacun les 20 génotypes pour chacune des 2 modalités Protégé/Inoculé (chacun des blocs comprenait 40 micro parcelles) a été mis en place. Les inoculations ont été faites à un volume de 300 L/ha pour des concentrations de 10<sup>6</sup> spores/mL. Les inoculations ont été réalisées par temps calme, humide et doux, avec présence de rosée sur la végétation grâce à un pulvérisateur à dos (Pull Prex) en 2006 et avec un pulvérisateur tracté en 2007.

Pour chaque parcelle, les notations de stades de développement, les notations de maladies ainsi que les différents prélèvements, puis la récolte ont été réalisés.

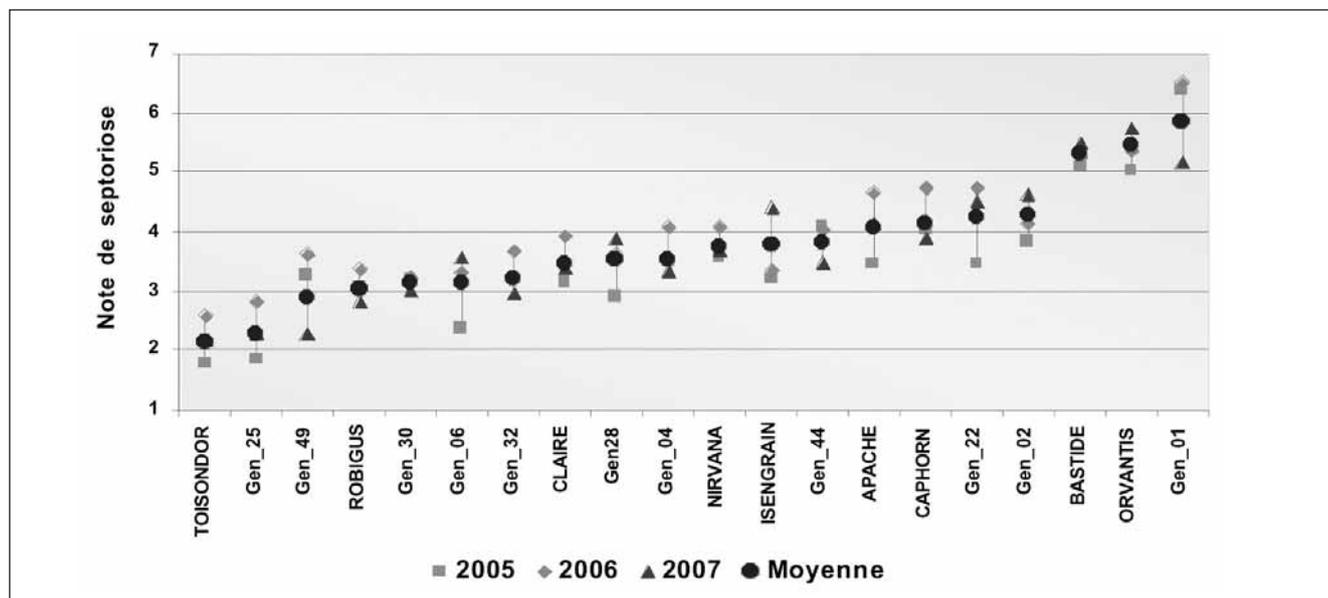


Figure 3 : Synthèse des notations sur la résistance de génotypes face à la septoriose pour 2005, 2006 et 2007.

## Résultats

En 2007, les pertes de rendement enregistrées entre les plantes protégées avec des fongicides et les plantes non protégées ayant été inoculées par *M. graminicola* vont de 2 à 24 % selon les génotypes. La perte de rendement n'est pas directement liée à l'intensité de la septoriose, ni à l'intensité des autres maladies résiduelles. On peut constater un bon comportement de résistance pour Toisondor, Parador, Gen-17, Gen-25, Gen-35 ou Gen-48 (Figure 4).

Pour Gen-12 et Gen-4, si nous observons une même intensité de septoriose, on peut remarquer une baisse de rendement pour Gen-12 mais par contre un faible impact de la maladie pour Gen-4. La tolérance n'est donc pas liée à la résistance. Elle dépend du fonctionnement général de la culture sous l'effet de l'interaction du milieu et de la maladie. Il existe chez le blé des génotypes tolérants qui constituent des sources intéressantes pour la sélection. L'étude approfondie de 3 génotypes montre que la redistribution d'azote dans la plante est fortement corrélée à la tolérance. L'identification des différents mécanismes de tolérance nécessitera des travaux complémentaires.

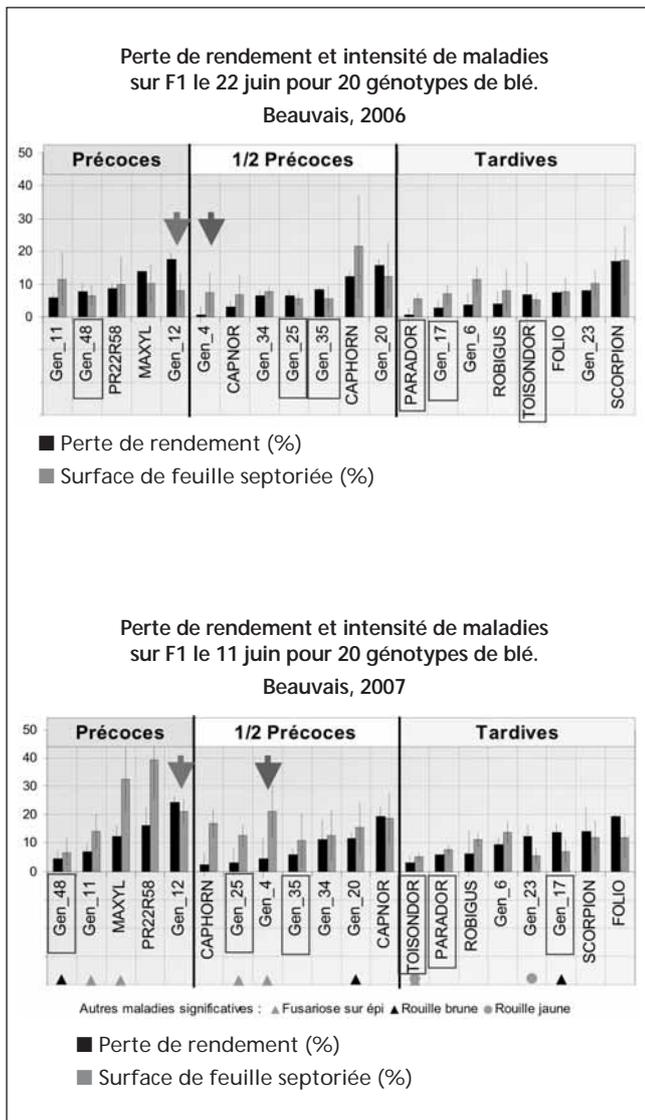


Figure 4 : Perte de rendement et intensité de maladies sur F1 pour 20 génotypes de blé (2006 et 2007).

## 4. Étude des mécanismes impliqués dans la résistance

Pour cette étude, des cultivars de blé à niveaux de résistance différents sont comparés. Pour évaluer les mécanismes d'interaction plante/hôte, nous nous sommes intéressés à la vague oxydative consécutive à l'attaque d'une plante par un pathogène. Parmi les formes activées de l'oxygène produites, le peroxyde d'hydrogène est connu pour son effet antifongique direct, mais aussi pour son implication dans les mécanismes de renforcement de la paroi des cellules végétales et pour son rôle de messenger dans les processus débouchant sur l'expression des gènes de défense chez la plante. Ainsi pour évaluer la réaction de la plante vis-à-vis de l'invasion du tissu cellulaire par le champignon, nous étudions des activités impliquées dans le processus de production ou de consommation du peroxyde d'hydrogène. Les activités Peroxydase (PO), Glutathion-S-Transférase (GST), la Lipoxygénase (LOX) ont été étudiées par des méthodes spectrophotométriques 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 et 21 jours post inoculation pour des cultivars inoculés par *M. graminicola* et des plantes témoins. La relation entre les différentes activités peut être schématisée comme dans la figure 5.

Ces activités seront corrélées à la capacité du champignon de pénétrer, d'envahir et de nécroser les tissus, capacité mesurée par des observations microscopiques après coloration du matériel fongique au lacto-glycérol bleu Trypan. Nous avons déterminé 49 critères d'observations microscopiques liés au mode de pénétration du champignon et à son développement. Les résultats sont actuellement en cours d'analyses.

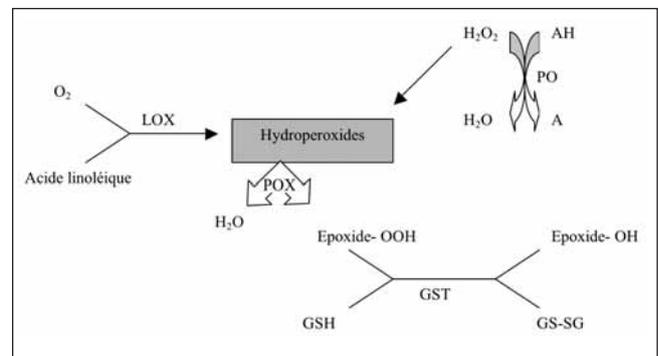


Figure 5 : Relations entre les différentes activités étudiées.

## 5. Conclusion

Le projet FSOV (2004-2007) intitulé "Étude des populations françaises de septorioses et recherche de sources de résistance chez le blé" a consisté dans un premier temps à mieux connaître la structure des populations de septorioses en France qui jusque là n'avait pas été étudiée. Ceci a été réalisé par une étude terrain à l'échelle nationale et la constitution d'une collection de souches isolées à partir des réseaux d'expérimentation d'ARVALIS-Institut du végétal et des sélectionneurs du CETAC. Ce travail de terrain a permis de confirmer l'importance de la fréquence de *S. tritici*. La collection qui compte environ 500 souches a été l'objet d'une caractérisation. Celle-ci s'est faite à plusieurs niveaux sur une partie, voire la totalité des souches isolées : identification des *mating types* (espèce hétérothallique), types génétiques et pouvoir pathogène.

La distribution et la répartition des *mating types* à différentes échelles mettent en évidence le potentiel élevé de recombinaison sexuée chez cette espèce en France. En effet, nous avons pu constater que les deux *mating types* sont non seulement présents et représentés équitablement au niveau d'une même localité, à l'échelle de la parcelle mais également à l'échelle de la feuille de blé.

Suite à l'étude des microsatellites et des séquences codant pour l'actine et la  $\beta$ -tubuline, les dendrogrammes basés sur la distance de Nei, la répartition des souches par CAH, les valeurs des indices de Nei, de la fraction clonale, du déséquilibre gamétique, du  $G_{ST}$ , du  $N_m$  ont permis d'une part de confirmer l'impact de la phase sexuée dans la structuration génétique de la population et d'autre part la mise en évidence de groupes génétiques au sein de la population de *S. tritici*.

Afin de compléter cette caractérisation, des tests de pathogénicité ont également été réalisés comparativement à des souches de référence utilisées par d'autres équipes. Ces tests (importance des symptômes, de la sporulation, des CWDE...) ont été effectués avec les souches représentatives des principaux groupes génétiques identifiés précédemment. Les critères basés sur l'importance des symptômes et sur la sporulation mettent en évidence une grande diversité du pouvoir pathogène au sein de la population du parasite.

Ces tests ont été complétés par l'étude d'activités enzymatiques impliquées dans la dégradation des parois cellulaires du blé (CWDE). Les résultats obtenus en conditions *in vivo* ont confirmé le rôle prépondérant de la xylanase.

Un autre volet du projet a consisté à mettre en évidence au champ des génotypes de blé résistants à la septoriose. Ceci a été réalisé durant les 3 années dans le cadre d'essais multi-locaux sur une centaine de lignées au départ puis poursuivi avec les génotypes ayant exprimé des résistances de bon niveau. La recherche de tolérance a également été réalisée sur une vingtaine de génotypes. Il existe parmi eux des génotypes très tolérants, qui bien que moyennement sensibles à la septoriose, ont un rendement grain peu affecté par la maladie. Enfin, parmi les génotypes de blé ayant présenté des résistances, une étude a été initiée afin de mettre en évidence les mécanismes impliqués. Cette étude comporte différentes approches : cytologique et physiologique (péroxydase, lipoxigénase et glutathion-S-transférase). En s'appuyant sur les résultats acquis lors de ce projet, celui-ci pourrait être poursuivi afin d'approfondir la connaissance de la population de *S. tritici* et d'en faire un suivi dans le temps, de réaliser une caractérisation phénotypique de la résistance chez le blé et de rechercher des marqueurs moléculaires utilisables en sélection.

## Références bibliographiques

- Banke, S., Peschon, A., McDonald, B.A. (2004).** Phylogenetic analysis of globally distributed *Mycosphaerella graminicola* based on three DNA sequence loci. *Fungal Genet. Biol.* 41: 226-238.
- Bassam, B.J., Gaetano-Anolles, G., Gresshoff, P.M. (1991).** Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry.* 196: 80-83.
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-54.
- Douaiher, M.N., Nowak, E., Durand, R., Reignault, Ph., Halama, P. (2007a).** Correlative analysis of *Mycosphaerella graminicola* pathogenicity and cell wall degrading enzymes produced in vitro: the importance of xylanases and polygalacturonases. *Plant Pathology.* 56: 79-86.
- Douaiher, M.N., Nowak, E., Dumortier, V., Durand, R., Reignault, Ph., Halama P. (2007b)** *Mycosphaerella graminicola* produces *in vitro* a range of cell wall-degrading enzyme activities that vary with the carbon source. *European Journal of Plant Pathology.* 117: 71-79
- Jürgens, T., Linde, C.C., McDonald, B.A. (2006).** Genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* populations from Iran, Argentina and Australia. *Eur. J. Plant Pathol.* 115: 223-233.
- Magro, P. (1984).** Production of polysaccharide-degrading enzymes by *Septoria nodorum* in culture and during pathogenesis. *Plant Science Letters* 37: 63-8.
- Miller, G.L. (1959).** Use of the dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428
- Nei, M. (1978).** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Owen, P.G., Pei, M., Karp, A., Royle, D.J., and Edwards, K.J. (1998).** Isolation and characterization of microsatellite loci in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mol. Ecol.* 7: 1611-1612.
- Parker, S.R., Welham, S.J., Paveley, N.D., Foulkes, J., Scott, R.K. (2004).** Tolerance of septoria leaf blotch in winter wheat. *Plant Pathology* 53 : 1-10.
- Razavi, M., and Hughes, G.R. (2004a).** Microsatellite markers provide evidence for sexual reproduction of *Mycosphaerella graminicola* in Saskatchewan. *Genome* 47: 789-794.
- Zuckerman, E., A. Eshel, and Z. Eyal, (1997).** Physiological aspects related to tolerance of spring wheat cultivars to *Septoria tritici* blotch. *Phytopathology*, 87: 60-65.

# Actions pour mieux exploiter et accroître la résistance du blé au piétin-verse et à la jaunisse nanisante de l'orge

Joseph JAHIER<sup>1</sup>, Hélène MURANTY<sup>1</sup>, Maxime TROTTET<sup>1</sup>, Philippe LONNET<sup>2</sup>, Éric MARGALÉ<sup>2</sup>, Jayne STRAGLIATTI<sup>2</sup>, Patrice SÉNELLART<sup>2</sup>, Jean-Baptiste REGNARD<sup>2</sup>, Axel OLIVIER<sup>\*2</sup>,

\* Coordinateur : Axel OLIVIER, aolivier@invivo-group.com, Tél. : 01 40 66 20 78

1 - INRA UMR 118, APBV - BP 35327, 35653 Le Rheu

2 - GIE Club 5 - 83 avenue de la Grande Armée, 75782 Paris Cedex 16

## 1. Identification et marquage de facteurs génétiques de résistance au piétin-verse chez le blé

### ► Introduction

Le piétin-verse, dont l'agent est le champignon *Oculimacula yallundae* syn. *Pseudocercospora herpotrichoides*, est une maladie du blé d'hiver très répandue dans le nord-ouest de l'Europe et dans la région du 'Pacific Northwest' aux USA. Il peut causer la verse et des pertes de rendement significatives. L'incorporation de gènes de résistance constitue un important objectif en création variétale.

Deux sources de résistance sont disponibles chez le blé tendre. La première a été rapportée chez la variété française Cappelle inscrite dans les années 50. Les travaux de Law et al (1975) puis de Muranty et al (2002) ont montré que la résistance de Cappelle est due au gène *Pch2*, localisé sur le chromosome 7A et efficace seulement au stade jeune plante et à des QTL de résistance présents sur les chromosomes 1A, 2B, 5A et 7A.

La seconde résistance a un niveau plus élevé que chez Cappelle. Elle est due au gène *Pch1* introduit sur le chromosome 7D à partir de l'espèce apparentée *Aegilops ventricosa* (2n=28, DDN<sup>v</sup>N<sup>v</sup>). *Pch1* a été très utilisé en sélection en Europe et aux USA. Cependant le niveau de résistance conférée par *Pch1* s'est avéré insuffisant dans certains fonds génétiques. En effet, des variétés portant *Pch1* subissent des pertes de rendement significatives en cas de fortes attaques. C'est pourquoi les sélectionneurs souhaitent adjoindre à *Pch1* d'autres facteurs de résistance.

Une première stratégie consiste à cumuler *Pch1* avec tout ou partie du système polygénique de Cappelle. L'expérience montre que cet objectif est difficile à atteindre en raison de la lourdeur des tests et du caractère quantitatif de la résistance. Cependant, cet objectif semble avoir été réalisé avec la variété Rendez-Vous dans les années 80, ainsi qu'avec la variété Balthazar qui en est issue.

La recherche de QTL de résistance au piétin-verse a été entreprise à l'aide de 3 familles de lignées recombinantes obtenues selon un plan diallele à 3 parents (1 très résistant, 1 moyennement résistant, 1 sensible).

Ce travail repose sur des tests d'évaluation de la résistance, en particulier au stade adulte au champ, et la cartographie génétique complète ou partielle du matériel.

### ► Matériel et méthodes

#### Matériel

Trois familles de lignées recombinantes, issues du croisement selon un plan demi-diallele des variétés Balthazar, Shango et Ritmo, ont été utilisées.

#### Évaluations de la résistance

La résistance au piétin-verse a été évaluée au stade adulte au champ. L'implantation du matériel a été réalisée en rangs de 150 cm semés avec 90 grains en octobre. Deux rangs de matériel à étudier étaient séparés par un rang de la variété très sensible Moisson. L'inoculation était réalisée en novembre ou décembre à l'aide de grains d'avoine stérilisés puis contaminés par le champignon. Onze tests ont permis d'évaluer l'ensemble du matériel : 3 à Rennes, en 2004, 2005 et 2006, comportant 285 à 360 lignées par test selon les années, et 8 dans 4 sites des partenaires du GIE Club 5, en 2005 et 2006, comportant 96 lignées par test. Dans chaque test, les lignées recombinantes étaient présentes dans un ou deux blocs, alors que les témoins (VPM, Cappelle, Moisson, Balthazar, Shango et Ritmo) étaient présents dans tous les blocs (12 blocs à Rennes, 3 blocs dans chaque site des partenaires du GIE Club 5). En 2005 et 2006, quelques lignées recombinantes ont été évaluées dans deux ou trois sites pour servir de génotypes "ponts".

La notation du matériel a été effectuée au moment de la floraison. 30 à 50 tiges collectées dans le mètre central de chaque rang étaient notées pour la part de section de tige attaquée par le champignon ce qui permettait de calculer un pourcentage moyen de section de tige attaquée pour chaque génotype.

#### Génotypage

Le polymorphisme des variétés parentales Balthazar, Shango et Ritmo a été testé pour 314 marqueurs microsatellites générant au moins un locus sur les chromosomes 1A, 2B, 5A, 7A et 7D.

Les lignées recombinantes ont été génotypées à l'aide de marqueurs SSR. Les produits d'amplification par PCR des marqueurs ont été visualisés par coloration au nitrate d'argent après migration sur gel de polyacrylamide, ou à l'aide d'un analyseur de fragments d'ADN Licor ou d'un séquenceur capillaire 3130xl. 133 couples d'amorces ont été utilisés pour le génotypage des lignées recombinantes, ce qui a produit 179 loci (80 dans la population Ritmo x Balthazar, 117 dans la population Shango x Balthazar, et 114 dans la population Shango x Ritmo).

#### Analyse des données

Les analyses de variance des données phénotypiques et le calcul des moyennes ajustées utilisées pour la recherche de QTL ont été réalisées à l'aide du logiciel R. Les cartes

génétiques des trois familles de lignées recombinantes ont été construites à l'aide du logiciel mapmaker et une carte consensus a été obtenue à l'aide du logiciel Carthagene. La recherche de QTL a été réalisée par "composite interval mapping" (CIM) dans chaque population à l'aide du logiciel QTL CARTOGRAPHER.

## ► Résultats

### Variation phénotypique

Les évaluations réalisées ont généré des résultats fiables : en analyse de variance, les effets lignées sont très significatifs (analyse avec les témoins), ainsi que les effets famille et lignées intra-famille (analyse sans les témoins après ajustement des effets blocs). Cependant, la précision des essais est assez variable, avec des coefficients moyens de variation (CMV = écart-type résiduel / moyenne) compris entre 0.118 et 0.350. Par ailleurs, on observe une interaction génotype x site significative, qui se traduit par des inversions de classement des génotypes Cappelle, Shango et Ritmo (moyennement sensibles ou moyennement résistants) et par des corrélations nulle, faiblement positive ou faiblement négative des moyennes ajustées des lignées recombinantes de la famille Shango x Ritmo entre les 3 années d'évaluation à Rennes.

### Cartes génétiques

Les données de génotypage ont permis d'obtenir des cartes partielles des chromosomes visés (1A, 2B, 5A, 7A, 7D) pour chacun des trois familles de lignées recombinantes. Ces cartes sont très fragmentées (14 à 21 groupes de liaison, 9 à 19 marqueurs non liés) et partielles (498 à 791 cM pour 5 chromosomes, taux de couverture estimé de 64 à 95 % selon les chromosomes). La carte consensus pour les trois familles comporte 28 groupes de liaison parmi lesquels seulement 8 contiennent 2 locus communs ou plus pour chaque paire possible de populations, alors que 6 contiennent les locus des trois populations, mais seulement 1 pour une population, 11 contiennent des locus de seulement deux populations et 3 contiennent des locus d'une seule population. 16 marqueurs sont non liés.

### Détection de QTL

La recherche de QTL par CIM dans chaque famille en analyse multicaractère prenant en compte les 3 essais de Rennes a permis d'identifier 14 régions portant des QTL, réparties sur les 5 chromosomes visés, montrant un LR (Likelihood Ratio) supérieur au seuil de 11.4 (Tabl.1) (seuil par défaut du logiciel utilisé, QTL Cartographer). L'effet de ces régions dans chaque essai a ensuite été analysé. Le locus *Pch1*, qui ségrège dans les familles Shango x Balthazar et Ritmo x Balthazar, est identifié sur le groupe de liaison 7D2 dans tous les essais et dans ces deux familles. Il explique 25 à 84 % de la variation selon l'essai. Des QTL moins stables et/ou d'effet moins important ont été détectés sur les autres chromosomes. En effet, seules cinq des régions identifiées en multicaractère présentent des effets significatifs quand on analyse chaque essai séparément.

## ► Discussion et perspectives

Les travaux de Chapman et al (2008) ont identifié quelques marqueurs microsatellites liés à *Pch1* et *Pch2*. Nous avons cartographié une partie des marqueurs microsatellites liés à *Pch1* mis en évidence par ces travaux dans les familles Shango x Balthazar et Ritmo x Balthazar : ces marqueurs sont liés au QTL détecté dans tous les essais. Nous avons également cartographié deux des marqueurs microsatellites liés à *Pch2* dans les mêmes familles : aucun QTL n'a été détecté à proximité de ces marqueurs. Il semble donc que soit *Pch2* ne ségrège pas dans ces familles, soit son effet n'est pas détectable dans les évaluations au stade adulte que nous avons réalisées. Une comparaison des allèles des variétés parentales Balthazar, Shango et Ritmo avec ceux de Cappelle pour ces marqueurs pourrait permettre de trancher entre ces deux hypothèses.

Une analyse conjointe de toutes les familles et de toutes les données phénotypiques obtenues sur les 3 années et dans 5 sites sera réalisée afin d'exploiter pleinement la puissance du dispositif utilisé pour l'identification de QTL. Ensuite, les régions chromosomiques porteuses de QTL de résistance au piétin-verse identifiées pourront être enrichies en marqueurs, en premier lieu par l'analyse de nouvelles sources de marqueurs microsatellites.

| Chromosome | Famille | Groupe de liaison | Marqueur en amont | LR au pic         | Parent portant l'allèle favorable | Part de variance expliquée au pic ± 10 cM |
|------------|---------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------------|---|
|            |         |                   |                   | en multicaractère |                                   |   |
| 1A         | SxB     | 1A1               | gwm136            | 12.7              | Shango                            | NS <sup>1</sup>                           |
|            | SxB     | 1A1               | cf15              | 23.4              | Balthazar                         | 12.1 % <sup>2</sup>                       |
|            | SxR     | 1A1               | barc158           | 13.5              | Ritmo                             | 21.4 % <sup>3</sup>                       |
| 2B         | SxB     | 2B1               | gwm614            | 17.9              | Shango                            | NS <sup>1</sup>                           |
|            | SxR     | 2B1               | gwm614            | 14.5              | Shango                            | 13.6 % <sup>4</sup>                       |
|            | SxR     | 2A-2B             | wmc025ba          | 18.5              | Shango                            | NS <sup>1</sup>                           |
|            | RxB     | 2B3               | gwm257            | 15.0              | Ritmo                             | NS <sup>1</sup>                           |
| 5A         | SxB     | 5A1               | barc100           | 15.0              | Shango                            | 7.6 % <sup>4</sup>                        |
|            | SxB     | 5A1               | barc180d          | 20.8              | Shango                            | NS <sup>1</sup>                           |
|            | SxR     | 5A2               | gwm497b           | 11.4              | Shango                            | NS <sup>1</sup>                           |
|            | RxB     | 5A1               | barc186           |                   | Balthazar                         | NS <sup>1</sup>                           |
| 7A         | SxB     | 7A1-7A2           | gpw2233           | 15.2              | Balthazar                         | 13 % <sup>2</sup>                         |
|            | SxB     | 7A1-7A2           | wmc083            | 11.8              | Shango                            | NS <sup>1</sup>                           |
|            | SxR     | 7A1               | gwm233            | 14.4              | Ritmo                             | NS <sup>1</sup>                           |
| 7D         | RxB     | 7D1               | gwm111            | 16.7              | Ritmo                             | NS <sup>1</sup>                           |
|            | SxB     | 5A3-7D            | cf15              | 53.3              | Balthazar                         | 32.8 à 74.2 %                             |
|            | RxB     | 7D2               | barc76            |                   | Balthazar                         | 8.6 à 83.7 %                              |

1 : pas d'effet significatif dans les essais analysés individuellement  
 2 : effet significatif dans un seul essai, Desprez 2006  
 3 : effet significatif dans un seul essai, Rennes 2005  
 4 : effet significatif dans un seul essai, Nickerson 2006  
 Les accolades dans la colonne marqueur regroupant chacune deux lignes indiquent que la région détectée dans les deux familles est la même, même si le marqueur en amont n'est pas le même.

Tableau 1 : Régions portant des QTL de résistance au piétin-verse au stade adulte détectées en analyse multicaractère avec les 3 essais de Rennes.

## 2. Accroissement du nombre de copies de *Pch1* dans le blé tendre

### ► Introduction

[voir Action 1]. Nous envisageons une deuxième stratégie qui consiste à accroître le niveau de résistance du blé en augmentant le nombre de copies de *Pch1* dans son génome. Cet objectif s'est appuyé sur l'observation suivante : une plante homozygote pour le gène *Pch1* est plus résistante qu'une plante hétérozygote. Le travail comporte deux phases :

- effectuer l'introgression de *Pch1* dans le blé dur, au niveau des chromosomes du groupe d'homéologie 7 (7A et/ou 7B),
- croiser les blés durs résistants avec le blé tendre résistant (7D) afin de créer des lignées de blé tendre possédant *Pch1* sur deux voire trois paires de chromosomes du groupe 7.

Par recombinaison homéologue, le gène *Pch1* porté par le 7D<sup>v</sup> d'*Ae. ventricosa* accession 11 a été introduit sur le chromosome 7A du blé dur (Huguet-Robert et al, 2001). Le gène *Pch1* introduit sur le 7D du blé tendre est marqué par l'endopeptidase *Ep-D1b* (origine *Ae. ventricosa* n°10). L'allèle correspondant dans l'accession n°11 est *Ep-D1c* (allèle nul). De plus, étant donné que les niveaux de résistance des accessions d'*Ae. ventricosa* sont différents, on admet que les 2 gènes ont des formes alléliques différentes.

Nous présentons ici le développement de lignées de blé tendre possédant le gène *Pch1* à la fois sur le chromosome 7A et sur le chromosome 7D et l'évaluation de leur niveau de résistance au piétin-verse. Par souci de clarté le gène *Pch1* sur le 7D sera désigné *Pch1<sub>vent10</sub>* et celui sur le 7A *Pch1<sub>vent11</sub>*.

### ► Matériel et méthodes

#### Matériel

La variété de blé tendre cv. *Virtuose* qui possède *Pch1<sub>vent10</sub>* sur le chromosome 7D a été croisée par la lignée n°300 de blé dur portant *Pch1<sub>vent11</sub>* sur le 7A pour créer des blés tendres possédant *Pch1* sur les chromosomes 7A et 7D.

#### Analyses cytologiques

Les dénombrements chromosomiques à partir de méristèmes radiculaires et l'observation des comportements méiotiques ont été faits selon les protocoles standards.

#### Utilisation des marqueurs Endopeptidase

Les allèles du gène *EpD1* ont été détectés par la méthode d'isoélectrofocalisation de Mena et al (1993).

#### Résistance au champ

L'implantation, l'inoculation et la notation du matériel ont été décrits dans l'action 1.1.

### ► Résultats

#### Extraction de lignées possédant *Pch1* sur le 7A et 7D

L'hybride pentaploïde (2n=35, AABBDD) '*Virtuose* × 300' a été autofécondé. Dans la descendance F2 de 90 plantes, aucune plante n'avait ni 41 ni 42 chromosomes. 15 plantes ayant entre 37 et 40 chromosomes ont été autofécondées. En F3, 60 demi-grains avec embryons ont été dénombrés. Le test endopeptidase à partir des demi-grains sans embryon a révélé 26 plantes a priori homozygotes EpD1b

(7D) et EpD1c (7A). 5 plantes sur 26 ont été éliminées en raison de leur faible vigueur ou stérilité. Des anthères au stade métaphase I de la méiose ont été prélevées sur ces plantes. L'analyse méiotique a montré une fréquence variable de multivalents. Dans un premier temps, on les a imputés à une différence de structure chromosomique entre le blé dur résistant et '*Virtuose*' et non pas à la duplication de *Pch1* dans le génome. Nous avons en définitive retenu 5 plantes à 2n=42.

90 plantes de la descendance F4 de ces 5 plantes ont été semées. 29 se sont avérées euploïdes. 20 d'entre elles ont produit assez de semences pour que leur résistance puisse être évaluée.

#### Évaluation de la résistance

##### Au stade jeune plante

Les lignées 300 x *Virtuose* sont apparues au moins aussi résistantes que *Virtuose*. Mais la qualité du test n'a pas permis de conclure à des niveaux de résistance supérieur à celui de *Virtuose*.

##### Au stade adulte au champ

L'attaque sur les témoins est celle attendue. Les cultivars *Oratorio* et *Virtuose* qui possèdent *Pch1<sub>vent10</sub>* sont moins attaqués que *Cappelle* qui à son tour est significativement moins attaqué que le témoin sensible cv. *Soissons* (Tabl. 2). Les lignées 300 × V présentent des comportements différents. Certaines sont aussi sensibles que *Soissons* alors que d'autres sont du niveau d'*Oratorio* et *Virtuose*. Il est apparu manifeste que le contenu en gènes ou allèles de *Pch1* n'est pas le même dans les différentes lignées. Suite à l'observation de multivalents dans les cellules mères du pollen des plantes F3 '300 × V', nous avons émis l'hypothèse que les chromosomes 7A et 7D de ces lignées peuvent se recombiner.

|              | Pourcentage moyen de section de tige attaquée | Comparaison des moyennes par le test Newman-Keuls (seuil 5 %) |   |   |   |
|--------------|---|---|---|---|---|
| Soissons     | 97.84   | A   |   |   |   |
| 300 x V - 29 | 85.31   | A   | B |   |   |
| 300 x V - 69 | 84.88   | A   | B |   |   |
| 300 x V - 63 | 83.81   | A   | B |   |   |
| 300 x V - 4  | 82.56   | A   | B |   |   |
| 300 x V - 68 | 82.56   | A   | B |   |   |
| 300 x V - 3  | 81.69   | A   | B |   |   |
| 300 x V - 10 | 78.19   | A   | B | C |   |
| 300 x V - 1  | 77.25   | A   | B | C |   |
| 300 x V - 8  | 75.25   |   | B | C |   |
| 300 x V - 9  | 74.06   |   | B | C |   |
| 300 x V - 66 | 74.06   |   | B | C |   |
| 300 x V - 67 | 73.94   |   | B | C |   |
| 300 x V - 6  | 69.26   |   | B | C |   |
| Cappelle     | 68.06   |   | B | C |   |
| 300 x V - 70 | 67.88   |   | B | C |   |
| 300 x V - 5  | 65.76   |   | B | C |   |
| 300 x V - 2  | 57.72   |   |   | C |   |
| 300 x V - 61 | 44.44   |   |   |   | D |
| 300 x V - 26 | 40.75   |   |   |   | D |
| Oratorio     | 37.13   |   |   |   | D |
| 300 x V - 11 | 32.00   |   |   |   | D |
| 300 x V - 19 | 29.31   |   |   |   | D |
| Virtuose     | 28.31   |   |   |   | D |

Tableau 2 : Évaluation de la résistance au champ des lignées 300 × V

### Mise en évidence de recombinaisons 7A-7D

Nous avons analysé la méiose de l'hybride pentaploïde entre la variété de blé tendre Courtot et la lignée 300. Le fonds génétique de cette dernière est celui de Creso. Nous avons démontré (non publié) que Creso et Courtot ne présentent pas de différence de structure chromosomique.

Creso présente en métaphase I de méiose 14 bivalents et 7 univalents dans la majorité des cellules mères du pollen (CMP). Chez l'hybride Courtot × 300, on observe un trivalent dans 80 % des CMP. A l'aide de la technique d'hybridation in situ GISH (Figure 1), on a pu montrer que ce trivalent est constitué de deux chromosomes du génome A et d'un chromosome du génome D. Il est donc vraisemblable que ce trivalent est de type 7Ac-7A300-7Dc (7Ac et 7Dc sont de Courtot et 7A300 de 300). Le chromosome 7Dc s'apparie avec 7A300 au niveau de la partie distale de leur bras long.

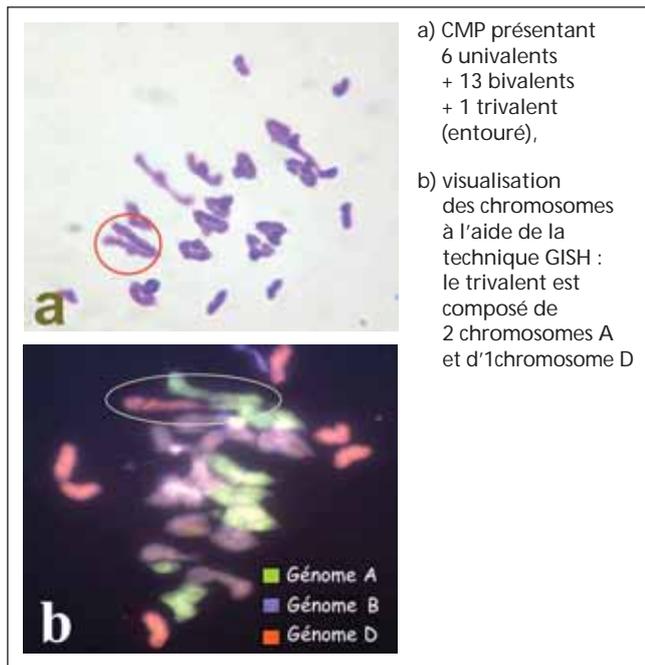


Figure 1 : Appariement méiotique chez l'hybride pentaploïde ( $2n=35$ , AABBDD) entre le blé tendre Courtot et la lignée de blé dur 300.

### ► Discussion – Perspectives

L'introgression *Pch1<sub>vent11</sub>* est très courte et située en position distale du bras long 7AL. Elle contient de la chromatine initialement présente sur la région homéologue du 7D d'*Ae. ventricosa*. Elle présente donc un niveau élevé d'homologie avec la région correspondante sur le chromosome 7D du blé. Bien que cette introgression soit très courte, le chromosome 7A introgressé s'apparie avec une fréquence élevée (80 %) avec le 7D dans l'hybride pentaploïde entre le blé résistant et le blé tendre. La conséquence est que des recombinaisons se produisent et que *Pch1<sub>vent11</sub>* passe sur le chromosome 7D. Dans l'hybride 300 × V, le 7D porte *Pch1<sub>vent10</sub>* et 7A *Pch1<sub>vent11</sub>*. Les événements de recombinaison de type 7A-7D peuvent aboutir à 5 situations quant au contenu en gène *Pch1* dans les lignées de blé tendre sélectionnées :

- α 0 copies *Pch1<sub>vent11</sub>* + 4 copies *Pch1<sub>vent10</sub>*
- β 1 copies *Pch1<sub>vent11</sub>* + 3 copies *Pch1<sub>vent10</sub>*
- δ 2 copies *Pch1<sub>vent11</sub>* + 2 copies *Pch1<sub>vent10</sub>*
- Φ 3 copies *Pch1<sub>vent11</sub>* + 1 copies *Pch1<sub>vent10</sub>*
- γ 4 copies *Pch1<sub>vent11</sub>* + 0 copies *Pch1<sub>vent10</sub>*

Les marqueurs endopeptidase EpD1c (null) et EpD1b auraient dû nous permettre de sélectionner des blés tendres portant *Pch1<sub>vent11</sub>* sur le 7A et *Pch1<sub>vent10</sub>* sur le 7D en l'absence d'appariement 7A-7D. En fait, nous avons sélectionné les 4 premières situations ci-dessus. De plus, il est important de souligner que tant que les deux gènes sont présents dans une lignée, cette lignée évolue. Si le passage d'une génération à la suivante passe par quelques plantes, on a une dérive génétique qui aboutit à des lignées fixées possédant 4 copies de l'un des deux gènes *Pch1*.

On a observé que les lignées 300 × V présentent des niveaux de résistance variable vis-à-vis du piétin-verse. Dans l'état actuel de nos connaissances, il est impossible de savoir ou prédire les niveaux de résistance correspondant aux contenus géniques α à Φ ci-dessus. Pour apporter un début de réponse, nous multiplions chaque année sous forme SSD les lignées 300 × V. Nous allons aboutir à un ensemble de lignées possédant 4 copies de *Pch1<sub>vent11</sub>* ou de *Pch1<sub>vent10</sub>* que nous évaluerons. Nous formulons les hypothèses que *i*) l'expression des gènes de résistance est réduite lorsque la combinaison génique n'est pas 2-2 et que *ii*) aucune de nos lignées n'était fixée de type 2-2. Mais si à l'avenir on était en mesure de la créer, cette lignée pourrait avoir un niveau de résistance supérieur aux génotypes actuels de blé tendre ou blé dur possédant 2 copies de *Pch1<sub>vent11</sub>* et de *Pch1<sub>vent10</sub>*.

Nous projetons de réduire l'introgression *Pch1* sur le chromosome 7A à l'aide de la mutation *ph1b* promotrice d'appariement homéologue. Lorsque sa taille sera suffisamment réduite pour éviter des appariements de type 7A-7D, on sera en mesure de créer et d'évaluer des blés tendres avec un dosage accru du nombre de copies du gène *Pch1*.

## 3. Élargissement de la variabilité pour la résistance à la jaunisse nanisante de l'orge

### ► Introduction

La jaunisse nanisante de l'orge est une maladie induite par des virus du groupe des lutéovirus, plus de 7 espèces ont été décrites, avec une variabilité intra-espèce. L'espèce *BYDV-PAV* est la plus fréquente en France. Ces virus ont été trouvés sur une centaine d'espèces de poacées, et sont transmis selon un mode persistant par des pucerons. Plus de 20 espèces de pucerons sont vectrices du virus dont les plus importantes en France sont : *Rhopalosiphum padi*, *Sitobion avenae* et *Metopolophium dirrhodum*.

On n'a pas trouvé de source de résistance au VJNO chez le blé tendre. Seulement un gène de tolérance (*Bdv1*) a été décrit chez la variété Frontana et localisé sur le bras court du chromosome 7D (Singh 1993). D'autres sources de tolérance ont été décrites (Burnett et al 1995).

Les sources de résistance semblent fréquentes chez les triticées pérennes (*Thinopyrum*, *Elymus*, ...). Essentiellement quatre croisements interspécifiques ont eu un début d'exploitation en sélection : 1) TC14 développé en Australie, est une translocation du chromosome 7D/7Ag dérivée de *Thinopyrum intermedium* (Banks et al, 1995) ; 2) la lignée d'addition chinoise (Zhong) du chromosome 2Ag dérivée de *Th. intermedium* (Larkin et al, 1995) ;

3) P29 est une lignée de substitution dérivée du chromosome 7D/7Ag<sup>i</sup> dérivée de *Th. intermedium* (Anderson et al, 1998) ; 4) OK7211542 est un amphiploïde partiel *Triticum aestivum/Th. ponticum* (Comeau et al, 1994). Les trois premiers induisent une résistance partielle à la multiplication du virus et dans certains cas un échappement à l'infection d'une certaine proportion des plantes. OK7211542 est décrit comme immun. Actuellement, TC14 est le plus utilisé en sélection. A ce jour, le gène *Bdv2* de TC14 est présent dans deux variétés australiennes, mais dans aucune variété européenne.

Nos objectifs étaient :

- a - introduire dans le blé la résistance de l'amphiploïde partiel *Triticum aestivum/Th. ponticum* OK7211542 et la résistance portée par le chromosome 2Ag de *Th. intermedium*.
- b - évaluer la résistance d'une lignée construite avant le début du programme et cumulant la résistance du chromosome 2Ag et celle du chromosome transloqué 7D/7Ag de la lignée de TC14.

### ► Matériel et méthodes

La lignée d'addition ditélosomique pour le bras chromosomique 2AgL (qui porte la résistance du 2Ag) et l'amphiploïde OK7211542 à 2n=56 chromosomes ont été croisés puis rétrocroisés par Courtot ph, lignée de Courtot possédant la mutation *ph1* promotrice d'appariement homéologue. Les plantes BC1 les plus résistantes à JNO et homozygotes *ph1ph1* ont été croisées par Courtot. Dans la descendance des plantes résistantes et ayant un nombre de chromosomes proches de 42 ont été sélectionnées puis rétrocroisées par Courtot.

OK7211542 a été rétrocroisé deux fois par Courtot. Des plantes possédant l'addition monosomique pour un chromosome (2n=43) et aussi résistantes que OK7211542 ont été produites.

Un test Elisa pour évaluer la résistance à JNO a été mis en œuvre selon Barloy et al (2003). Des techniques de cytologie ont également été utilisées pour le dénombrement chromosomique et l'analyse du comportement méiotique.

### ► Résultats

#### *Évaluation de la lignée cumulant les résistances portées par les chromosomes 2Ag et 7Ag de Th. intermedium*

Nous avons produit une lignée désignée ZT à 2n=44 chromosomes possédant le chromosome transloqué 7D-7Ag présent dans TC14, et le chromosome 2Ag. La chromatine de *Th. intermedium* a pu être visualisée à l'aide de la technique GISH (Figure 2). Cette lignée a été inoculée par 5 souches PAV de JNO. Les tests ont confirmé les niveaux de résistance partielle dus à 2Ag et 7D/7Ag et montré un effet additif des deux résistances. La nouvelle lignée se caractérise par une proportion de plantes infectées moindre que chez ses parents et une concentration en virus très faible chez les plantes infectées. La principale perspective de ce travail est, lorsque la résistance de 2Ag aura été introduite dans un chromosome de blé, la construction de variétés de blé efficaces vis-à-vis de JNO.

Ce travail a été proposé pour publication à Plant Pathology. Les reviewers ont demandé d'apporter quelques améliorations au manuscrit. Nous allons resoumettre une nouvelle version en juillet 2008.

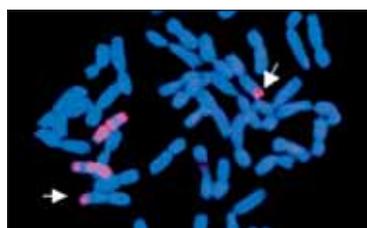


Figure 2 : Les chromosomes de la lignée ZT ont été visualisés à l'aide de la technique GISH. Les 2 chromosomes 2Ag sont en rouge et les 2 chromosomes transloqués 7D-7Ag sont indiqués par une flèche.

#### *Transfert de la résistance présente dans l'amphiploïde partiel T. aestivum/Th. ponticum*

**a :** extraction d'une lignée d'addition disomique  
 Dans la descendance du 3<sup>ème</sup> rétrocroisement de OK 7211542 par Courtot, une lignée d'addition disomique (2n=44) très stable a été sélectionnée. Elle est aussi résistante que OK 7211542, ce qui semble indiquer que la résistance de OK 7211542 est portée par un seul chromosome et qu'elle pourrait être monogénique. Cette information est importante, car pour le transfert, il est possible de travailler à partir d'une population relativement réduite.

**b :** transfert de la résistance dans le blé  
 La sélection s'est poursuivie pendant deux années dans les descendance OK 7211542 / 2\*Courtot ph / 2\*Courtot. Le matériel sélectionné est fertile et euploïde. Néanmoins nous avons été confronté au problème du faible niveau de sensibilité de Courtot qui a fait que les plantes hétérozygotes qui multiplient plus le virus que OK 7211542 ou l'addition disomique sont difficiles à sélectionner. Nous avons été conduits en deuxième année à rétrocroiser le matériel par Orvantis qui est plus sensible que Courtot. En troisième année, nous avons sélectionné des plantes dans le rétrocroisement qui à leur tour ont été rétrocroisées par Orvantis. Nous n'avons pas réussi, à l'aide de la technique d'hybridation in situ GISH, à démontrer la présence d'un transfert. Néanmoins ce résultat ne signifie pas qu'il n'y a pas de transfert car il a déjà été montré par plusieurs laboratoires que des introgressions de courte taille ne sont pas détectables.

#### *Transfert de la résistance portée par le chromosome 2Ag de Th. intermedium*

Nous avons suivi les mêmes étapes que dans le transfert ci-dessus. Le rétrocroisement par Orvantis s'est avéré indispensable, dans la mesure où la résistance conférée par 2Ag est partielle et à dominance partielle. En troisième année, nous avons sélectionné dans la descendance de 3 familles en rétrocroisement par Orvantis des plantes résistantes. Deux familles semblaient très intéressantes par la fréquence des plantes retenues.

Ces dernières ont été rétrocroisées par Orvantis prise comme femelle. Ainsi en 2007, on devrait être en mesure de sélectionner sur la résistance et sur la fréquence de transmission par le pollen. L'objectif est clairement de sélectionner des introgressions qui se transmettent bien à l'état hétérozygote.

### ► Conclusion

Actuellement les sélectionneurs ne disposent que du seul gène (*Bdv2*) de résistance partielle à JNO issu de *Th. intermedium*. Son utilisation pose des difficultés dans la mesure où elle induit un fort déficit de fertilité dans de nombreux fonds génétiques. Si l'on veut développer la lutte génétique vis-à-vis de JNO, il apparaît indispensable et urgent d'élargir la variabilité utilisable en sélection. Nous n'avons pas atteint l'objectif fixé concernant le transfert des deux résistances '2Ag et OK 7211542'. A l'issue des 3 années, nous avons sélectionné du matériel fertile, à 42 chromosomes et en ségrégation pour la résistance dans le fonds génétique sensible d'Orvantis. Le travail se poursuit dans le cadre d'un nouveau contrat FSOV.

## 4. Recombiner les deux introgressions chevauchantes portant les gènes *Pch1* et *Bdv2*

### ► Introduction

La sélection pour la sélection de l'état sanitaire du blé tendre a pour objectif l'introduction dans un même génotype d'un maximum de gènes de résistance aux différentes maladies.

Des obstacles au cumul des gènes peuvent survenir. L'un d'eux, dans le cas du blé, est dû au fait que certains gènes d'origine interspécifique sont portés par des introgressions chevauchantes d'origine interspécifique différente. En conditions normales, deux introgressions chevauchantes à l'état hémizygote dans un génotype ne peuvent se recombiner entre elles ou avec la partie chromosomique équivalente (région homéologue) du même chromosome de blé ne portant pas l'introgression. Néanmoins, les cytogénééticiens ont élaboré des stratégies pour favoriser les recombinaisons entre régions homéologues et par conséquent réduire la longueur des segments étrangers tout en conservant les gènes d'intérêt. La plupart reposent sur l'utilisation de la mutation *ph1* promotrice d'appariement homéologue à la méiose.

Nous nous proposons de cumuler, dans un même génotype, les gènes de résistance *Pch1* et *Bdv2* portés par des introgressions chevauchantes sur le bras long du chromosome 7DL du blé tendre (Figure 3). Le gène *Pch1* a été introduit dans le blé à partir de la triticée sauvage *Aegilops ventricosa*, il constitue le seul élément majeur de résistance au piétin-verse chez le blé. L'introgression est de très petite taille, moins de 5% du chromosome 7D. Le gène *Bdv2* de résistance partielle à la jaunisse nanisante de l'orge (JNO) est porté par un segment chromosomique introduit de *Thinopyrum intermedium* qui occupe 40% du bras 7DL en position distale.

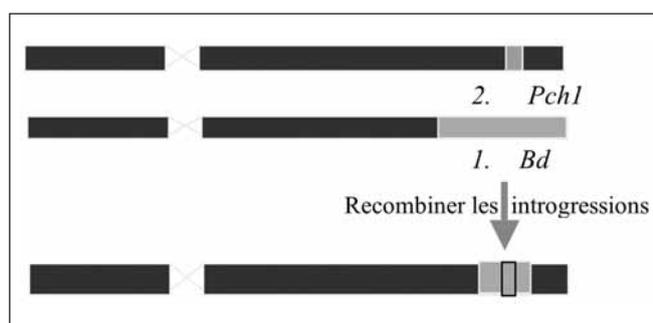


Figure 3 : représentation schématique des introgressions et de l'objectif du travail.

### ► Matériel

Avant le début de la mise en œuvre du projet, l'INRA a produit dans le fonds génétique de cv. Courtot un génotype possédant les deux introgressions à l'état hétérozygote et la mutation *ph1* à l'état homozygote. Ce matériel très stérile, en raison de la présence simultanée de *ph1* et de *Bdv2*, a été rétrocroisé deux fois par Soissons. Une sélection alternativement vis-à-vis du piétin-verse et de la JNO a abouti à un ensemble de lignées dont certaines pourraient avoir la recombinaison recherchée.

### ► Résultats

Nous nous sommes heurtés à de nombreuses difficultés :

- il est impossible d'évaluer simultanément sur de jeunes plantes la résistance au piétin et à la jaunisse,
- pour chacun des gènes de résistance, nous avons un marqueur moléculaire. Dans notre projet, ils sont d'aucune utilité, car dans les recombinaisons éventuelles entre les deux introgressions, ils peuvent être perdus,
- la résistance conférée par *Bdv2* est partielle. Dans les descendances en rétrocroisement hétérozygotes pour le gène, la détection de la présence de ce dernier n'est pas évidente,
- la variété Soissons utilisée en rétrocroisement est moins sensible que prévu.

En 2004, nous avons évalué simultanément la résistance de 35 lignées vis-à-vis des deux maladies. Elles sont toutes résistantes au piétin-verse. Aucune d'entre elles n'est significativement plus résistante à la JNO que Soissons. Les plantes avec les plus faibles D.O. ont été croisées par la variété très sensible cv. Sunstar qui constitue le fonds génétique de TC14, première lignée portant *Bdv2*. L'examen des F1 devrait permettre de conclure quant au cumul sur le chromosome 7D de *Pch1* et de *Bdv2*.

Nous avons aussi appliqué la technique GISH sur les plantes qui semblent les plus prometteuses. La chromatine de *Th. intermedium* n'a pu être détectée. Mais dans l'hypothèse d'une réduction du segment chromosomique porteur de *Bdv2*, il n'est pas exclu, étant donné certaines limites de la technique GISH qu'aucun signal n'ait été obtenu. Sur ces mêmes plantes prometteuses, le marqueur moléculaire de *Bdv2* n'est pas détecté.

A ce stade nous n'avions finalement aucun indice nous permettant de dire que le recombinant recherché était présent dans la population travaillée. Ceci nous a conduit à arrêter les travaux en 2005. Nous les avons repris en 2006 pour la raison suivante : même après 2 rétrocroisements par Soissons le matériel sélectionné en 2004 à l'aide du test de résistance à la JNO était très stérile indiquant la présence de chromatine d'*Agropyron intermedium*

En 2006, 16 descendances en rétrocroisement par Sunstar ont été évaluées. Aucune n'était homogène résistante à la JNO. Malgré le fait que le fonds génétique soit à 50% Sunstar, toutes les plantes sélectionnées ont présenté un très fort niveau de stérilité.

### ► Conclusion

Nous n'avons pas atteint notre objectif qui est de produire des lignées fertiles et fixées pour *Pch1* et *Bdv2*. En 2007, les descendants par Orvantis seront évalués. Nous espérons que nous aurons une réponse définitive. Cependant malgré une réponse positive, il est encore possible que la fertilité ne sera pas restaurée car nos travaux antérieurs ont montré que l'introgression *Bdv2* induit une réduction de la fertilité dans la majorité des fonds génétiques français. Ce n'est pas le cas avec le cultivar Rendezvous. Nous avons introduit l'introgression *Bdv2* dans cette variété et la lignée isogénique produite est fertile. Donc si la stérilité est toujours présente dans le rétrocroisement par Orvantis, nous procéderons à un rétrocroisement par Rendezvous<sub>Bdv2</sub> et la sélection portera uniquement sur la résistance au piétin-verse.

## Références bibliographiques

- Anderson, J. M., Bucholtz, D. L., Greene, A. E., Francki, M. G., Gray, S. M., Sharma, H., Ohm, H. W., Perry, K. L.** 1998. Characterization of wheatgrass-derived barley yellow dwarf virus resistance in a wheat alien chromosome substitution line. *Phytopathology* 88, 851-855.
- Banks, P. M., Larkin, P. J., Bariana, H. S., Lagudah, E., Appels, R., Waterhouse, P. M., Brettell, R. I. S., Chen, X., Xu, H. J., Xin, Z. Y., Qian, Y. T., Zhou, X. M., Cheng, Z. M., Zhou, G. H.** (1995). The use of cell culture for sub-chromosomal introgressions of BYD virus resistance from *Thinopyrum intermedium* to wheat. *Genome* 38, 395-405.
- Barloy D, Étienne C, Lemoine J, Saint-Ouen Y, Jahier J, Banks P M, Trottet M,** 2003. Comparison of TAF46 and Zhong 5 resistances to barley yellow dwarf virus from *Thinopyrum intermedium* in wheat. *Euphytica* 129, 361-369.
- Burnett, P. A., Comeau, A., Qualset, C. O.** 1995. Host plant tolerance or resistance for control of barley yellow dwarf. In "*Barley yellow dwarf, 40 years of progress*" (C. J. d'Arcy & P. A. Burnett, ed.), pp. 321-344. APS Press, St. Paul, Mn.
- Chapman, N.H., Burt, C., Dong, H., Nicholson, P.** (2008) The development of PCR-based markers for the selection of eyespot resistance genes *Pch1* and *Pch2*. *Theor. Appl. Genet.* DOI 10.1007/s00122-008-0786-3.
- Comeau, A., Makkouk, K. M., Ahmad, F., and Saint-Pierre, C. A.** 1994. Bread wheat x *Agroticum* crosses as a source of immunity and resistance to the PAV strain of barley yellow dwarf luteovirus. *Agronomie* 14, 153-160.
- Huguet-Robert V., Dedryver F., Röder M.S., Korzun V., Abélard P., Tanguy A.M., Jaudeau B., Jahier J.** 2001. Isolation of a chromosomally engineered durum wheat line carrying the *Aegilops ventricosa Pch1* gene for resistance to eyespot. *Genome* 44:345-349.
- Larkin, P. J., Banks, P. M., Lagudah, E. S., Appels, R., Chen, X., Xin, Z., Ohm, H. W., and McIntosh, R. A.** (1995). Disomic *Thinopyrum intermedium* addition lines in wheat with barley yellow dwarf virus resistance and with rust resistances. *Genome* 38, 385-394.
- Law, C. N., Scott P. R., Worland A. J., and Hollins T. W.** (1975) The inheritance of resistance to eyespot (*Cercospora herpotrichoides*) in wheat. *Genetical Research* 25, 73-79
- Mena M., Orellana J., Lopez-Brana I., Garcia-Olmedo F., Delibes A.** 1993. Characterization of wheat/*Aegilops ventricosa* introgression and addition lines with respect to the Mv genome. *Theor. Appl. Genet.* 86:197-204.
- Muranty H., Jahier J., Tanguy A.M., Worland A.J., Law C.N.** 2002. Inheritance of resistance of wheat to eyespot at the adult stage. *Plant Breeding* 121, 531-538.
- Singh, R. P.** 1993. Genetic association of gene Bdv1 for tolerance to BYDV with genes *Lr34* and *Yr18* for adult plant resistance to rust in bread wheat. *Plant Dis.* 77, 1103-1106.

# Analyse de la durabilité de résistances au virus de la jaunisse nanisante de l'orge

Emmanuel JACQUOT\*<sup>1</sup>, Agnès DELAUNAY<sup>1</sup>, Stéphanie MORLIÈRE<sup>1</sup>, Florian CHAIN<sup>1</sup>, Gérard RIAULT<sup>1</sup>, Maxime TROTTE<sup>2</sup>, Stephen SUNDERWIRTH<sup>3</sup>,

\* Coordinateur : Emmanuel JACQUOT, emmanuel.jacquot@rennes.inra.fr, Tél. : 02 23 48 58 17

1 - INRA, Agrocampus Rennes, UMR1099 BiO3P (Biology of Organisms and Populations applied to Plant Protection) BP 35327, 35653 Le Rheu

2 - INRA, Agrocampus-Rennes, UMR118 APBV (Plant Breeding and Biotechnology) - BP 35327, 35653 Le Rheu

3 - CETAC - Secobra Recherches, Centre de Bois Henry, 78580 Maule

Ce programme de recherche, impliquant les UMRs BiO3P et APBV de l'INRA de Rennes-Le Rheu et le CETAC, a été initié en juin 2004 par la mise en place de procédures d'entretien d'isolats du virus de la jaunisse nanisante de l'orge (*Barley yellow dwarf virus*-PAV, BYDV-PAV) sur hôtes différentiels (entretiens alternatifs) et par la conception d'un dispositif expérimental pour les essais en plein champ.

## Processus d'adaptation d'un isolat à son hôte : durabilité d'une source de résistance

Le génome des phytovirus à ARN est répliqué grâce à l'action d'une ARN polymérase d'origine virale. Cette enzyme, peu fidèle car dépourvue de système de correction est à l'origine de l'introduction d'erreurs (mutations, recombinaisons, insertions et/ou délétions) dans les molécules néo-synthétisées. Du fait de la nature simple brin de leur génome, les modifications nucléotidiques ainsi introduites constituent des mutations directes de l'information génétique virale. Associé aux temps de générations très courts de leur cycle biologique et à la taille réduite de leur génome, ce processus de réplication peu fidèle augmente le potentiel de diversification génétique des génomes viraux au niveau même de l'individu infecté. Cette caractéristique permet aux populations virales d'évoluer très rapidement. Cependant, les contraintes associées à l'organisation complexe des génomes viraux et au statut de parasite obligatoire de ces micro-organismes réduisent l'espace moléculaire de la variabilité génétique des entités virales infectieuses. Ainsi, tous les variants d'une population virale sont continuellement soumis au processus de diversification, de compétition et de sélection. Par conséquence, les hôtes infectés hébergent une collection de variants dérivant plus ou moins directement des molécules d'ARN viraux inoculées. Ces variants possèdent potentiellement une valeur adaptative différente de celle de leur(s) molécule(s) matrice(s). L'évolution virale, conséquence des réponses des populations de pathogènes aux différentes pressions de l'hôte et de l'environnement, se traduit par la sélection continue des entités les plus adaptées. Ce processus de sélection/adaptation, décrit pour des modèles viraux animaux, bactériens et végétaux, peut être étudié en suivant la modification des propriétés biologiques d'un isolat au cours de passages en série (Serial Passage Experiment, SPE) de la population virale sur un hôte résistant.

Les travaux effectués sur la JNO depuis sa première caractérisation en 1951 ont décrit la variabilité biologique (gamme d'hôtes, mode de transmission) et moléculaire (séquences, cadres ouverts de lecture) de ces phytovirus.

Toutefois les connaissances disponibles sur la variabilité moléculaire du BYDV-PAV se rapportent à des descriptions et comparaisons de données moléculaires (séquences, profils de restriction) d'isolats possédant des origines géographiques et biologiques (plantes hôtes) distinctes. A partir de ces informations, il est difficile d'évaluer précisément l'impact de la plante sur la diversité des populations virales et sur leur évolution.

Dans ce contexte, le potentiel de deux sources de résistance en cours d'introgession chez le blé et leur impact sur l'évolution d'isolats du BYDV-PAV (contournement de résistance, gain de virulence et d'agressivité) a été étudié. Ainsi, l'utilisation de protocoles d'inoculations standardisés développés au laboratoire a révélé que la lignée résistante de blé "TC14" limite l'accumulation virale au cours des 21 premiers jours de l'infection et retarde la systémie du virus dans la plante infectée. Ces données illustrent la qualité de cette source de résistance portée par la lignée "TC14". Cependant, la réalisation de SPE (en simulation de monocultures intensives) d'un isolat de BYDV-PAV sur cette lignée conduit après quelques passages à la sélection de variants viraux plus virulent contournant la résistance de la plante hôte. Cette forte virulence, observée au laboratoire en conditions contrôlées, est associée à une agressivité plus importante validée par l'intermédiaire d'expérimentations en champ. Ainsi, des composantes du rendement (nombre de grains/m<sup>2</sup> et poids de 1000 grains) sont plus fortement réduites par l'isolat issu des SPE sur "TC14" que par l'isolat d'origine n'ayant jamais rencontré la source de résistance. Ces résultats, illustrant le potentiel d'adaptation du BYDV-PAV aux pressions de sélections imposées par la lignée "TC14", sont en défaveur de la durabilité des résistances de cette lignée.

Compte tenu de la rareté des sources de résistance au BYDV, il convient de caractériser au mieux ces résistances et le processus d'adaptation décrit lors de ces expérimentations avant de définitivement rejeter la lignée "TC14" des programmes d'amélioration génétique du blé. Ainsi, en complément des études biologiques (cinétiques d'infections) conduites sur les isolats de BYDV-PAV générés au cours des entretiens intensifs sur hôtes résistants, une analyse moléculaire a été entreprise. Pour décrire la structure des populations virales de BYDV-PAV manipulées, une approche par SSCP (analyse de conformation polymorphique de fragments d'acides nucléiques simple brin) a été développée. Le génome viral a été divisé, de l'extrémité 5'-terminale à l'extrémité 3'-terminale, en régions de 500 bases en utilisant deux échelles chevauchantes. Chaque région du génome ainsi définie a

été analysée selon un protocole SSCP standardisé permettant de générer des profils électrophorétiques dont le nombre et l'intensité des bandes observées reflètent une image de la structure de la population virale étudiée. L'influence de l'hôte (espèce, génotype ou résistance) sur la structure des populations virales a été estimée en s'appuyant sur le polymorphisme des profils obtenus à partir d'isolats issus du laboratoire (collection d'isolats viraux provenant du Canada, des USA, du Mexique, d'Angleterre et de France) entretenus depuis plusieurs années de manière exclusive sur un hôte sensible (Orge cv. *Express*) ou issus de protocoles d'entretien sur hôte résistant. Les résultats obtenus révèlent (1) une absence de polymorphisme pour les isolats de la collection du laboratoire quelles que soient leurs caractéristiques (hôte, lieu et date de collection) et (2) l'existence d'une relation "profil SSCP/hôte" pour les isolats issus de l'entretien sur hôtes résistants. Ces résultats soulèvent des questions sur les conséquences des procédures d'entretien au laboratoire de collections de virus sur plante, puisque l'utilisation d'un hôte commun semble conduire à l'homogénéisation des populations virales en collection. Cependant, l'adaptation moléculaire d'une population virale à l'hôte dans lequel elle est générée (observé dans le cas de l'entretien sur un nouvel hôte) permet d'étudier la dynamique de l'adaptation du BYDV-PAV à la source de résistance en cours d'introgession ("TC14"). Ainsi, la région 1500-2000, localisée dans le cadre ouvert de lecture correspondant à la polymérase virale, est associée à un profil SSCP présentant deux bandes spécifiques des populations virales issues de l'entretien sur blé "TC14" ou sur orge cv. *Express*. La quantification de ces bandes après intégration des profils SSCP permet de définir un facteur R reflétant la proportion d'entités moléculaires virales de type "TC14" au sein de la population analysée. Ce rapport tend vers 1 pour une population adaptée à l'hôte résistant.

Le processus d'adaptation de l'isolat BYDV-PAV aux lignées résistantes, tel qu'il a été défini dans le dispositif expérimental mis en place pour étudier l'adaptation aux sources de résistance "TC14" et "Zhong", ne prend pas en compte les alternances d'hôtes indispensables dans la nature pour assurer le maintien des isolats viraux en période d'inter-cultures. Ainsi, en conditions contrôlées, l'adaptation de l'isolat viral à la pression imposée par la plante résistante peut se réaliser aux dépens de sa valeur adaptative ("fitness"). Dans des conditions plus proches du cycle biologique naturel, l'isolat virulent (sélectionné par la plante résistante) pourrait alors être contre-sélectionné lors de passages sur hôtes relais sensibles. Afin de tester cette hypothèse, des protocoles d'entretien impliquant différentes

alternances d'hôtes sensibles et résistants ont été réalisés. Les caractéristiques biologiques et moléculaires des populations virales ont été évaluées régulièrement au cours de ces procédures d'entretien. Une analyse conjointe des données collectées (aire sous la courbe du pourcentage d'infection (AUPPC) et facteur R) a révélé l'existence d'une corrélation significative entre ces deux variables. De plus, une analyse statistique de ce jeu de données a permis de démontrer que les populations virales présentant une valeur R inférieure à 0.5 sont significativement moins virulentes. Ces résultats valident la possibilité d'utiliser l'approche moléculaire pour décrire la virulence (efficacité d'infection) des isolats de BYDV-PAV sur la lignée "TC14" et permettent d'étudier les conditions requises pour qu'un isolat ne dépasse pas le seuil de virulence ( $R=0.5$ ) dans un dispositif utilisant "TC14" comme source de résistance.

Ainsi, les paramètres cinétiques de l'adaptation du BYDV-PAV à la lignée "TC14" ont été estimés en exploitant les données provenant de plusieurs SPEs indépendants. Après trois passages successifs de l'isolat '4E' sur l'hôte résistant, la population virale obtenue est majoritairement constituée d'entités moléculaires "adaptées". Le facteur R associé ( $R=0.63 \pm 0.1$ ), supérieur au seuil défini, confirme l'augmentation rapide de virulence produite après infections successives de la lignée "TC14". Contrairement au processus d'adaptation à l'hôte résistant, le passage successif d'un isolat présentant un facteur R élevé (isolat '4T') sur un hôte sensible (orge cv. *Express*) ne modifie pas significativement la valeur R de la population virale, cette dernière reste virulente ( $R = \pm 0.8$ ). Cependant, lorsque des alternances d'hôtes sont utilisées dans les protocoles d'entretien pour l'isolat '4E' ( $R=0.16 \pm 0.03$ ), les populations virales générées conservent, après au moins 8 passages, une virulence atténuée ( $R < 0.5$ ).

Les sources de résistance contre le BYDV-PAV portées par les lignées de blé "Zhong" et "TC14" imposent une pression de sélection qui conduit l'isolat de BYDV-PAV à accroître rapidement sa virulence et son agressivité. Ce processus d'adaptation n'est pas réversible. Cependant, dans un contexte d'utilisation discontinue de la résistance, la dynamique d'adaptation est atténuée. Compte tenu de la rareté des sources de résistance au BYDV-PAV chez le blé, ce résultat doit être pris en compte pour définir les conditions avec lesquelles ces résistances pourront être utilisées dans les programmes d'amélioration du blé afin d'éviter la création d'un environnement génétique favorable à l'émergence de variants virulent et/ou agressifs du BYDV-PAV. Enfin, une des perspectives ouvertes par ce programme consiste à envisager le cumul de ces deux sources de résistance dans un même fond génétique.

# Durabilité de la résistance partielle à la rouille brune du blé

Christian LANNOU\*<sup>1</sup>, Henriette GOYEAU<sup>1</sup>, Jean-Baptiste REGNARD<sup>2</sup>, Jean-Michel MOREAU<sup>3</sup>, Bernard ROLLAND<sup>4</sup>,

\* **Coordinateur** : Christian LANNOU, lannou@grignon.inra.fr, Tél. : 01 30 81 54 26

1 - INRA UMR BIOGER - BP 01, 78850 Thiverval-Grignon

2 - GIE Club 5 - 83, avenue de la Grande Armée, 75782 Paris Cedex 16

3 - CETAC - 7, rue Coq Héron, 75030 Paris Cedex 01

4 - INRA UMR APBV - BP 35327, 35653 Le Rheu

Il est communément admis que la résistance partielle présente une bien meilleure durabilité que les résistances spécifiques. Alors que la résistance spécifique s'exprime en tout ou rien (résistance/sensibilité), la résistance partielle se manifeste par une réduction quantitative de la maladie. Les mécanismes impliqués sont une augmentation de la période de latence, et une réduction de la quantité de spores produites et/ou de l'efficacité d'infection de ces spores. Un bon niveau de résistance partielle permet de ralentir fortement le développement des épidémies (slow rusting). La prise en compte de ce type de résistance dans les programmes d'amélioration variétale est encouragée mais pose plusieurs questions :

- on connaît très peu de choses sur la durabilité effective des résistances partielles. On sait par expérience que le niveau de résistance d'un cultivar varie dans le temps et que la résistance partielle est susceptible de s'éroder au cours des années (Mundt *et al.*, 2002). Par contre, on ne sait pas à quelle vitesse ni comment une population pathogène s'adapte à une résistance partielle,
- on ne sait rien sur la diversité des populations parasites en termes de réponse à une résistance partielle. Un niveau de spécificité a parfois été montré pour certains QTL de résistance (Manzanares *et al* 2000, Pflieger *et al* 1999), mais la variabilité des composantes de l'agressivité n'a jamais été décrite à l'échelle d'une population parasite. Tous les individus ont ils la même agressivité sur une variété partiellement résistante ou bien existe-t-il une diversité susceptible de conduire à une érosion rapide du niveau de résistance (Lannou 2001),
- les modèles théoriques de gestion visant à optimiser l'efficacité et la durabilité des résistances variétales, ainsi que les applications qui en sont issues ne prennent en compte que les résistances spécifiques et la relation variété (assemblage de gènes de résistance spécifiques) / pathotype (combinaison de gènes d'avirulence). Valoriser la résistance partielle dans les agrosystèmes implique maintenant d'introduire la résistance partielle dans les modèles de gestion et d'évaluer les conséquences en termes d'efficacité et de durabilité d'une utilisation accrue et raisonnée de variétés partiellement résistantes.

La rouille brune du blé, causée par *Puccinia triticina*, est l'un des éléments majeurs du complexe parasitaire foliaire du blé. Les baisses de rendement dues à cette maladie atteignent 40-50 % sur variété sensible en l'absence de traitement fongicide. Les sélectionneurs disposent de sources de résistance à ce parasite, mais elles ont été peu valorisées jusqu'ici, alors qu'un prix du blé élevé permettait de financer une couverture fongicide systématique.

Dans les variétés les plus cultivées, on a pu identifier 6 gènes de résistance spécifique, dont un seul est encore efficace (Park *et al.*, 2001). Certaines variétés possèdent en outre d'autres facteurs de résistance non identifiés, leur permettant de limiter les attaques de rouille brune à des niveaux faibles, voire nuls.

Les populations du parasite sont diversifiées pour les virulences et certains pathotypes cumulent jusqu'à 13 virulences. Les populations parcellaires sont composées de quelques pathotypes majoritaires, mais également d'un grand nombre de pathotypes en faible fréquence. Cela laisse peu d'espoir à une recherche de la durabilité basée sur le cumul de résistances spécifiques. Notre objectif est donc de favoriser l'utilisation de résistances partielles, qui ont donné par ailleurs d'excellents résultats face à la rouille brune (Singh *et al.* 1998, Rajaram & van Ginkel 2001).

Une première étape, pour produire des connaissances sur le comportement des résistances partielles en situation de production agricole, était d'identifier des sources de résistance partielle dans le matériel génétique disponible en France. Dans le même temps, nous avons développé une étude du niveau d'agressivité<sup>1</sup> comme caractère quantitatif dans les populations parasites. On suppose en effet que l'érosion d'une résistance partielle résulte d'une sélection pour l'agressivité chez le parasite.

<sup>1</sup> Par agressivité, on entend l'importance quantitative des symptômes produits sur une plante sensible par un individu parasite. Dans le cas de la rouille brune, parasite biotrophe strict, la notion d'agressivité se confond avec celle de fitness, telle qu'elle est utilisée en génétique des populations (Pariaud *et al.*, 2008, soumis).

## 1. Identification et suivi du niveau de la résistance partielle des variétés

L'objectif était d'identifier et d'évaluer des sources de résistance partielle, et de préparer leur utilisation en sélection. Pour atteindre cet objectif, il était nécessaire de développer trois volets complémentaires :

- 1) caractérisation de la résistance partielle à la rouille brune dans le matériel génétique utilisé en France, au champ puis en conditions contrôlées,
- 2) préparation de matériel végétal pour de futures études génétiques de la résistance partielle,
- 3) suivi des virulences dans les populations naturelles de *P. triticina*.

## ► Caractérisation de la résistance partielle à la rouille brune

### Résistance partielle au champ

L'objectif était de proposer une méthode d'évaluation de la résistance partielle, et de mesurer au champ le niveau de résistance partielle des variétés à la rouille brune du blé dans des essais multilocaux.

La méthodologie choisie a été adaptée à partir de celle utilisée par le CIMMYT. Elle consiste à conduire des essais inoculés artificiellement avec un inoculum contournant la résistance spécifique (totale) des lignées, pour pouvoir révéler leur niveau de résistance partielle. Cela nécessite : (outre une bonne connaissance des populations pathogènes, voir § "Déterminisme génétique de la résistance partielle", p.19) :

- d'identifier les résistances spécifiques présentes dans les lignées
- d'inoculer les essais de manière forte et homogène avec des isolats choisis pour contourner l'ensemble des gènes de résistance spécifique identifiés dans les lignées.

### Choix et caractérisation des lignées à tester :

Trois années d'essais au champ ont été réalisées, avec chaque année environ 70 génotypes testés, impliquant au total 94 génotypes suite à l'abandon de certaines lignées et introduction de nouvelles au cours des 3 ans. Les génotypes ont été choisis pour leur potentiel présumé de résistance partielle à la rouille brune d'après les observations des sélectionneurs. Toutes les lignées et variétés introduites dans les essais ont été caractérisées au préalable pour leurs gènes de résistance spécifique : les variétés ont été inoculées à l'INRA Grignon en serre au stade plantule avec une collection de 12 pathotypes standard, qui permettent de postuler les gènes de résistance spécifique présents dans les lignées. Nous avons trouvé dans les lignées et variétés des combinaisons à base des gènes *Lr1*, *Lr3*, *Lr10*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr24*, *Lr26* et *Lr37*. Ces résultats nous ont permis de sélectionner deux pathotypes contournant presque toutes les combinaisons de gènes de résistances spécifiques identifiées, donc aptes à révéler le niveau de résistance partielle des génotypes. Quelques génotypes, portant des combinaisons de gènes de résistance spécifique efficaces, étaient attendus totalement immuns au champ. La variété Buster, semée comme contaminatrice, a été utilisée en tant que témoin sensible de référence en 2005 uniquement : en effet, cette variété a exprimé en 2005 dans la plupart des lieux d'essais un niveau de

chlorose important qui a limité la sporulation du champignon, ne permettant plus de la considérer comme témoin de sensibilité. Nous avons donc ajouté pour 2006 et 2007 deux témoins de sensibilité, les variétés Frandoc et Ecrin.

### Évaluation du niveau de résistance partielle au champ :

Les essais implantés dans 12 lieux (Tableau 1) ont été inoculés par pulvérisation sur un contaminateur sensible d'une suspension de spores fournie par l'INRA Grignon à chaque partenaire. Une à quatre notations (Tableau 1) ont été effectuées chacun des 12 sites d'essai, selon la méthodologie utilisée par le CIMMYT, combinant une note quantitative (échelle de 0 à 100) associée à une note qualitative du type d'infection.

| Lieu d'essai    | Nombre de notations |      |      |
|-----------------|---------------------|------|------|
|                 | 2005                | 2006 | 2007 |
| Rennes (35)     | 4                   | 2    | 1    |
| Maisse (91)     | 3                   | 2    | 3    |
| Louville (28)   | 3                   | 3    | 3    |
| Caussade (82)   | 3                   | 3    | 2    |
| Lectoure (32)   | 3                   | 2    | 1    |
| Auchy (59)      | 3                   | 1    | 1    |
| Estrées (60)    | 3                   | 2    | 1    |
| Froissy (60)    | 2                   | 3    | 3    |
| Orgerus (78)    | 1                   | 3    | 2    |
| Maule (78)      | 1                   | 3    | 2    |
| Premesques (59) | 1                   | 2    | 1    |
| Semonville (28) | 1                   | 3    | -    |

Tableau 1 : Nombre de notations effectuées dans chaque lieu d'essai.

Certaines combinaisons lieu x année n'ont pas montré un état de la végétation et un développement de la maladie suffisants pour une évaluation quantitative correcte du niveau de résistance des variétés. Ces essais n'ont donc pas été pris en compte dans l'interprétation. Les combinaisons prises en compte pour la synthèse présentée ci-après sont surlignées dans le tableau 1. Après calcul de l'aire sous la courbe de progression de l'épidémie (AUDPC), pour les lieux où avaient été réalisées au moins 2 notations, les variétés ont été classées en fonction de leur niveau de résistance évalué par le rapport RAUDPC = AUDPC/AUDPC du témoin sensible. Le témoin sensible était Buster en 2005, et Ecrin en 2006 et 2007. Ces trois années d'essais au champ ont permis de mettre en évidence dans le matériel proposé une gamme de niveaux de résistance partielle intéressante à exploiter (Figure 1).

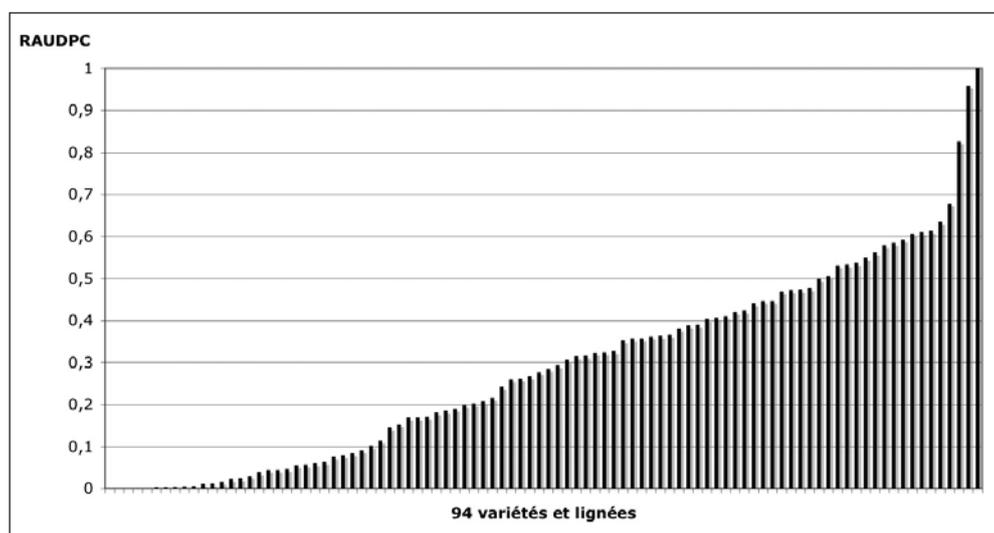


Figure 1 : Aire Relative sous la Courbe de Progression de la maladie (RAUDPC) au champ par rapport au témoin sensible, vis-à-vis de la rouille brune du blé, de 94 variétés et lignées, moyenne de différentes combinaisons lieu x année (voir le tableau 1 pour la liste des combinaisons retenues). Le témoin sensible Ecrin a une valeur 1.

La notation des types d'infection au champ a permis de déterminer que 37 des lignées et variétés étudiées ont présenté une réponse de type résistance spécifique, associée à une RAUDPC nulle (immunité) ou très faible. Cela signifie que ces génotypes comportent un ou plusieurs gènes de résistance qualitative, pour lesquels les deux pathotypes de rouille brune utilisés n'ont pas les virulences correspondantes. Nous n'avons donc pas pu évaluer le niveau de résistance quantitative de ces génotypes. Onze variétés et lignées, présentant une RAUDPC toujours supérieure à 0,5, ont été considérées comme sensibles. Les 46 variétés et lignées dont la RAUDPC était comprise entre 0,1 et 0,5 ont été considérées comme porteuses de gènes de résistance partielle.

#### Composantes de la résistance partielle en conditions contrôlées :

A l'issue des campagnes d'essais au champ 2005 et 2006, une série de 8 variétés et lignées a été sélectionnée pour quantifier les composantes de la résistance partielle, en conditions contrôlées, à l'aide d'une méthodologie simplifiée dérivée de celle mise au point par B. Pariaud au cours de sa thèse (Pariaud et al., soumis à *Phytopathology*). Des plantes adultes de ces génotypes ont été inoculées avec les deux pathotypes utilisés au champ. Selon les génotypes, la résistance partielle observée au champ a pu être attribuée soit à une période de latence plus longue, soit à une production de spores moins importante, soit à une efficacité d'infection moins élevée que pour la variété témoin sensible Ecrin, soit à une combinaison de ces composantes. Il semble donc que l'on ait bien une diversité des mécanismes génétiques en jeu.

#### ► Déterminisme génétique de la résistance partielle

A l'issue des deux premières campagnes d'essais au champ, certains génotypes représentant les différents niveaux

| Femelle   | mâle      | Nombre de grains F1 semés |
|-----------|-----------|---------------------------|
| Apache    | Andalou   | 2                         |
| Camp-Rémy | Andalou   | 6                         |
| Andalou   | PBI04-006 | 2                         |
| RABT02-52 | Andalou   | 7                         |
| Sidéral   | Andalou   | 10                        |
| Camp-Rémy | Apache    | 6                         |
| Apache    | H01239    | 8                         |
| Apache    | RABT02-52 | 10                        |
| Apache    | Sidéral   | 5                         |
| H01239    | Camp-Rémy | 1                         |
| PBI04-006 | Camp-Rémy | 1                         |
| Sidéral   | Camp-Rémy | 8                         |
| Ecrin     | Apache    | 7                         |
| Ecrin     | FD02130-3 | 7                         |
| Ecrin     | GA1-j3    | 7                         |
| Ecrin     | H01239    | 3                         |
| Ecrin     | PBI04-006 | 7                         |
| Ecrin     | Occitan   | 11                        |
| Ecrin     | RABT02-52 | 17                        |
| SO 207    | Ecrin     | 14                        |
| Trémie    | Ecrin     | 1                         |
| Ecrin     | UN20-77   | 11                        |
| H01239    | FD02130-3 | 17                        |
| RABT02-52 | FD02130-3 | 3                         |
| FD02130-3 | Sidéral   | 8                         |
| H01239    | Occitan   | 9                         |
| H01239    | RABT02-52 | 20                        |
| H01239    | Sidéral   | 15                        |
| PBI04-006 | RABT02-52 | 2                         |

Tableau 2 : Effectif de la génération F1 des croisements réalisés en 2007 entre variétés partiellement résistantes, ou avec le parent sensible Ecrin, semés à Rennes à l'automne 2007 pour la production de la génération F2.

de résistance partielle mesurés ont été sélectionnés pour l'étude de leur déterminisme génétique. Une série de croisements diallèles et avec le parent sensible Ecrin a été lancée au printemps 2007 à l'INRA de Rennes. Les grains F1 issus des croisements réussis ont été re-semés au champ à Rennes à l'automne 2007 (Tableau 2) pour obtenir la génération F2. La production de ce matériel dans le cadre de ce projet permettra de disposer des descendances nécessaires à l'étude du déterminisme génétique (mise en évidence de QTL, localisation de ces QTL) dans les travaux qui seront menés en continuité de ce programme dans les années à venir.

#### ► Structuration de la population parasite (virulences et pathotypes)

Le projet a permis de poursuivre et de compléter le suivi annuel de l'évolution des pathotypes dans les populations de rouille brune réalisé à Grignon, à l'aide d'un échantillonnage effectué sur les réseaux d'essais de la profession (Club 5, ARVALIS, CETAC). Ce suivi est fondamental pour surveiller l'émergence de nouvelles virulences ou pathotypes, car les populations évoluent constamment, essentiellement en fonction des gènes de résistance utilisés dans les variétés cultivées.

Les isolats collectés (300, 306 et 418 respectivement en 2005, 2006 et 2007) sont inoculés au stade plantule en serre à une série de lignées composant la gamme d'hôtes différentiels. La formule de virulence/avirulence sur cette gamme permet de déterminer le pathotype (= combinaison de virulences) des isolats.

Après une année 2004 caractérisée par une pression de maladie extrêmement faible, le niveau de maladie a remonté en 2005, conduisant à une structure des populations plus différenciée en fonction des variétés qu'en 2004. On tendait ainsi à retrouver la situation d'avant 2004, avec une distribution de pathotypes propre à chaque variété. Toutefois cette tendance ne s'est pas confirmée, car en 2006, une famille, composée presque exclusivement du pathotype 106314, est devenue dominante. Ce pathotype, apparu en 2003, est surtout inféodé à Caphorn et Trémie-Charger. Sur Apache et Orvantis, c'est la famille 006, elle aussi d'apparition récente (2002), qui est devenue la plus fréquente. Sur Soissons et Isengrain, le pathotype 073100 était toujours prépondérant (30-40 %), mais en déclin par rapport aux années où Soissons dominait le paysage variétal. L'évolution s'est poursuivie en 2007, et les deux familles de pathotypes 106314 et 006 sont devenues très dominantes, pratiquement sur toutes les variétés. Les différentes variétés présentent ainsi, contrairement aux années antérieures, des structures de populations très voisines. La famille 106314 était également très majoritaire sur Sankara. Ces deux familles cumulent les virulences correspondant aux gènes de résistance des principales variétés cultivées (*Lr10*, *Lr13*, *Lr14a*, *Lr37*). Tout se passe comme si ces deux familles, plus agressives sur toutes les variétés, avaient remplacé les anciennes familles de pathotypes qui étaient caractéristiques de chaque variété. La famille de pathotypes 126-136, également virulente sur toutes ces variétés, comporte des races plus complexes (avec plus de virulences). Elle représente environ 20 % de la population, mais sa progression est moins rapide que celle des familles 106314 et 006.

Les familles 106314 et 006, apparues en 2002-2003, avec un effectif de 2-3 isolats seulement, ont donc envahi les populations en 3-4 ans. Cette évolution au cours du temps illustre la capacité du pathogène à évoluer rapidement, essentiellement sous la pression des variétés cultivées. Ces familles ont en commun les virulences 10, 13 et 37. Le gène *Lr37* a commencé à être significatif dans le paysage variétal à partir de 2001 avec Apache, pour être présent à partir de 2003 sur environ 40% des surfaces cultivées.

Les constantes dans cette évolution sont :

- le maintien de la diversité, avec une dizaine de familles de pathotypes sur chaque variété,
- l'homogénéité géographique à l'échelle de la France : la famille dominante peut changer en fonction de la variété, mais elle est présente du Nord au Sud sur cette variété.

La fréquence des pathotypes dans les populations naturelles, qui reflète en quelque sorte le "succès" de ces pathotypes au champ, peut permettre d'émettre des hypothèses sur leur agressivité. Ce suivi des populations naturelles est donc indispensable pour assurer la pertinence du choix des isolats utilisés pour évaluer le niveau de résistance partielle, que ce soit au champ ou en conditions contrôlées.

## 2. Agressivité de la rouille brune du blé et adaptation du parasite à son hôte

Il est difficile d'évaluer la durabilité des résistances de type partiel, en l'absence de données expérimentales sur le potentiel d'adaptation des populations pathogènes pour les caractères quantitatifs. En effet, de même que les variétés cultivées exercent une forte pression de sélection sur les facteurs de virulence (qualitatifs), il est fortement probable qu'elles exercent aussi une pression de sélection sur les caractères quantitatifs. Notre objectif était donc d'évaluer le potentiel d'adaptation pour les caractères quantitatifs, à partir de la mesure de composantes de l'agressivité de différents pathotypes sur des variétés cultivées. Notre étude s'est basée sur l'analyse de la structure des populations de *P. triticina* en France, qui a montré que sur la variété Soissons un pathotype (073100, codé P1 dans la présente étude) dominait largement (Goyeau et al., 2006). La question de l'adaptation différentielle a été abordée en 3 étapes successives :

- 1) le pathotype P1 est-il plus agressif sur Soissons que deux autres pathotypes, P2 et P3, virulents sur Soissons, mais présents en fréquence plus faible ou nulle sur cette variété ?
- 2) d'une manière plus générale, les pathotypes ont-ils une variété de prédilection ?
- 3) les pathotypes ont-ils des profils d'agressivité propres ?

Les caractères quantitatifs ont été mesurés en serre sur des plantes de blé adultes, selon la méthodologie décrite par Pariaud et al. (soumis à Phytopathology).

### ► Adaptation du pathotype P1 à la variété Soissons

Ce travail est décrit en détail dans la publication de Pariaud et al. (soumis à Phytopathology). Nous avons montré que le pathotype P1 (073100) (Figure 2), majoritaire sur Soissons, depuis 1999, est plus agressif que les deux autres pathotypes minoritaires P2 (014103) et P3 (166336). Les différences d'agressivité sont de 10 à 25 % environ selon les paramètres d'agressivité considérés.

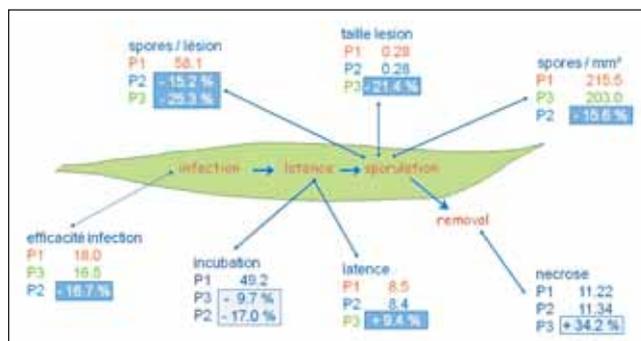


Figure 2 : Agressivité relative des pathotypes P1, P2, P3 (les différences significatives avec P1 sont encadrées de bleu).

### ► Étude de l'adaptation différentielle pour les caractères quantitatifs

En utilisant toujours la même méthodologie qu'au § "Adaptation du pathotype P1 à la variété Soissons" ci-dessus, nous avons mesuré l'adaptation quantitative des pathotypes P1, P2 et P3 à diverses variétés. En raison de leurs différences pour les virulences, le test de l'adaptation différentielle de ces pathotypes aux variétés a été fait sur des séries de variétés différentes pour chacun des 3 pathotypes. L'agressivité du pathotype P1 a été mesurée sur Soissons d'une part, et sur trois autres variétés sensibles dépourvues de gènes de résistance spécifique d'autre part (Scipion, Morocco et Festival). L'agressivité du pathotype P2, supposé avoir été adapté à la variété Thésée, a été comparée sur les variétés Soissons, Morocco, Thésée et Altria. Enfin le pathotype P3, originaire de la variété Trémie, a été évalué pour son agressivité sur Soissons et Trémie.

Nous avons montré que P1 était significativement plus agressif sur sa variété d'origine Soissons pour la période de latence, la taille de lésion et la quantité de spores produite (Figure 3). Les composantes de l'agressivité du pathotype P2 étaient toujours dans les plus élevées sur la variété Thésée, avec une taille de lésion significativement plus élevée pour cette variété (Figure 4). L'agent pathogène présente donc bien la capacité à s'adapter à son hôte d'origine pour des caractères quantitatifs. Par contre cette adaptation ne s'est pas produite pour le pathotype P3, qui s'est au contraire montré significativement moins performant sur sa variété d'origine Trémie (Figure 5). Ce résultat est d'ailleurs cohérent avec l'observation de la disparition de ce pathotype des populations naturelles seulement 3 ans après son apparition. Ce pathotype complexe doté de 13 virulences s'est comporté comme un pathotype généraliste capable d'attaquer de nombreuses variétés, mais peu agressif, alors que le pathotype P1 adapté à la variété Soissons s'est maintenu fortement dominant sur cette variété, à la quelle il est resté inféodé puisqu'il n'avait pas les virulences nécessaires pour attaquer les variétés qui ont succédé à Soissons.

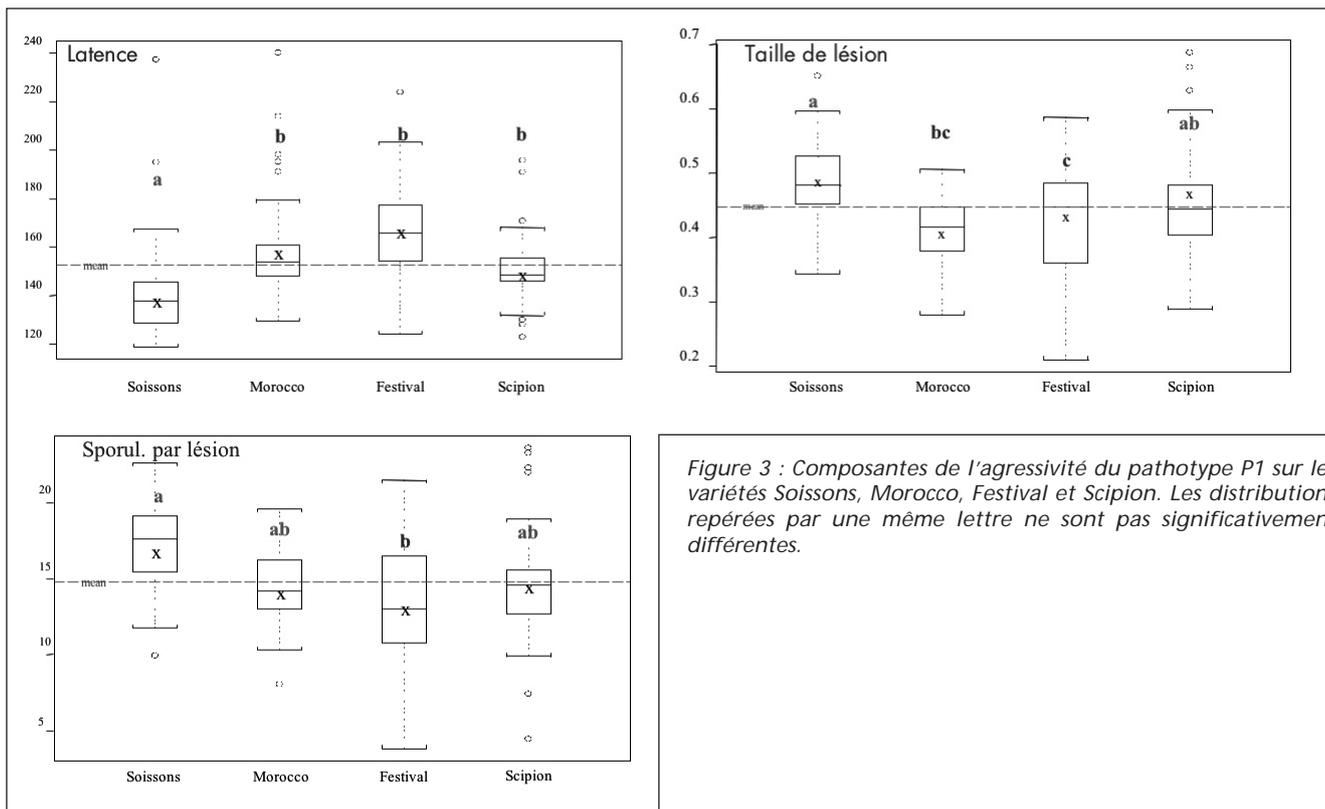


Figure 3 : Composantes de l'agressivité du pathotype P1 sur les variétés Soissons, Morocco, Festival et Scipion. Les distributions repérées par une même lettre ne sont pas significativement différentes.

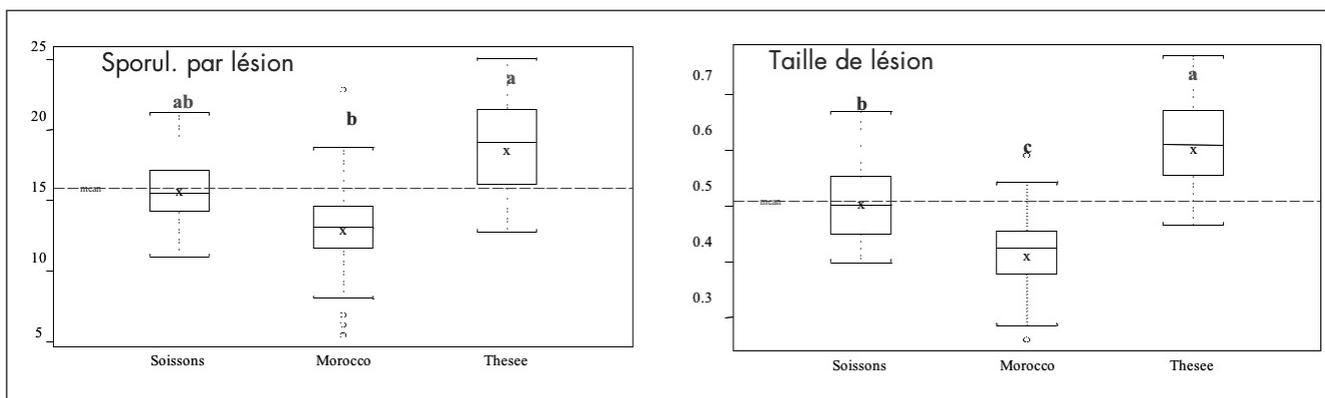


Figure 4 : Composantes de l'agressivité du pathotype P2 sur les variétés Soissons, Morocco et Thésée. Les distribution repérées par une même lettre ne sont pas significativement différentes.

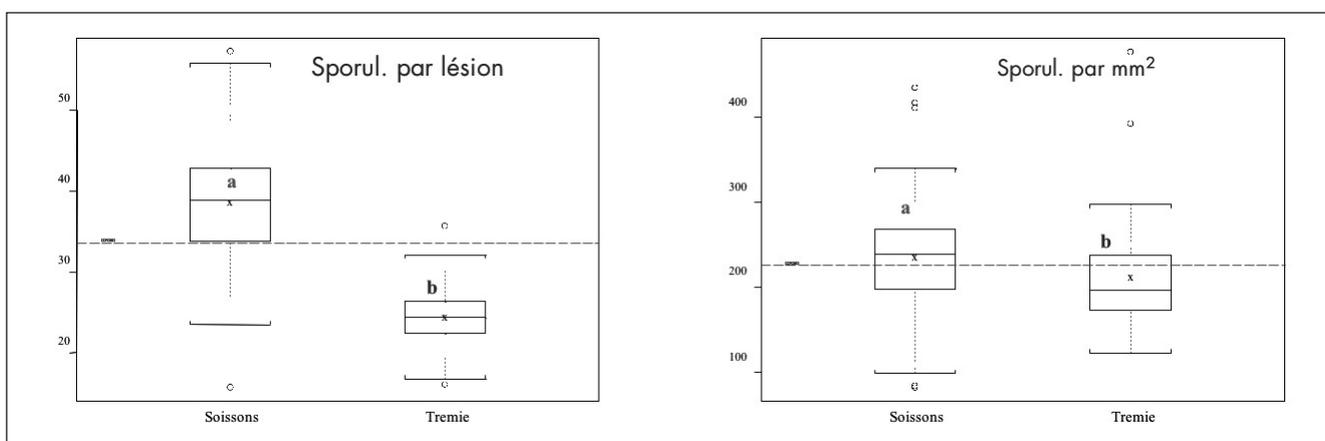


Figure 5 : Composantes de l'agressivité du pathotype P3 sur les variétés Soissons et Trémie. Les distributions repérées par une même lettre ne sont pas significativement différentes.

## ► Étude des profils d'agressivité des pathotypes

L'objectif de cette partie était de savoir si les pathotypes ont un profil d'agressivité propre, qu'ils conservent quelle que soit la variété à laquelle ils sont confrontés. La taille des lésions, la sporulation par unité de surface et la quantité de chlorose induite (entraînant la mort des tissus donc l'arrêt de la sporulation pour ce parasite obligatoire) ont été mesurées pour différents couples pathotype-variété, relativement au couple témoin P1-Soissons. Nous avons ainsi montré que P2 se caractérisait par une sporulation par unité de surface faible, et P3 par de petites lésions et une forte induction de chlorose, quelle que soit la variété (Tableau 3). Ces deux pathotypes semblent donc conserver certaines caractéristiques de leur agressivité indépendamment de l'hôte rencontré.

| Pathotype   | Latence | Taille de lésions | Sporulation par mm <sup>2</sup> | Sporulation par lésion | Chlorose | Mort locale des tissus hôtes |
|-------------|---------|-------------------|---------------------------------|------------------------|----------|------------------------------|
| P1 (073100) | +       | +                 | +                               | ++                     | -        | -                            |
| P2 (014103) | +       | +                 | -                               | +                      | -        | -                            |
| P3 (166336) | -       | -                 | +                               | -                      | +        | +                            |

Tableau 3 : Caractéristiques d'agressivité relatives au couple P1-Soissons des pathotypes P1, P2 et P3.

Ce résultat, qui restait relatif au couple Soisson-P1 pour lequel une nette adaptation quantitative a été démontrée, a été approfondi en comparant les profils d'agressivité des pathotypes P1 et P2 sur la variété témoin sensible Morocco (non cultivée en France et donc à laquelle ces pathotypes n'ont jamais été confrontés). Les profils respectifs de P1, P2 et P3 définis ci-dessus ont été retrouvés sur cette variété (Tableau 4), à savoir :

- une agressivité élevée pour tous les paramètres pour P1 (latence courte, et taille de lésion, sporulation par lésion et sporulation par unité de surface élevée).

| Pathotype   | Latence | Taille de lésions | Sporulation par mm <sup>2</sup> | Sporulation par lésion | Chlorose | Mort locale des tissus hôtes |
|-------------|---------|-------------------|---------------------------------|------------------------|----------|------------------------------|
| P1 (073100) | +       | +                 | +                               | ++                     | -        | -                            |
| P2 (014103) | +       | +                 | -                               | +                      | -        | -                            |

Tableau 4 : Caractéristiques d'agressivité relatives des pathotypes P1 et P2 sur la variété Morocco.

- Une faible sporulation par unité de surface pour P2
- Une latence longue, des lésions petites et une forte induction de chlorose pour P3

Nous avons donc démontré que les pathotypes présentaient un certain niveau de spécialisation pour un fond génétique de l'hôte donné, et qu'il existait donc une adaptation différentielle pour les caractères quantitatifs. Il s'ensuit donc un risque d'érosion de la résistance quantitative en cas de culture à une grande échelle, d'où l'importance de conserver un objectif de diversification des sources de résistances pour préserver la durabilité des résistances de type quantitatif. Nous avons également montré que les pathotypes conservaient certaines de leurs caractéristiques d'agressivité (ou profil d'agressivité), d'une variété à l'autre, donc que les caractères quantitatifs peuvent être conservés : ce résultat suggère également un risque plus rapide d'érosion des résistances partielles, dans le cas où un pathotype avec un fort niveau d'agressivité comme P1 se maintient dans un paysage non protégé par des résistances spécifiques. Ces résultats militent donc en la faveur du maintien au sein des variétés de combinaisons de résistances de type qualitatifs et quantitatifs.

## ► Conclusion

Grâce au partenariat établi dans ce programme, nous avons pu caractériser au champ des variétés et lignées présentant divers niveaux de résistance partielle à la rouille brune, niveaux sur lesquels nous n'avions aucune donnée avant les travaux présentés ici. La réalisation d'une thèse (Bénédicte Pariaud, soutenance 2008) conjointement à ce projet, a permis, après avoir mis au point une méthodologie d'étude des composantes de l'agressivité en serre sur plantes adultes, de démontrer l'existence d'une capacité d'adaptation chez *P. triticina* à la résistance quantitative, par le biais de pathotypes présentant des "profils" d'agressivité parfois conservés vis-à-vis d'hôtes avec des fonds génétiques différents. Ce travail suggère donc que la résistance partielle n'est pas durable en soi, et qu'il importe de préserver sa durabilité en diversifiant les sources de résistance utilisées, et en les associant à des résistances de type spécifique. Ce travail se prolonge par une caractérisation plus fine en serre en 2008 et 2009 des composantes de la résistance partielle dans les lignées et variétés sources mises en évidence au champ, afin de vérifier si une diversification est possible à partir de ces sources. De plus une étude génétique de ces sources sera réalisée à moyen terme, grâce au programme de croisement avec un parent sensible des lignées porteuses de résistance partielle.

## Références bibliographiques

Goyeau H., Park, R., Schaeffer, B., and Lannou, C., (2006). Distribution of pathotypes with regard to host cultivars in French wheat leaf rust populations. *Phytopathology* 96:264-273.

Lannou C., (2001). Intrapathotype Diversity for Aggressiveness and Pathogen Evolution in Cultivar Mixtures. *Phytopathology* 91:500-510.

Manzanares-Dauleux, M.J., Delourme, R., Baron, F., Thomas, G., (2000). Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to clubroot in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 101: Theoretical and Applied Genetics 101: 885-891.

Mundt, C.C., Cowger, C., Garrett, K.A. 2002. Relevance of integrated disease management to resistance durability. *Euphytica* 124: 245-252.

Pflieger, S., Lefebvre, V., Caranta, C., Blattes, A., Goffinet, B., Palloix, A. 1999. Disease resistance gene analogs as candidates for QTLs involved in pepper-pathogen interactions. *Genome* 42: 1100-1110.

Pariaud B., Ravigné V., Halkett F., Goyeau H., Carlier J. and Lannou C., 2008. Aggressiveness and its role in the adaptation of fungal plant pathogens, en révision pour *Plant Pathology*.

Pariaud B, Robert C., Goyeau H., and Lannou C. Adaptation to the host for quantitative traits in wheat leaf rust. *Soumis à Phytopathology*.

Park RF, Goyeau H, Felsenstein FG, Bartos P, Zeller FJ. 2001. Regional phenotypic diversity of *Puccinia triticina* and wheat host resistance in western Europe, 1995. *Euphytica* 122: 113-127.

Singh, R. P., A. Mujeeb-Kazi, et al. (1998). "Lr46: A gene conferring slow-rusting resistance to leaf rust in wheat." *Phytopathology* 88: 890-894.

Rajaram S. and M. van Ginkel (2001). Mexico: 50 years of international wheat breeding. *The world wheat book*. A. P. Bonjean and W. J. Angus. Londres - Paris - New York, Lavoisier: 579-608.

# Résultat d'étude en laboratoire de la sensibilité variétale chez le blé tendre pour l'appétence aux limaces

Pierre TAUPIN\*<sup>1</sup>, Marc PALLUAULT<sup>1</sup>, Josiane BONNEMÈRE<sup>1</sup>, Christophe RENAULT<sup>1</sup>, Catherine LECONTE<sup>1</sup>, Jean-Baptiste REGNARD<sup>2</sup>

\* Coordinateur : Pierre TAUPIN, p.taupin@arvalisinstitutduvegetal.fr, Tél. : 01 64 99 22 68

1 - ARVALIS - Institut du végétal, 91720 Boigneville

2 - GIE Club 5 - 83, avenue de la Grande Armée, 75782 Paris Cedex 16

Les dégâts de limaces en cultures céréalières sont de plus en plus fréquents.

Ils sont consécutifs à la succession d'années à climat doux, avec de longues périodes humides.

Le développement des techniques simplifiées de travail du sol, l'implantation d'intercultures pour lutter contre la fuite des nitrates, les jachères et les rotations comprenant une culture de colza (plante très appétente pour les limaces) sont autant de facteurs favorables au développement de ce ravageur.

Actuellement, le principal moyen de lutte est la lutte chimique à base de granulés appâts.

85 % du marché mondial des antilimaces sont réalisés en Europe, très touchée par ce ravageur.

Pour réduire les risques, la lutte chimique devrait être précédée de mesures agronomiques : travail du sol et déchaumage qui perturbent le milieu de vie des limaces (réduction de nourriture, mortalité des œufs).

La résistance variétale est une autre piste peu explorée jusqu'à présent.

En 2001, ARVALIS - Institut du végétal (P. Taupin) a mis au point une méthode de mesure de l'appétence des plantes pour les limaces.

Cette méthode en laboratoire permet de mesurer plus précisément les attaques de limaces. Ainsi, des différences d'appétence ont été observées entre diverses espèces utilisées comme couverts végétaux en interculture.

Des différences de consommation ont été également démontrées entre les espèces d'une même famille de plantes ; par exemple chez les crucifères, le colza est beaucoup plus consommé que les moutardes.

Il semble opportun de s'interroger sur l'existence ou non de telles différences entre les variétés de blé tendre d'hiver.

## ► Objectif

Comparer sur limaces grises (*Deroceras reticulatum*) l'appétence (= consommation) du plus grand nombre possible de variétés de blé tendre.

## ► Matériel expérimental

**Blé tendre d'hiver** : 33 variétés testées

**Origine** : GIE Club 5 (SERASEM, FLORIMOND DESPREZ, BENOIST, NICKERSON-VERNEUIL).

**Ravageur** : Limace grise (*Deroceras reticulatum*)

**Origine** : Limaces de toutes tailles provenant de champs de grandes cultures, fournies par la société ARBIOTECH (rue de Saint-Brieuc, ZA les Bretins, 35590 Saint-Gilles) et livrées en 2 arrivages par 1000, les 9 et 17/11/04.

Les barquettes "GEVES" (L 180 mm x l 120 x h 155 mm) utilisées permettent de semer 36 variétés de blé à raison de 2 graines par variété.

## 1. Dispositif expérimental et variables mesurées

L'ordre des variétés semées dans la barquette est le résultat d'un tirage aléatoire ; afin de faciliter l'expérience, cet ordre est identique pour toutes les barquettes de l'essai (voir explication au paragraphe discussion).

33 variétés de blé tendre d'hiver par barquette "GEVES" à raison de 2 plantules par variété avec 10 limaces à jeun depuis 48 heures par barquette.

20 barquettes observées par jour pendant 12 jours du 15/11 au 3/12/2004 :

- semaine S : lundi 15/11/2004 (mise en place), comptage des plantules attaquées : 16, 17, 18, 19/11/2004
- semaine S+1 : lundi 22/11/2004 (mise en place), comptage des plantules attaquées : 23, 24, 25, 26/11/2004
- semaine S+2 : lundi 29/11/2004 (mise en place), comptage des plantules attaquées : 30/11, 1/12, 2/12, 3/12/2004

240 barquettes observées au total, soit 480 plantules par variété.

Initialement, pour ne pas surcharger le travail, nous avons projeté de réaliser 3 séries de tests avec pour chaque, un nombre relativement limité de variétés différentes, hormis quelques variétés communes pour établir des comparaisons entre ces tests afin de réaliser au final un classement global de toutes les variétés.

Mais les résultats, qui auraient pu s'enrichir à chaque nouveau test, ne sont pas valables en terme de comparaison.

En effet une variété, testée dans un premier test, avec des variétés très peu appétentes, sera classée par exemple la plus appétente ; mais si, par exemple, cette variété faisait l'objet d'un second test avec des variétés très appétentes, elle pourrait être alors classée la moins appétente du lot ; un classement d'appétence regroupant différents tests n'est donc pas possible.

La seule solution est donc de tester toutes les variétés dans une même barquette ; mais cette méthode présente des limites, comme la dimension de la barquette ou le temps d'observation.

Afin d'obtenir une précision correcte des résultats, le test est répété sur plusieurs barquettes pour avoir un nombre de plantules observées suffisant par variété.

## 2. Comptage des plantules levées

---

Pour chaque barquette, lorsque les plantules sont au stade 1 feuille et avant introduction des limaces, on procède au comptage des plantes levées pour chaque variété, soit 0; 1 ou 2 plantules levées.

Le comptage des plantes levées est indispensable afin de ne pas compter une plante disparue comme plante attaquée alors qu'en fait elle n'a pas poussé. Par ailleurs, ce comptage de plantules levées permet de gagner du temps par le fait de ne pas rechercher la graine lorsqu'une plantule est manquante lors de la notation des plantes attaquées.

Juste après ce comptage levée, introduction de 10 limaces grises de toutes tailles par barquette, les limaces étant à jeun depuis 48 heures.

L'introduction des limaces est faite de la manière suivante : les limaces sont placées dans le couvercle renversé de la barquette et lorsqu'elles sont "collées", le couvercle est replacé sur la barquette "GEVES" contenant les plantules. Ceci évite une éventuelle consommation des plantules par des limaces qui auraient été déposées à proximité.

Les barquettes sont ensuite placées dans la chambre climatique n°3 (température 16 °C, 80 % d'hygrométrie, 12h jour, 12h nuit) pendant 24 heures.

## 3. Comptage des plantules attaquées

---

24 heures environ après introduction des limaces, on compte pour chacune des 20 barquettes le nombre de plantules attaquées (0; 1 ou 2) de chaque variété sans distinguer l'intensité de l'attaque. L'expérience acquise dans les tests de laboratoire a montré une intensité de consommation variable selon les espèces végétales et même au sein d'une même espèce. Aussi, il a été décidé de

ne pas prendre en compte cette intensité d'attaque pour ne pas complexifier le test. Seul le nombre de plantules attaquées a été pris en compte.

L'observation d'une barquette ne se fait qu'une fois.

Chaque jour, 20 barquettes nouvelles avec limaces sont observées et ceci pendant 12 jours.

## 4. Étude en laboratoire de la sensibilité variétale chez le blé tendre pour l'appétence aux limaces

---

Le nombre total de graines semées par variété est de 480 (2 plantules/variété/barquette x 20 barquettes/jour x 4 jours x 3 semaines).

Par variété (Tableau 1) chaque colonne plantes levées correspond à 20 barquettes : soit si toutes les plantules sont levées, 40 plantules (2 plantules x 20 barquettes).

L'analyse de variance est réalisée sur la variable % plantes attaquées transformées en arcsin ; la transformation change sensiblement le classement des groupes, mais c'est le % moyen de plantes attaquées et non la donnée transformée qui est indiqué dans le tableau 3 d'analyse pour une lecture plus facile. La différence entre les % de plantules attaquées indiqués dans ce tableau d'analyse de variance et le tableau page 27 du % de plantules attaquées par les limaces grises pour les 3 semaines de tests, provient de la différence de calcul suivant :

- pour l'analyse de variance : moyenne des % journaliers
- pour le tableau page 27 : % à partir du rapport des totaux du nombre de plantes attaquées sur le nombre de plantes levées.

La différence des % s'explique par le nombre de plantes levées (dénominateur) qui est variable pour chaque barquette.

Tableau 1 :  
Résultats de comptages de plantes levées et de plantes attaquées par jour (20 barquettes)

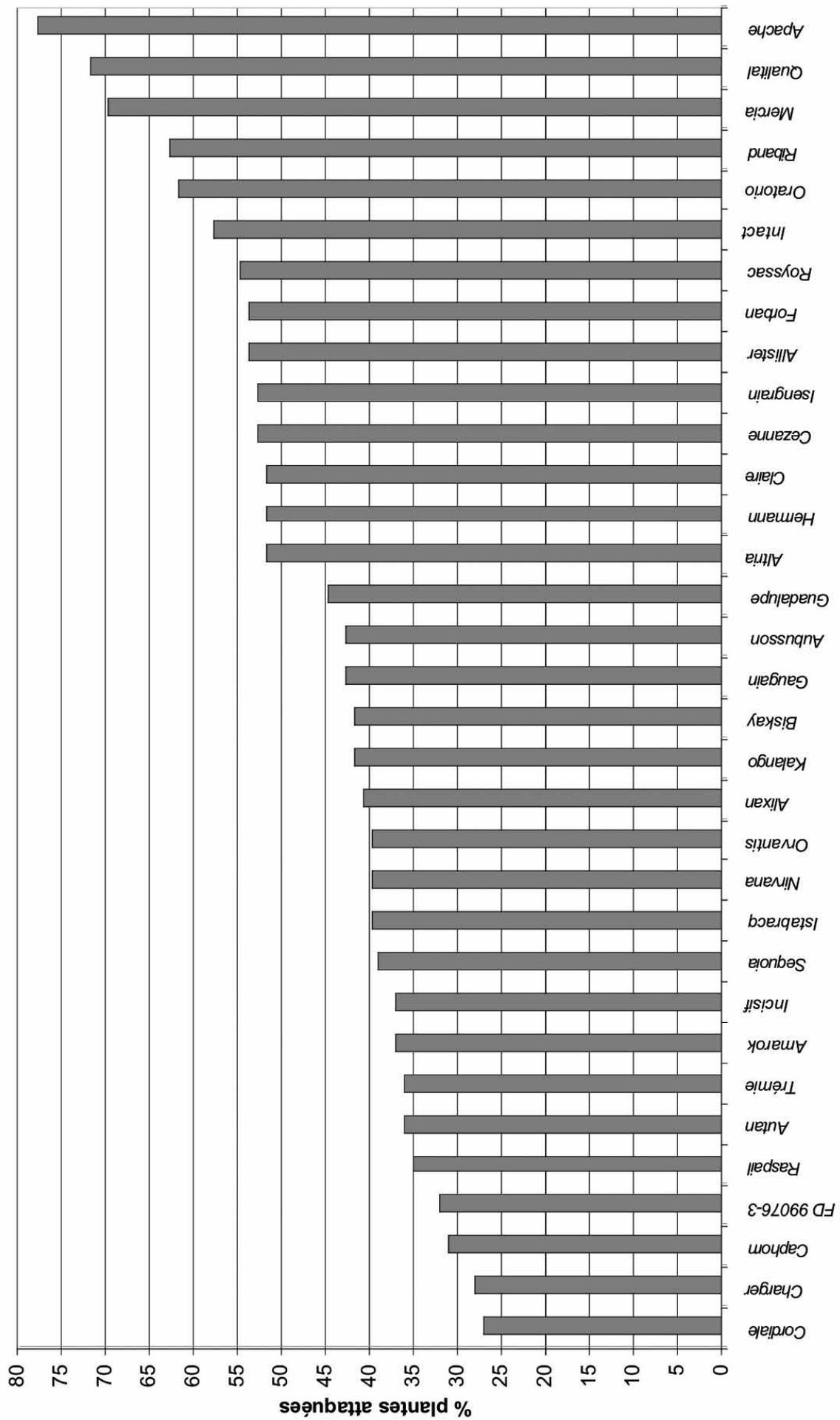
| Variétés et N° | Semaine S   |            |             |            |             |            | Semaine S+1 |            |             |            |             |            | Semaine S+2 |            |             |            |             |            | Total ptes levées | Total ptes atqas | % ptes levées | % ptes atqas |             |            |             |            |             |            |
|----------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------------|------------------|---------------|--------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
|                | Série 1     |            | Série 2     |            | Série 3     |            | Série 4     |            | Série 5     |            | Série 6     |            | Série 7     |            | Série 8     |            | Série 9     |            |                   |                  |               |              | Série 10    |            | Série 11    |            | Série 12    |            |
|                | ptes levées | ptes atqas |                   |                  |               |              | ptes levées | ptes atqas | ptes levées | ptes atqas | ptes levées | ptes atqas |
| Oratorio       | 40          | 27         | 39          | 25         | 40          | 23         | 40          | 28         | 39          | 38         | 27          | 38         | 26          | 40         | 20          | 38         | 17          | 40         | 25                | 40               | 37            | 17           | 469         | 290        | 97.7        | 62         |             |            |
| Altria         | 39          | 16         | 39          | 27         | 39          | 24         | 40          | 23         | 39          | 27         | 39          | 26         | 36          | 20         | 39          | 14         | 39          | 15         | 39                | 21               | 40            | 20           | 468         | 245        | 97.5        | 52         |             |            |
| Autan          | 39          | 15         | 39          | 16         | 38          | 7          | 39          | 7          | 40          | 22         | 39          | 14         | 40          | 21         | 39          | 11         | 39          | 11         | 39                | 18               | 39            | 15           | 466         | 167        | 97.1        | 36         |             |            |
| Kalango        | 37          | 14         | 39          | 21         | 38          | 23         | 40          | 14         | 39          | 20         | 39          | 14         | 36          | 18         | 39          | 8          | 39          | 14         | 40                | 14               | 39            | 17           | 461         | 195        | 96.0        | 42         |             |            |
| Biskay         | 40          | 19         | 40          | 18         | 40          | 17         | 39          | 18         | 40          | 21         | 40          | 15         | 39          | 16         | 39          | 10         | 39          | 15         | 40                | 17               | 40            | 19           | 476         | 202        | 99.2        | 42         |             |            |
| Charger        | 38          | 14         | 39          | 14         | 40          | 15         | 40          | 13         | 40          | 10         | 40          | 9          | 40          | 12         | 40          | 7          | 40          | 6          | 40                | 12               | 40            | 11           | 476         | 133        | 99.2        | 28         |             |            |
| Gaugain        | 40          | 23         | 40          | 27         | 40          | 25         | 40          | 20         | 39          | 18         | 38          | 15         | 40          | 12         | 40          | 10         | 40          | 9          | 40                | 18               | 39            | 12           | 475         | 204        | 99.0        | 43         |             |            |
| Alixan         | 40          | 17         | 40          | 19         | 40          | 21         | 40          | 18         | 40          | 22         | 39          | 16         | 39          | 18         | 40          | 14         | 40          | 11         | 39                | 20               | 39            | 9            | 476         | 197        | 99.2        | 41         |             |            |
| Trémie         | 39          | 12         | 39          | 23         | 39          | 14         | 39          | 16         | 40          | 22         | 40          | 13         | 40          | 17         | 40          | 8          | 39          | 7          | 39                | 13               | 40            | 12           | 473         | 169        | 98.5        | 36         |             |            |
| Aubusson       | 38          | 16         | 38          | 29         | 39          | 17         | 39          | 12         | 39          | 20         | 39          | 14         | 39          | 18         | 38          | 12         | 37          | 11         | 38                | 16               | 37            | 17           | 457         | 198        | 95.2        | 43         |             |            |
| Raspail        | 39          | 10         | 39          | 18         | 39          | 16         | 38          | 13         | 39          | 15         | 40          | 19         | 39          | 13         | 37          | 13         | 39          | 7          | 39                | 10               | 38            | 19           | 463         | 162        | 96.5        | 35         |             |            |
| Riband         | 39          | 23         | 40          | 26         | 39          | 28         | 40          | 28         | 40          | 33         | 33          | 21         | 40          | 30         | 37          | 18         | 39          | 18         | 39                | 22               | 39            | 24           | 464         | 291        | 96.7        | 63         |             |            |
| Hermann        | 40          | 24         | 37          | 20         | 39          | 24         | 40          | 27         | 40          | 25         | 39          | 18         | 38          | 21         | 39          | 12         | 40          | 15         | 40                | 21               | 38            | 18           | 468         | 243        | 97.5        | 52         |             |            |
| Cordiale       | 39          | 12         | 39          | 7          | 40          | 12         | 39          | 14         | 40          | 17         | 40          | 4          | 38          | 13         | 39          | 4          | 39          | 6          | 39                | 11               | 40            | 19           | 472         | 129        | 98.3        | 27         |             |            |
| Cezanne        | 39          | 23         | 40          | 22         | 40          | 23         | 38          | 26         | 40          | 21         | 40          | 23         | 39          | 23         | 39          | 12         | 40          | 16         | 40                | 23               | 38            | 19           | 471         | 248        | 98.1        | 53         |             |            |
| Isabracq       | 38          | 19         | 40          | 21         | 39          | 24         | 40          | 15         | 40          | 22         | 40          | 13         | 40          | 15         | 40          | 11         | 40          | 6          | 40                | 18               | 40            | 15           | 477         | 190        | 99.4        | 40         |             |            |
| Sequoia        | 40          | 16         | 40          | 22         | 40          | 16         | 40          | 14         | 40          | 20         | 39          | 16         | 40          | 14         | 40          | 9          | 39          | 7          | 40                | 23               | 40            | 16           | 476         | 185        | 99.2        | 39         |             |            |
| FD 99076-3     | 40          | 12         | 40          | 18         | 40          | 14         | 40          | 16         | 40          | 14         | 39          | 11         | 39          | 10         | 40          | 10         | 40          | 7          | 40                | 20               | 40            | 7            | 478         | 153        | 99.6        | 32         |             |            |
| Apache         | 40          | 31         | 40          | 37         | 40          | 36         | 40          | 33         | 40          | 35         | 39          | 32         | 40          | 33         | 39          | 26         | 40          | 26         | 40                | 29               | 38            | 22           | 476         | 371        | 99.2        | 78         |             |            |
| Vide 2         | 17          | 8          | 12          | 1          | 12          | 4          | 12          | 4          | 16          | 8          | 8           | 3          | 12          | 6          | 17          | 9          | 17          | 1          | 14                | 7                | 10            | 2            | 157         | 58         | 32.7        | 37         |             |            |
| Amarok         | 39          | 24         | 40          | 21         | 39          | 25         | 39          | 22         | 40          | 26         | 39          | 18         | 40          | 19         | 39          | 23         | 39          | 19         | 40                | 25               | 40            | 16           | 474         | 252        | 98.8        | 53         |             |            |
| Isengrain      | 38          | 25         | 40          | 33         | 39          | 27         | 40          | 27         | 40          | 22         | 40          | 20         | 38          | 16         | 40          | 20         | 40          | 13         | 40                | 25               | 40            | 13           | 474         | 258        | 98.8        | 54         |             |            |
| Allister       | 39          | 25         | 40          | 31         | 39          | 23         | 40          | 31         | 39          | 27         | 40          | 21         | 40          | 21         | 37          | 21         | 40          | 12         | 40                | 23               | 39            | 17           | 473         | 276        | 98.5        | 58         |             |            |
| Inact          | 39          | 24         | 40          | 22         | 40          | 21         | 38          | 22         | 40          | 22         | 40          | 13         | 39          | 22         | 39          | 18         | 39          | 17         | 40                | 20               | 39            | 27           | 473         | 244        | 98.5        | 52         |             |            |
| Claire         | 40          | 19         | 37          | 25         | 39          | 21         | 39          | 24         | 40          | 19         | 40          | 8          | 40          | 12         | 37          | 10         | 38          | 5          | 40                | 18               | 40            | 17           | 470         | 189        | 97.9        | 40         |             |            |
| Nirvana        | 40          | 14         | 40          | 19         | 38          | 14         | 38          | 14         | 37          | 12         | 39          | 7          | 39          | 12         | 37          | 8          | 38          | 7          | 40                | 16               | 39            | 11           | 464         | 145        | 96.7        | 31         |             |            |
| Caphorn        | 40          | 22         | 39          | 21         | 40          | 20         | 40          | 23         | 40          | 21         | 39          | 11         | 40          | 13         | 40          | 10         | 40          | 3          | 39                | 24               | 40            | 13           | 476         | 192        | 99.2        | 40         |             |            |
| Orvantis       | 39          | 34         | 40          | 34         | 40          | 26         | 40          | 26         | 39          | 29         | 40          | 29         | 40          | 32         | 38          | 23         | 40          | 25         | 40                | 36               | 39            | 22           | 474         | 339        | 98.8        | 72         |             |            |
| Vide 1         | 40          | 20         | 40          | 22         | 39          | 17         | 39          | 21         | 40          | 17         | 40          | 3          | 40          | 14         | 34          | 13         | 40          | 6          | 40                | 19               | 39            | 16           | 471         | 176        | 98.1        | 37         |             |            |
| Qualital       | 39          | 20         | 40          | 22         | 40          | 23         | 39          | 21         | 40          | 18         | 40          | 10         | 39          | 12         | 36          | 25         | 39          | 10         | 39                | 23               | 40            | 15           | 468         | 209        | 97.5        | 45         |             |            |
| Incisif        | 39          | 29         | 40          | 26         | 22          | 29         | 40          | 29         | 40          | 32         | 40          | 23         | 40          | 23         | 40          | 28         | 40          | 28         | 40                | 33               | 40            | 21           | 461         | 324        | 96.0        | 70         |             |            |
| Guadalupe      | 40          | 30         | 40          | 22         | 39          | 30         | 37          | 25         | 40          | 26         | 40          | 15         | 38          | 20         | 38          | 21         | 39          | 11         | 40                | 23               | 40            | 15           | 471         | 257        | 98.1        | 55         |             |            |
| Mercia         | 40          | 27         | 40          | 29         | 40          | 29         | 38          | 28         | 39          | 25         | 40          | 14         | 40          | 9          | 39          | 20         | 40          | 16         | 40                | 25               | 40            | 18           | 476         | 255        | 99.2        | 54         |             |            |
| Royssac        | 36          |            |             |            |             |            |             |            |             |            |             |            |             |            |             |            |             |            |                   |                  |               |              |             |            |             |            |             |            |
| Forban         |             |            |             |            |             |            |             |            |             |            |             |            |             |            |             |            |             |            |                   |                  |               |              |             |            |             |            |             |            |
| Azimut         |             |            |             |            |             |            |             |            |             |            |             |            |             |            |             |            |             |            |                   |                  |               |              |             |            |             |            |             |            |

Les colonnes grisées concernent les plantes levées Les lignes grisées plus foncées concernent les lignes vides Série 1 = jour 1

Tableau 2 :  
Résultat d'analyse de variance.

| Libelles   | Moyennes | Groupes homogènes |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
|------------|----------|-------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--|--|--|--|--|--|
|            |          |                   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Apache     | 75       | A                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Quality    | 73       | A                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Mercia     | 71       | A                 | B |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Oratorio   | 65       | A                 | B | C |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Intact     | 58       |                   | B | C | D |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Riband     | 57       |                   | B | C | D | E |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Royssac    | 56       |                   | B | C | D | E | F |   |   |   |   |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Isengrain  | 56       |                   | B | C | D | E | F |   |   |   |   |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Altria     | 55       |                   | B | C | D | E | F | G |   |   |   |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Alister    | 55       |                   | B | C | D | E | F | G |   |   |   |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Forban     | 54       |                   | B | C | D | E | F | G |   |   |   |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Hermann    | 54       |                   | B | C | D | E | F | G |   |   |   |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Cezanne    | 52       |                   |   | C | D | E | F | G | H |   |   |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Clair      | 50       |                   |   | C | D | E | F | G | H | I |   |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Biskay     | 48       |                   |   | C | D | E | F | G | H | I | J |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Aubusson   | 48       |                   |   | C | D | E | F | G | H | I | J |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Gaugain    | 47       |                   |   | C | D | E | F | G | H | I | J |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Orvantis   | 45       |                   |   |   | D | E | F | G | H | I | J |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Guadelupe  | 45       |                   |   |   | D | E | F | G | H | I | J |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Alixan     | 44       |                   |   |   | D | E | F | G | H | I | J |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Amarok     | 42       |                   |   |   | D | E | F | G | H | I | J |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Istabracq  | 41       |                   |   |   | D | E | F | G | H | I | J |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Kalango    | 40       |                   |   |   | D | E | F | G | H | I | J |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Nirvana    | 38       |                   |   |   |   | E | F | G | H | I | J | K |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Incisif    | 37       |                   |   |   |   |   | F | G | H | I | J | K |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Autan      | 37       |                   |   |   |   |   |   | F | G | H | I | J | K |   |  |  |  |  |  |  |
| Sequoia    | 36       |                   |   |   |   |   |   |   | H | I | J | K |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Raspail    | 35       |                   |   |   |   |   |   |   | H | I | J | K |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Trémie     | 33       |                   |   |   |   |   |   |   | H | I | J | K |   |   |  |  |  |  |  |  |
| FD 99076-3 | 32       |                   |   |   |   |   |   |   |   | I | J | K |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Charger    | 31       |                   |   |   |   |   |   |   |   | I | J | K |   |   |  |  |  |  |  |  |
| Caphom     | 28       |                   |   |   |   |   |   |   |   |   | I | J | K |   |  |  |  |  |  |  |
| Cordiale   | 25       |                   |   |   |   |   |   |   |   |   |   | I | J | K |  |  |  |  |  |  |

Tableau 3 :  
 Pourcentage de plantes attaquées sur 3 semaines de test du 15/11/2004 au 3/12/2004.



## 5. Discussion et résultats

Le test d'appétence est réalisé sur 3 semaines du 15/11/2004 au 3/12/2004.

33 variétés de blé tendre d'hiver (BTH) ont été testées en laboratoire pour comparer leur niveau d'appétence vis-à-vis des limaces grises *Deroceras reticulatum*, dans le cadre d'une convention de recherche avec le Fonds de Soutien pour l'Obtention Végétale (FSOV).

33 variétés sont semées dans une même "barquette GEVES" afin de les comparer entre elles, à raison de 2 plantules par variété.

20 barquettes sont observées par jour, soit 40 plantules par variété.

Le test est réalisé sur 12 jours, ce qui représente une observation de 480 plantules par variété, si l'on admet que toutes les graines germées ont levé.

Pour chaque barquette une première observation est réalisée pour le comptage des plantules levées lorsque celles-ci sont au stade 1 - 1.5 feuille (soit environ 5-6 jours après avoir semé les graines prégermées).

Ce comptage permet de ne pas attribuer une plantule manquante au départ, à une attaque de limaces.

Après avoir compté les plantules levées, 10 limaces à jeun depuis 48h sont placées dans la barquette.

24 h après l'introduction des limaces, le nombre de plantules de chaque variété est compté, soit 0 ; 1 ou 2 plantules attaquées.

L'intensité d'attaque sur chaque plantule n'a pas été prise en compte dans cette étude pour limiter la complexité de la notation.

Les variétés de BTH sont semées dans le même ordre pour les 240 barquettes (20 barquettes/jour x 12 jours) de l'essai afin de faciliter grandement l'ensemble des travaux, de

l'expérimentation du semis jusqu'à la notation des plantules et réduire considérablement le temps d'expérimentation.

Nous n'avons aucune crainte dans un choix de consommation biaisé, suite à nos premiers travaux d'appétence réalisés sur des plantes d'interculture en octobre et novembre 2001.

Un test, réalisé le 25/10/2001, montrait, après avoir semé dans une barquette "GEVES" 7 "poquets" de 7 espèces d'intercultures (= 7 graines différentes), que les limaces grises consommaient préférentiellement les mêmes espèces.

Ceci avait conduit à semer pour chaque poquet une seule espèce, pour faciliter grandement l'observation car la distinction des plantules des différentes espèces reste difficile. Nous avons pris une précaution supplémentaire pour cet essai FSOV 2004, de ne pas déposer les limaces toujours près des mêmes variétés ; pour cela les limaces sont placées sur le couvercle de la barquette et l'on attend qu'elles s'y fixent avant de retourner le couvercle sur la barquette.

Il ressort de cette étude, que si toutes les variétés de blé sont consommées, il apparaît des différences assez nettes de consommation entre les 33 variétés de BTH fournies par les obtenteurs GIE Club 5, qui mettent donc en évidence des différences d'appétence entre les variétés.

L'analyse de variance fait ressortir quelques variétés très consommées : "APACHE" 75% de plantules attaquées, "QUALITAL" 73%, "MERCIA" 71% et "ORATORIO" 65%. D'autres variétés sont très peu consommées comme "CORDIALE" avec 25% de plantules attaquées, "CAPHORN" 28%, "CHARGER" 31% et "FD 99076-3" 32%. Les autres variétés sont consommées de 35 à 58%.

Il serait intéressant de vérifier en conditions de plein champ, pour 2 variétés de consommation très différentes observées en laboratoire (comme par exemple "APACHE" et "CORDIALE"), si cette différence d'attaque se vérifie et dans l'affirmative si les niveaux de population peuvent aussi en être modifiés.

## 6. Discussion sur l'analyse du taux de sucre des grains

*(étude complémentaire à la convention).*

Pour essayer d'expliquer cette différence de consommation des plantules selon les variétés et en s'appuyant sur les travaux en Grande Bretagne de K.A.EVANS et A.M.SPAULL 1996, qui avaient montré des corrélations entre le niveau d'attaque des grains et leur teneur en sucres, nous avons réalisé à notre laboratoire de chimie de Boigneville une analyse du taux de sucres sur des grains secs (= non germés) (Tableau 5).

Le laboratoire de chimie de Boigneville a réalisé, à partir d'un échantillon de 25 à 30 grammes de graines de chaque variété, un dosage des sucres simples selon la méthode de Luff-Schoorl ; cette méthode est recommandée par la Communauté européenne dans sa directive 71- 250- CE.

Les teneurs en sucres (sucres simples) obtenus pour nos 33 variétés de BTH varient de 2.14 à 3.57.

Le laboratoire indique que les échantillons ne sont pas significativement différents pour leur teneur en sucres ; la valeur moyenne des sucres pour les céréales à paille est de 2.90, variant de 1.75 (minimum) à 4.60 (maximum).

Pour la valeur de 3, l'écart type de reproductibilité est de 0.49 (2.51 à 3.49).

Le laboratoire ne réalise pas le dosage des sucres en routine, aussi il n'a pas beaucoup de données de fidélité.

La publication de K.A.EVANS et A.M.SPAULL montre, d'après leur travaux en laboratoire, un classement du taux d'attaque des graines selon les variétés.

L'analyse du taux de sucres, sur les grains non germés, met en évidence un taux de sucres élevé pour les grains les plus attaqués. Ainsi la variété "MERCIA", classée à 11 dans l'échelle de dégâts (échelle de 1 (= peu de dégâts) à 12) a un taux de sucres de 6.1. Ces taux très élevés de sucres, > à 4.5, indiqués pour 5 variétés sur 12 par les auteurs, étonne notre laboratoire. La méthode d'analyse par un kit Boehringer-Mannheim, même si elle est moins précise, ne semble pas expliquer ces taux élevés. Il se trouve que la variété "MERCIA" nous a été fournie par le GIE Club 5 le 01/12/2006.

Pour cette étude d'appétence des variétés de "BTH", on constate, comme K.A.EVANS et A.M.SPAULL, une consommation très élevée de cette variété par les limaces grises avec 71% de plantules attaquées (variété "APACHE" la plus attaquée avec 75%). Le taux de sucres est, par contre, plus faible 3.09 (moyenne des 33 variétés 2.88). La différence des résultats entre les travaux anglais et notre laboratoire ne s'explique pas par la méthode d'analyse employée.

Les limaces consomment les plantules et les graines en germination, mais pas les grains secs.

On peut supposer que les sucres se transforment dès la germination et qu'il y a des différences entre les variétés ; l'analyse serait à refaire sur plantules ou graines germées afin de pouvoir statuer sur une relation entre le niveau d'attaque et le taux de sucres.

Le poids de matière sèche de chaque échantillon a été déterminé (MSR Matière Sèche Résiduelle) afin de comparer au mieux les teneurs en sucres des échantillons en s'affranchissant de leur teneur en eau.

Pour les céréales à paille, la MSR est comprise entre 84 et 90.2%.

RÉSULTATS 2004 / 2005

Étude en laboratoire de la sensibilité variétale chez le blé tendre pour l'appétence aux limaces

Analyses de la teneur en sucre par le laboratoire de chimie de BOIGNEVILLE (étude complémentaire à la convention).

| Identifiant | Type              | Echantillon | Code éch. client | N° Ech. | Nom essai | Résultat final | Unité |
|-------------|-------------------|-------------|------------------|---------|-----------|----------------|-------|
| 15249       |                   | 15249-1     | ORATORIO         | 9863    | Sucres    | 2.74           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-1     | ORATORIO         | 9863    | MSR       | 87.53          | %     |
| 15249       |                   | 15249-2     | ALTRA            | 9864    | Sucres    | 3.34           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-2     | ALTRA            | 9864    | MSR       | 87.24          | %     |
| 15249       |                   | 15249-3     | AUTAN            | 9865    | Sucres    | 2.46           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-3     | AUTAN            | 9865    | MSR       | 87.6           | %     |
| 15249       |                   | 15249-4     | KALANGO          | 9866    | Sucres    | 3.26           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-4     | KALANGO          | 9866    | MSR       | 87.48          | %     |
| 15249       |                   | 15249-5     | BISKAY           | 9867    | Sucres    | 2.83           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-5     | BISKAY           | 9867    | MSR       | 87.4           | %     |
| 15249       |                   | 15249-6     | CHARGER          | 9868    | Sucres    | 2.89           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-6     | CHARGER          | 9868    | MSR       | 87.4           | %     |
| 15249       |                   | 15249-7     | GAUGAIN          | 9869    | Sucres    | 3.28           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-7     | GAUGAIN          | 9869    | MSR       | 87.61          | %     |
| 15249       |                   | 15249-8     | ALIXAN           | 9870    | Sucres    | 2.67           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-8     | ALIXAN           | 9870    | MSR       | 87.58          | %     |
| 15249       | Appétence limaces | 15249-9     | TREMIE           | 9871    | Sucres    | 3.01           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-9     | TREMIE           | 9871    | MSR       | 87.42          | %     |
| 15249       |                   | 15249-10    | AUBUSSON         | 9872    | Sucres    | 2.69           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-10    | AUBUSSON         | 9872    | MSR       | 87.47          | %     |
| 15249       |                   | 15249-11    | RASPAIL          | 9873    | Sucres    | 3.44           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-11    | RASPAIL          | 9873    | MSR       | 87.59          | %     |
| 15249       |                   | 15249-12    | RIBAND           | 9874    | Sucres    | 2.63           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-12    | RIBAND           | 9874    | MSR       | 87.6           | %     |
| 15249       |                   | 15249-13    | HERMANN          | 9875    | Sucres    | 3.17           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-13    | HERMANN          | 9875    | MSR       | 87.7           | %     |
| 15249       |                   | 15249-14    | CORDIALE         | 9876    | Sucres    | 2.19           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-14    | CORDIALE         | 9876    | MSR       | 87.59          | %     |
| 15249       |                   | 15249-15    | CEZANNE          | 9877    | Sucres    | 2.68           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-15    | CEZANNE          | 9877    | MSR       | 87.57          | %     |
| 15249       |                   | 15249-16    | ISTABRACQ        | 9878    | Sucres    | 2.63           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-16    | AUBUSSON         | 9878    | MSR       | 87.29          | %     |
| 15249       |                   | 15249-17    | SEQUOIA          | 9879    | Sucres    | 2.81           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-17    | SEQUOIA          | 9879    | MSR       | 87.25          | %     |

| Identifiant | Type              | Echantillon | Code éch. client | N° Ech. | Nom essai | Résultat final | Unité |
|-------------|-------------------|-------------|------------------|---------|-----------|----------------|-------|
| 15249       |                   | 15249-18    | FD99076-3        | 9880    | Sucres    | 2.85           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-18    | FD99076-3        | 9880    | MSR       | 87.3           | %     |
| 15249       |                   | 15249-19    | APACHE           | 9881    | Sucres    | 2.57           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-19    | APACHE           | 9881    | MSR       | 87.59          | %     |
| 15249       |                   | 15249-20    | AMAROK           | 9882    | Sucres    | 2.57           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-20    | AMAROK           | 9882    | MSR       | 87.82          | %     |
| 15249       |                   | 15249-21    | ISENGRAIN        | 9883    | Sucres    | 3.07           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-21    | ISENGRAIN        | 9883    | MSR       | 87.5           | %     |
| 15249       |                   | 15249-22    | ALLISTER         | 9884    | Sucres    | 3.43           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-22    | ALLISTER         | 9884    | MSR       | 87.97          | %     |
| 15249       |                   | 15249-23    | INTACT           | 9885    | Sucres    | 2.79           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-23    | INTACT           | 9885    | MSR       | 87.68          | %     |
| 15249       |                   | 15249-24    | CLAIRE           | 9886    | Sucres    | 2.9            | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-24    | CLAIRE           | 9886    | MSR       | 87.52          | %     |
| 15249       |                   | 15249-25    | NIRVANA          | 9887    | Sucres    | 2.35           | %MS   |
| 15249       | Appétence limaces | 15249-25    | NIRVANA          | 9887    | MSR       | 87.5           | %     |
| 15249       |                   | 15249-26    | CAPHORN          | 9888    | Sucres    | 3.12           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-26    | CAPHORN          | 9888    | MSR       | 87.82          | %     |
| 15249       |                   | 15249-27    | ORVANTIS         | 9889    | Sucres    | 2.57           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-27    | ORVANTIS         | 9889    | MSR       | 87.88          | %     |
| 15249       |                   | 15249-28    | QUALITAL         | 9890    | Sucres    | 2.14           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-28    | QUALITAL         | 9890    | MSR       | 87.47          | %     |
| 15249       |                   | 15249-29    | INCISIF          | 9891    | Sucres    | 2.68           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-29    | INCISIF          | 9891    | MSR       | 87.76          | %     |
| 15249       |                   | 15249-30    | GUADALUPE        | 9892    | Sucres    | 3.57           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-30    | GUADALUPE        | 9892    | MSR       | 87.6           | %     |
| 15249       |                   | 15249-31    | MERCIA           | 9893    | Sucres    | 3.09           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-31    | MERCIA           | 9893    | MSR       | 87.1           | %     |
| 15249       |                   | 15249-32    | ROYSSAC          | 9894    | Sucres    | 3.39           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-32    | ROYSSAC          | 9894    | MSR       | 87.73          | %     |
| 15249       |                   | 15249-33    | FORBAN           | 9895    | Sucres    | 3.12           | %MS   |
| 15249       |                   | 15249-33    | FORBAN           | 9895    | MSR       | 87.67          | %     |

Tableau 5 :  
Taux de sucres des grains secs



# Unravelling and exploitation of diversity for resistance to *Mycosphaerella graminicola* and *Fusarium graminearum* in wheat and its progenitors

Seyed Mahmod Tabib GHAFFARY<sup>2</sup>, Valérie LAURENT<sup>1</sup>, Laurent GUERREIRO<sup>3</sup>, Yann FLODROPS<sup>3</sup>, Theo VAN DER LEE<sup>2</sup>, Gert H.J. KEMA<sup>2</sup>, Thierry DEMARQUET<sup>1</sup>, Sébastien CUVELIERS<sup>1</sup>, Olivier ROBERT<sup>\*1</sup>

\* Coordinateur : Olivier ROBERT, olivier.robert@florimond-desprez.fr, Tél. : 03 20 84 94 90

1 - BIOPLANTE - 60 rue Léon Beauchamp, 59930 La Chapelle d'Armentières

2 - PLANT RESEARCH INTERNATIONAL B.V. - P.O. Box16, 6700 AA Wageningen, The Netherlands

3 - ARVALIS - Institut du végétal - 3 rue J.&M. Hackin, 75116 Paris

## Résumé

La fusariose et la septoriose sont deux maladies très dommageables (chute de rendement, toxicité) pour le blé. Il est important d'identifier de nouvelles sources de résistance efficaces contre des isolats de septoriose très virulents et contre la fusariose *Fusarium graminearum* (majoritairement présente en France). Ainsi, ce projet nous a permis d'identifier de nouvelles sources de résistance à la fusariose et à la septoriose. Parmi celles-ci, les plus intéressantes ont été retenues pour être les parents de nouvelles populations (HD) d'étude.

Parallèlement, une population de 235 lignées HD Apache/Balance (ApBa) a été étudiée pour identifier des QTL de résistance à la fusariose qui offrent la possibilité au sélectionneur d'identifier plus efficacement, dans leur matériel, les caractères de résistance issus d'Apache.

## Identification des nouvelles sources de résistance à la fusariose et à la septoriose.

### Fusariose

Les tests de résistance à la fusariose ont été menés sur une soixantaine de lignées avec 3 méthodes d'inoculation sur 3 ans. L'inoculation par cannes de maïs en périmètre irrigué avait pour objectif de reproduire les conditions naturelles présentes chez l'agriculteur, mais avec des conditions très favorables au développement du champignon. L'inoculation par pulvérisation de spores de *F. graminearum* a permis d'évaluer la résistance du matériel avec une pression parasitaire maximale. La méthode (spot) par injection de spores dans les épillets a permis d'observer la résistance à la propagation du champignon dans l'épi (résistance de type II). La teneur en DON a également été mesurée dans le grain des lignées.

Des lignées comme 04CYBHFU12, 04CYBHFU17, C10SRN165, C10SRN104, C10SRN215, C10SRN108, C10SRN315, A39.9.2.1, IFA.136.6.1.1, 20828 se sont révélées avoir un excellent niveau de résistance à la fusariose, avec très peu de symptômes (quelle que soit la méthode d'inoculation et avec de faibles teneurs en DON dans le grain).

### Septoriose

Les tests de résistance au stade adulte ont été menés sur deux lieux avec un ou 2 isolats de *M. graminicola* différents (IPO232 et IPO98047) selon les années. Le matériel a également été testé au stade jeune plante avec 31 isolats choisis pour maximiser les virulences. Ces isolats ont été prélevés dans plusieurs lieux de l'Hexagone.

Nous avons identifié les lignées (FD02112 et FHD2054.3) les plus résistantes au stade jeune plante ainsi que les lignées (Bio719, Bio5019) avec un excellent niveau de résistance à la septoriose au champ. Ce matériel a également été testé pour vérifier l'absence de gènes majeurs connus par marquage moléculaire et comparaison avec une gamme d'hôtes différentiels.

### Production à partir des sources de résistances de 30 nouvelles populations HD d'étude

A partir des résultats obtenus sur la fusariose et la septoriose, le développement de 30 populations HD a été initiée et quatre sont maintenant obtenues (FD12/SE11, Mercato/Bio2000, Robigus/Soissons et Chine 94.4/Guadalupe). Les 3 premières présentent un intérêt pour l'étude de la résistance à la septoriose, alors que la dernière a été développée pour l'étude de la résistance à la fusariose. Les autres populations, en cours d'obtention, ont des géniteurs comme 04CYBHFU12, A39.9.2.1...

### Étude la résistance de la population

#### HD Apache/Balance (ApBa) et identification de QTL

Les 235 lignées HD qui composent la population ApBa ont été testées au champ avec des inoculations par pulvérisation et injection de spores de *F. graminearum* durant les 3 ans du projet.

Un travail de cartographie a été effectué avec 231 marqueurs DArT et 184 marqueurs SSR afin de détecter des QTL de résistance. Cinq QTL ont été identifiés sur les chromosomes 2D, 3B, 4D, 7A et 7B. Le QTL identifié sur le chromosome 4D colocalise avec le gène *Rht2* (présent chez Balance) confirmant l'effet négatif de ce gène de nanisme sur la résistance à la fusariose.

## 1. Introduction

*Septoria tritici* blotch (STB) and *Fusarium* head blight (FHB) are major threats to European wheat production. STB is caused by the ascomycete *Mycosphaerella graminicola* and is one of the most devastating diseases in wheat throughout Europe. Initial inoculum usually originates from airborne ascospores that infect newly sown wheat crops from autumn until spring, depending on the weather conditions. Although, it was found that ascospores can be produced year-round, observations and simulations (Hunter et al., 1999; Kema et al. 1996; Eriksen et al., 2001) indicate that the asexual splash dispersed pycnidiospores are the major drivers of the epidemic development in the growing season. *M. graminicola* on wheat can be controlled by protective fungicides. It is estimated that approximately 600M€ are spent on fungicide input to control this disease in Western Europe annually. Significantly increased costs of disease management, environmental pollution and the evolution of fungicide resistant strains are major negative aspect of fungicide applications (Fisher and Griffing, 1984; Felsentein, 1999). *M. graminicola* has a heterothallic bipolar mating system, which is equivalent with out breeding in plants, resulting in extremely diverse pathogen populations that are responsible for the aforementioned observations (Kema et al., 1996).

Resistance breeding is an important alternative and hence resistance genes will have to be available for commercial breeding programs. The interaction between wheat and *M. graminicola* was studied in a complementary genetic study of host resistance and pathogen avirulence, leading to a formal conclusion that both organisms interact in a gene-for-gene manner (Brading et al., 2002). In recent years 15 major genes for resistance to *M. graminicola*, *stb1* – *stb15*, have been identified based on interactions between wheat cultivars and *M. graminicola* isolates (Somasco et al., 1996; Arraiano et al., 2001; Brading et al., 2002; Adhikari et al., 2003; McCartney et al., 2003; Adhikari et al., 2004a,b,c; Chartrain, 2004; Chartrain et al., 2005a,b; Arraiano et al., 2007). This gene pool, however, is too narrow and many of these genes have only partial functionality to the natural populations in Europe. Thus new sources of resistance need to be identified and characterized in order to support resistance breeding.

FHB or scab is caused by a suite of *Fusarium* fungi, with *Fusarium graminearum* as a major representative. FHB is a devastating disease in humid and semi humid areas worldwide (Bai and Shaner, 1994). The pathogen is capable to infect wheat and other small grain cereals like barley, rice, oat and maize (Goswami et al., 2004). This destructive disease has the capacity to destroy a potentially high-yielding crop within a few weeks (McMullen et al., 1997). Direct and secondary economic losses due to FHB for all crops in the central and Northern great plains in the United States were estimated to be 2.7 billion\$ from 1998 to 2000 alone (Nganje et al., 2002). Moreover, accumulation of mycotoxins, especially deoxinonvalenol (DON), in the infected grain can significantly reduce food quality and feed safety (McMullen et al., 1997; Bennett and Klich, 2003). DON also was reported as a virulence factor to aid colonization of the pathogen in the host (Jansen et al., 2005; Desjardins et al., 1996).

The principal mode of fungal spread in wheat from floret to floret inside the spikelet and from spikelet to spikelet is through the vascular bundles in the rachis and rachilla (Ribichich et al., 2000). The fungus may not be able to move into rachis in the absence of DON because strong cell wall

fortifications may develop in rachis nodes (Jansen et al., 2005). Collectively, resistance to FBH is controlled by one or few major genes and several minor genes (Bai et al., 1999; Waldron et al., 1999). Fungicide treatments and agronomical management only reduce the yield damage to some extent, but cannot prevent quality reduction (Mielke, 1988; Teich, 1989; Milus and Parsone, 1994; Jiang et al., 2007). Hence, the development of resistant cultivars is the most effective approach to control FHB. Resistance mechanisms to FHB in wheat were classified as either passive or active (Mesterhazy, 1995). Passive mechanisms are associated with phenotypic traits such as plant height, presence of awns, spikelet density and time of flowering. Active mechanisms includes five different components; (i) Type I resistance to initial infection, (ii) Type II resistance to spread of infection, (iii) Type III resistance to kernel infection, (iv) Type IV characterizes tolerance and (v) Type V resistance to mycotoxins accumulation

Despite the wide genetic variation for resistance to STB and FHB in wheat and its progenitors, the number of genes that has been characterized and mapped is limited. Hence, a few major sources of resistance are intensively deployed by breeders. This project aims at unlocking the vast genetic variation for resistance to STB and FHB in synthetic wheat hexaploids (derivatives) and under evaluated wheat cultivars, which reduces the vulnerability of wheat to these diseases.

The specific objectives of this project are: (i) Identify and characterize new resistance genes to *M. graminicola* and *F. graminearum*; (ii) Determine the map positions of these new resistance genes; and (iii) Develop molecular markers for these genes, aiming at molecularly assisted breeding to effectively improve resistance levels STB and FHB.

## 2. Septoria in France

France is a major wheat producer in Western Europe, contributes with 6% to the total global production and has STB as the major threat to its national production. As stated above resistant cultivars provide the most environmentally sound and sustainable approach to control STB. Fifteen resistant genes to STB have been identified but this is truly scarce compared to the characterized 38 genes for stem rust resistance, 34 genes for stripe rust resistance, 52 genes for leaf rust resistance and 32 genes for powdery mildew resistance. Hence this project calls for a comprehensive explorative approach to find new genes for resistance to STB. Existence of differential series and molecular markers for stem, leaf and stripe rust as well as powdery mildew facilitate gene postulation to identify new resistant genes among the wheat cultivars. However, gene postulation for STB is only in its infancy. According to the gene – for – gene model in the wheat – STB interaction, resistance is expressed when the host and pathogen have matching resistance and avirulence genes (Brading et al., 2002). One of the first required studies, therefore, is to describe the virulence spectrum of the French *M. graminicola* population in order to determine the utility of the *Stb* genes in a French context.

### ► Material and Methods

#### *Pathogen isolates*

We collected single pycnidium isolates from leaves that were hierarchically sampled from five locations in France (Villaines la Gonais, St. Pol de Léon, Cappelle en Pévèle, Beauce and Aire d'Havrincourt), and included for comparison two Dutch tester isolates, IPO323 and IPO94269.

### Plant materials

Thirteen wheat cultivars comprising 11 cultivars that carry different *Stb* genes and two checks were tested. Ten seeds per pot were linearly sown in 5 by 5 cm plastic pot with a steamed sterilized peat/sand mixture. Plants were grown in a controlled greenhouse chamber with similar pre/post inoculation conditions with day length 16 hour /days. Pre/post inoculation temperature and related humidity (RH) conditions were 18/16 °C (day/night rhythm) and 70 % RH, and 22/21 °C and ≥ 85 % RH, respectively.

### Inoculum preparation, inoculation and data collection

Fifty ml yeast-glucose liquid medium (30gr Glucose, 10 gr yeast per 1 liter of demineralised water) was prepared in 100 ml Erlenmeyer flasks that were individually inoculated with the abovementioned isolates and were subsequently incubated in a shaker with 125 RPM and 18 °C for 5-6 days. Spores concentration were determined using a coulter counter and was adjusted to a 10<sup>7</sup> spores/ml in a total volume of 30 ml supplemented by two drops of Tween 20 for inoculation. Plants were inoculated 7-10 days after sowing on the first leaf appearance, using a turntable, adjusted at 13.5 rpm, in a closed inoculation cabinet equipped with interchangeable atomizer and a water cleaning device to avoid contamination. Incubation was conducted under polyethylene covered aluminum frames in transparent plastic bag for every isolate, providing suitable leaf wetness for 48 h at a light intensity of approximately 3μE sec<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>. Newly emerged second and topper leaves were clipped 10-14 days after inoculation in order to facilitate light penetration to primary leaves and disease assessment.

Disease severity was evaluated 21 days after inoculation by scoring, the percentage of necrosis (N) and pycnidia (P), estimated as percentage of the total primary leaf area.

### Design and data analysis

An alpha lattice layout with three replications was used to accommodate all replications over time. All collected

percentage data were transformed according to an empirical logistic model. Subsequently a weighted mixed model REML analysis was performed assuming that variation among and within individual trays in an experiment is normally distributed with zero means and variances.

### ► Results

The symptom development in all experiments was excellent and we used percentage of pycnidia as the evaluation criterion. Statistical analysis showed a highly significant interaction component, indicating strong genetic differences between the tested cultivars and isolates (data not shown).

Table 1 provides a summary of the data. Clearly, none of the *Stb* gene cultivars is effective to all French isolates. Some genes such as *Stb9* are largely ineffective, whereas *Stb5* is resistant to the majority of the French *M.graminicola* isolates. We also observed a range of specific resistances such as for cvs. Estanzuela Federal (*Stb7*), M6 synthetic (w7984) (*Stb8*). The most virulent isolates that circumvent the majority of *Stb* resistance genes are isolates IPO323, IPO98022, IPO98046, IPO98047 and IPO98094.

### ► Discussion

Our current data accord with previous data that *M.graminicola* interacts in a gene-for-gene manner with its host. This implies that testing with natural populations or isolate mixtures will not reveal the potential resistance phenotypes breeders are looking for. Hence, experiments with individual isolates will provide more insight in differences in resistance and possibly in stability of resistance. Breeding for resistance to STB is a major endeavor, which requires continuous phytopathological support.

Not in the last place to select the relevant isolates for screening breeding material. We have identified isolates that are highly valuable for discriminative testing of breeder's germplasm. In addition we suggest to screen with an

|                      |                                    | <i>M. graminicola</i> isolates |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
|----------------------|------------------------------------|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
|                      |                                    | 1                              | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    | 13    | 14    | 15    | 16    | 17    | 18    | 19    | 20    | 21    | 22    | 23    | 24    | 25    | 26    | 27    | 28    | 29    | 30    |  |
| Wheat cultivar       | Stb Gene                           | 323                            | 94269 | 98001 | 98021 | 98022 | 98028 | 98031 | 98032 | 98033 | 98034 | 98035 | 98038 | 98042 | 98046 | 98047 | 98050 | 98051 | 98057 | 98072 | 98075 | 98078 | 98094 | 98097 | 98099 | 98113 | 99018 | 99031 | 99032 | 99038 | 99048 |  |
| Bulgaria             | Stb1, 5BL, stb6                    |                                |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 37    | 0     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
| Veranopolis          | Stb2, 3Bs stb11, Stb6              |                                |       | 0     | 0     | 26    |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 0     |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 0     |       |       |       | 0     |  |
| Israel 493           | Stb3, 7As, Stb6                    |                                |       | 0     | 0     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 0     |  |
| Tadinia              | Stb4, 7Ds, Stb6                    | 0                              |       | 0     | 0     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 34    |       |       |       |       |       | 0     |  |
| CS/synthetic (6x)    | Stb5, 7Ds                          |                                |       | 0     | 0     |       |       |       |       |       |       | 0     |       |       | 13    |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 0     |       |       | 0     |  |
| Shafir               | Stb6, 3As                          |                                |       | 0     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 54    |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 0     |  |
| Estanzuela Federal   | Stb7, 4AL                          |                                |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
| M6 Synthetic (w7984) | Stb8, 7BL                          |                                |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
| Courtot              | Stb9, 2B                           | 81                             |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |  |
| Kavkaz - K4500       | Stb6(3As), 7(4AL), 10(1D), 12(4AL) |                                |       | 0     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 31    | 0     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 0     |  |
| TE9111               | Stb11, 1Bs, stb7                   | 0                              |       |       | 0     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 0     |  |

0 = No pycnidia    ■ P% < 20    ■ 20 < P% < 40    ■ P% > 40

Table 1: Responses of differential cultivars with mapped *Stb* genes to 30 *M. graminicola* isolates.

allopatric isolate set comprising isolates from Algeria, Canada, Ethiopia, Iran, Mexico, Peru, Portugal, Syria, Turkey, Uruguay and USA to test the stability of resistance.

When breeding material is selected for resistance to diseases such as STB, it is generally assumed that good sources of resistance with very different pedigree have different resistance gene. Breeders often seek to combine several such genes in new cultivars to reduce the rate of evolution of the pathogen population to virulence. This approach is termed gene stacking or gene pyramiding. If, however, one major resistance gene is present in a large proportion of the available breeding material, breeders may repeatedly select this gene in their material. We have used the collected information for the analyses of previous data sets and determined that the *Stb4* pattern is predominantly present in French germplasm, which was confirmed by *Stb4* specific PCR markers based on the SSR marker *Xgwm111* (Adhikari et al., 2004) (not shown).

The current data clearly show that seedling experiments are ideal for the evaluation of genetic variation in the pathogen population and as such they are very helpful in the selection of the appropriate isolates for resistance evaluation. We recommend using individual isolates instead of bulks for field screening to test for specificity and complementarity in the adult plant stage.

Finally, these data clearly indicate the necessity of exploring new sources of resistance as the majority of the characterized *Stb* genes are not effective to the majority of French *M.graminicola* strains although marker assisted pyramiding may result in some effective combinations of *Stb* genes.

### 3. Identification QTLs for resistance to *Fusarium graminearum* in the Apache/Balance mapping population

#### ► Material and Methods

##### *Plant materials and (QTL) mapping*

In order to obtain phenotypic data for the QTL analysis, we obtained a 235 double haploid lines population produced from the cross between the French bread wheat cultivars Apache and Balance that were tested during several years in the field (Table II). DNA samples of the population were sent to DArT Pty in Australia for genotyping. We subsequently used QTL version 5.0 (Van Ooijen and Jansen, 2007a,b) for QTL mapping.

| Year | Location          | Spray inoculation                               | Spot inoculation                             |
|------|-------------------|---|--|
| 2005 | Serasem           | 235 lines in 1 replication                      |  |
| 2006 | Serasem           | 235 lines in 1 replication + 5 plots per parent |  |
| 2006 | Florimond Desprez |   | 233 lines 1 replication + 9 plots per parent |
| 2007 | Florimond Desprez |   | 92 lines in 1 replication                    |

Table II: Locations for the DH Apache/Balance in the field during several years.

##### *Inoculum preparation and inoculation methods*

Inoculum was prepared from 40 grams Mung beans that were added to one liter boiling demineralized water until the first seed coats loosened. Then 500 ml was immediately filtered through cheese cloth in 1 liter Erlenmeyer flask, which was subsequently autoclaved for 20 min. at 121 °C. This Mung bean medium was inoculated with a Mung bean pre-culture of *F. graminearum* isolate Fg820. The inoculated flasks were incubated at 26-27 °C in a reciprocal shaker

adjusted at 150 rpm for three days. The inoculum (105 conidia/ml) was applied in two ways: (i) spray inoculation by atomizing a fine mist of inoculum over entire plots and (ii) spot inoculation by placing a piece of soaked inoculated cotton in the florets of individual spikelets of a wheat head (Figures. 2 and 3).

##### *Data collection and statistical analyses*

FHB symptoms were visually evaluated three weeks after spot inoculations by recording the total number of spikelets and the number of infected spikelets per spike (Figure 4). Evaluation of spray inoculation was recorded in four categories:

- (i) 350 Gs, the percentage of infected spikes per plot at 350 degree days after flowering (3 weeks),
- (ii) 350 GST, the percentage of infected spikelets per spike at 350 degree days after flowering (3 weeks),
- (iii) 450 Gs, the percentage of infected spikes per plot at 450 degree days after flowering (4 weeks)
- (iv) 450 GST, the percentage of infected spikelets per spikes at 450 degree days after flowering (4 weeks).

Preliminary data analyses were performed using a generalized linear model (GLM) procedure, which was complicated by the fact that in 2005/6 only one replication was investigated. A final analysis will take the most comparable data set (450 GST) over all years for a multiple year analysis.

Finally quantitative PCR (Waalwijk et al., 2004) was performed on material that was collected six weeks after inoculation to study the correlation between FHB symptom expression and fungal biomass as well as DON content in the harvested grain (not yet determined). The sampling in spot and spray inoculated plots was different. In spot inoculated plots 10 labeled spikes were harvested. For the parents a total of 180 spikes were harvested. In spray inoculated plots, 10 spikes were randomly collected. All samples were transferred to Plant Research International (PRI) and stored at -20 °C in a freezer.

Genomic DNA was isolated from 50 mg powder using the PROMEGA KIT protocol (Wizard Magnetic DNA Purification System for Food) in three technical replications per sample. The DNA quality and quantity were evaluated in 1 % agarose gels. Several dilution series were run to optimize the quantitative PCR procedure.

##### *Mapping and QTL analyses*

A genetic linkage map of the Apache/Balance population was constructed using 231 DArT and 169 SSR markers on a subset of 92 DH lines using Joinmap version 4.0 (Van Ooijen and Jansen, 2007) with the Kosambi mapping function. A minimum logarithm of odds (LOD) threshold of 3 was used to determine linkage groups. In addition, a separate map for each chromosome was constructed using a minimum LOD threshold of 2, similar to reported marker positions for DArT and the Grain gene database and at the Génoplante-INRA websites.

For resistance Type I (spray inoculation) phenotypic data obtained in 2005 and 2006 as the proportion of infected spikes per plot at three weeks (350 GS) and four weeks (450 Gs) after inoculation were analyzed. For resistance Type II (spot inoculation), the number of symptomatic spikelets (NSS) in 2006 and 2007, as well as the number of completely (NCSS) and the number of partially symptomatic spikelets (NPSS) were used for QTL analysis, using MQM (1000 permutation, LOD thresholds were set to declare significant QTL).

## ► Results

### Spot and spray inoculations

The analyses of the Type I data (Table III) resulted in eight significantly different groups ( $P=0.05$ ) of DH lines with predicted values (PV) ranging from 0.2496 to 0.8502. The difference between Apache and Balance was not significant, but there was substantial transgressive segregation.

| Score                                | Variable  | df  | Deviance | Mean deviance | Deviance ratio |
|--------------------------------------|-----------|-----|----------|---------------|----------------|
| Data<br>(7-7-2005<br>450 Gs<br>2006) | Year      | 1   | 7.3      | 7.3           | 36.17 ***      |
|                                      | DH Line   | 237 | 223.3    | 0.9           | 4.68 **        |
|                                      | Year.line | 236 | 169.5    | 0.7           | 3.57 **        |
|                                      | Residual  | 13  | 2.6      | 0.2           |                |

Table III: GLM analysis of spray inoculation of the Apache/ Balance DH population (2005 and 2006 data collected at Serasem).

All factors in the analysis of the spot inoculation (Table IV) showed strong significances. Thus the day of inoculation and the year of inoculation had a significant effect on the expression of resistance in the individual DH lines. As the day of inoculation had such a strong effect on the expression of resistance we transformed the PV to adjusted predicted value (APV) using the date of inoculation as a co-factor in the analysis. The DH lines APVs ranged from 0.0576 to 0.8010 and were separated in 31 homogeneous significantly different groups ( $P<0.05$ ). The APVs (based on nine replications) of Apache and Balance were significantly different at the  $P=0.01$  level indicating that Balance is more susceptible than Apache for Type II resistance (see also Figure 1).

| Apache/Balance DH Lines 2006 <sup>1</sup> |      |               |                | Common Apache/Balance DH Lines in 2006 and 2007 |      |       |         |           |
|---|------|---------------|----------------|---|------|-------|---------|-----------|
| Variables                                 | d.f. | Mean deviance | Deviance ratio | Fixed term                                      | d.f. | Wald  | Wald/df | Chi-value |
| Inoculation day                           | 4    | 75.6          | 24.30***       | Year  | 1    | 91.0  | 91.0    | <0.001    |
| DH Lines                                  | 246  | 9.0           | 2.90***        | DH Line   | 91   | 354.7 | 3.9     | <0.001    |
| Residual                                  | 2249 | 3.1           |                | Year Line                                       | 91   | 160.1 | 1.8     | <0.001    |

<sup>1</sup>Four DH lines were removed from the analysis.

Table IV. Type II GLM analysis of the Apache/Balance DH population (collected at Florimond Desprez in 2006 and 2007).

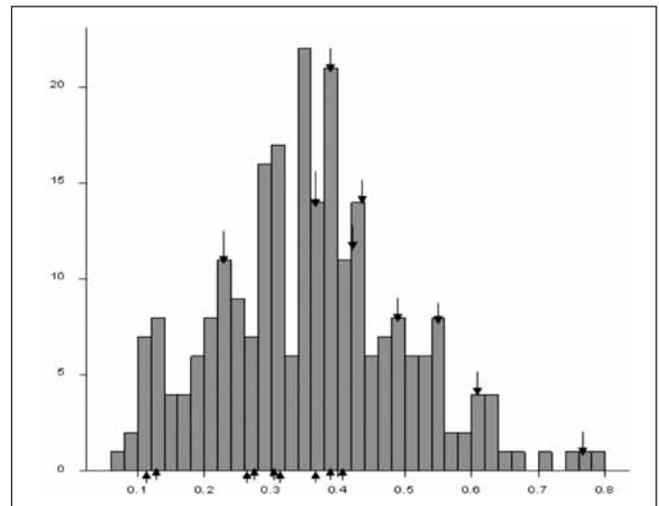


Figure 1: Histogram of distribution of APV in Apache/ Balance DH mapping population for Type II spot inoculation in 2006. Nine replicated parents indicated by top arrows for cv. Balance and bottom arrows for cv. Apache.

### TaqMan Analysis

#### 1. Parents spot inoculation

The average *F. graminearum* biomass in Apache was 3449 pg DNA/mg dried tissue and for Balance 5448 pg DNA/mg dried tissue based, which was significantly different (based on three replications,  $t = 3.9$ , d.f. = 459.38 corrected for not equal variance using Levene's test,  $p < 0.001$ ). The Pearson coefficient of correlation showed a positive significant relationship between *F. graminearum* biomass and APV at 0.05 probability.

#### 2. Parents spray inoculation

The average of *F. graminearum* biomass in cv. Apache was 2793 pg DNA/mg dried tissue and in cv. Balance it was 893 pg DNA/mg dried tissue, which is significantly different at the  $P=0.01$  level ( $t = 4.27$ , d.f. = 17.3 corrected for not equal variance using Levene's test,  $p < 0.001$ ). The Pearson correlation coefficient showed that Fusarium biomass and spray scoring criteria were not significantly correlated.

### Mapping analysis

The Apache/Balance DARt map resulted in 318 placed DARt markers (Figure 2).

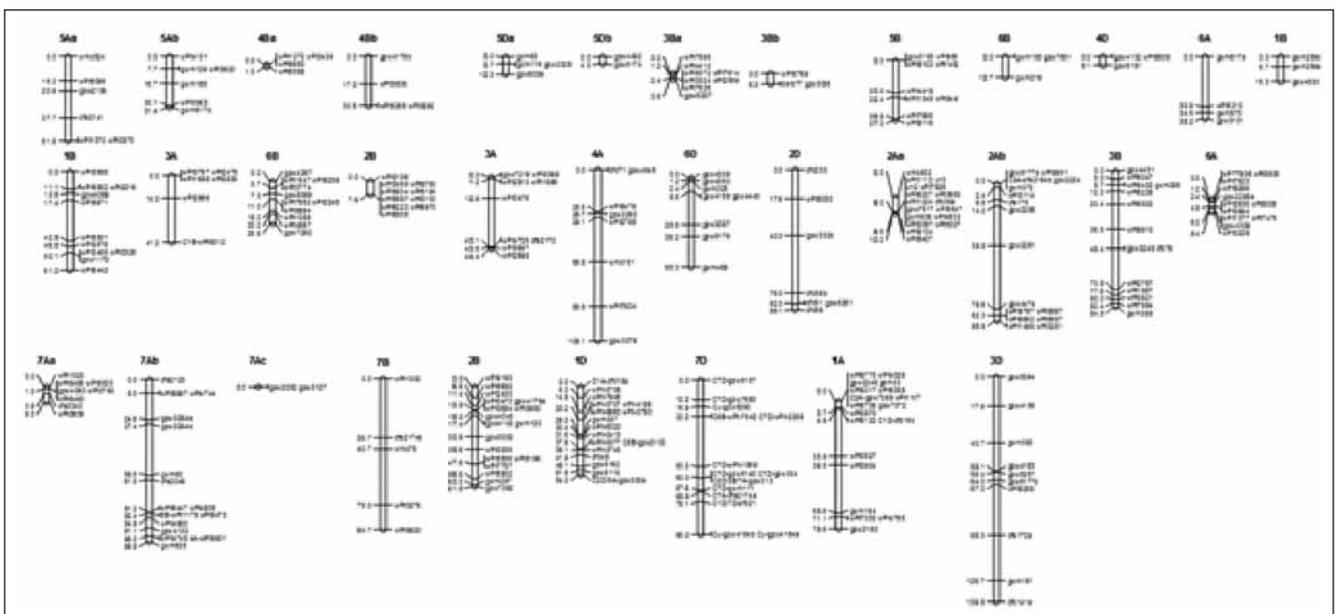


Figure 2: Apache/Balance map.

### QTL analysis

We used the collected data to map QTLs for FHB Type I and Type II resistance in the Apache/Balance mapping population (Figure 3), using the individual DArT and SSR marker maps for each chromosome.

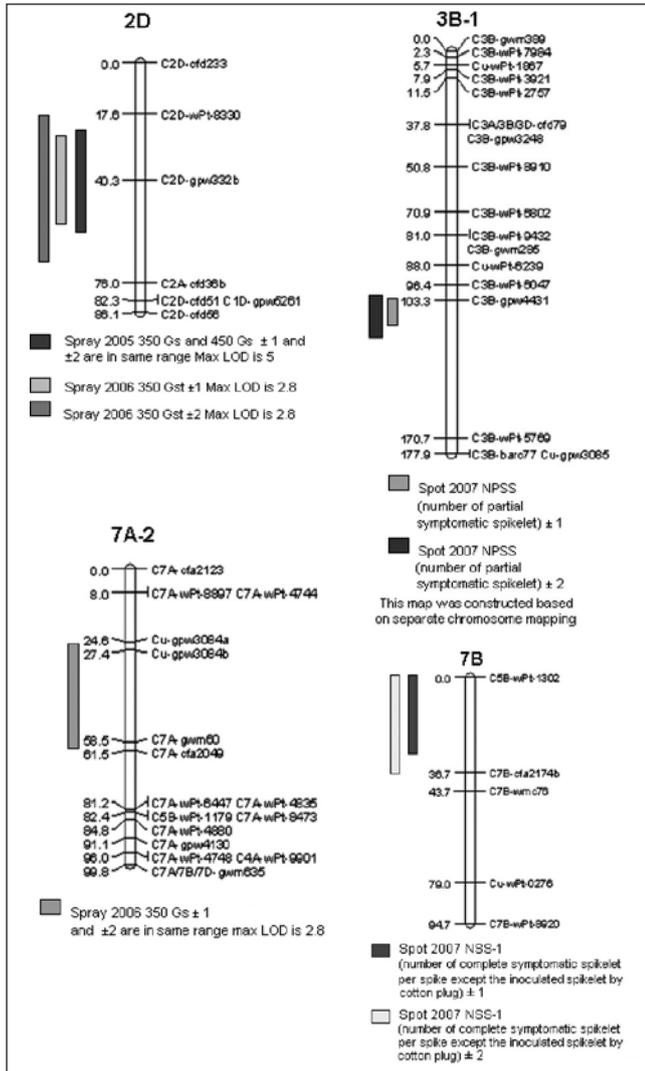


Figure 3: Mapped FHB QTLs for Type I and Type II resistance in the Apache/Balance DH population using the 2005, 2006 and 2007 field score data sets.

### Discussion

Our results showed that the year and location effects in the *Fusarium* experiments were highly significant, which influenced the statistical analyses substantially. Moreover, we identified significant contradictions between the visual FHB field scores and the *F. graminearum* biomass estimated by qPCR. Hence, the QTLs analyses were exclusively based on the visual observations. However, despite the fact that we have focused on these data, indications from qPCR that there are significant differences between Type I and Type II resistance to FHB in the tested lines and parents were confirmed in the QTL mapping. We identified two significant QTLs on chromosome 2D and 4D for Type I resistance and one significant QTL on chromosomes 7B and 3B for Type II resistance in the Apache/Balance population. The QTL on chromosome 4D is linked to the dwarfing gene *Rht2* (data not shown). However, these QTLs for FHB resistance were also reported in other studies (Liu et al., 2007; Zhou et al., 2004). We, therefore, decided to summarize the *Fusarium* experiments in a research paper and not to invest in additional experiments dealing with the Apache/Balance mapping population.

## 4. Screening for resistance to *Septoria tritici* blotch and *Fusarium* head blight in a broad germplasm collection

In the general introduction we indicated that the number of genes available for effective resistance breeding to STB and FHB is limited. One of the main purposes of this project is to identify new sources of resistance. In a previous chapter we have focused on analyzing the *M. graminicola* virulence spectrum in France as well as on an analysis of an existing mapping population for FHB QTL mapping. Here, we will focus on the screening of germplasm collections using the developed techniques and data to identify potential new sources of resistance to STB and FHB that will be used to develop new DH populations for QTL mapping and marker development.

### Material and Methods

#### Resistance to STB

We used six highly virulent French and Dutch *M. graminicola* isolates (IPO323, IPO94269, IPO98022, IPO98046, IPO98047, IPO98064) as well as four new French isolates (S-117, S-181, S-182, and S-183) that were received from Biogemma. Seventy-three lines, including susceptible checks and *Stb* differentials, were tested according to an alpha-lattice statistical design with three replications and percentage necrosis and pycnidia development were scored at 21 days after inoculation in the seedling tests.

In the field we tested two different cultivar sets in 2005, 2006 and 2007 that were inoculated with one and two *M. graminicola* isolates, respectively (2006-IPO323, 2007-IPO323 and IPO98047). Inoculation dates were based on flag leaf appearance in early flowering cultivars and were repeated three times with a one-week interval. Inoculum ( $10^6$  spores/ml) was prepared as described above in Chapter 2.1.3. In both years we scored the STB severity by symptom expression on the flag leaf (F) and the second leaf (F-1). The field trial in 2007 was severely contaminated with natural yellow rust and leaf rust infections, and these observations were used as cofactor in the covariance analysis.

#### Resistance to FHB

We screened for type I and type II resistance at Florimond Desprez and Serasem in 2006, 2007 and only type I resistance in 2005. At Arvalis, type I resistance was scored during the 3 years. Inoculum preparation and inoculation procedures were as described in Chapter 3.1.2. In Arvalis fields, natural infection was improved by infected maize stalks that were spread in the rows. Resistance was assessed by counting the number of infected kernels per spike, for 50 spikes per line. DON levels in harvested kernels were also quantified.

### Results

#### Resistance to STB

All factors in the analysis were significant, confirming the strong isolate x cultivar interaction in the *M. graminicola*-wheat pathosystem (Table V). We selected FHD2054.3 and FD02112 as two highly resistant lines. The four additional *M. graminicola* isolates that were obtained through Biogemma were not highly virulent, particularly isolates S-117 and S-181 did not produce any pycnidia, even on the susceptible check cv. Taichung 29.

| Fixed term       | Wald statistic | d.f. | Wald/d.f. | Probability |
|------------------|----------------|------|-----------|-------------|
| Isolate          | 100.6          | 9    | 11.2      | <0.001      |
| Cultivar         | 755.3          | 72   | 10.5      | <0.001      |
| Isolate.Cultivar | 863.4          | 648  | 1.3       | <0.001      |

Table V: GLM analysis of STB seedling data (73 cultivars and 10 *M. graminicola* isolates) based on percentage pycnidia.

Subsequent field analyses showed significant isolate x cultivar interactions that were also tied to significant location (Florimond Desprez and Serasem) effects (Table VI). Nevertheless, we identified according to the flag leaf data that Bio.719 and Bio. 5019 performed very well at both locations in 2007. In addition cv. Robigus had a very low necrosis percentage at both locations, but it is a late cultivar and we therefore cannot exclude escape effects.

|      |           | Fixed term      | Wald statistic | d.f. | Wald/d.f. | Chi pr |
|------|-----------|-----------------|----------------|------|-----------|--------|
| 2006 | Flag leaf | line            | 136.61         | 20   | 6.83      | <0.001 |
|      | F-1       | line            | 68.88          | 20   | 3.44      | <0.001 |
| 2007 | Flag leaf | cultivar        | 240.65         | 26   | 9.26      | <0.001 |
|      |           | Loc iso         | 56.31          | 3    | 18.77     | <0.001 |
|      |           | Cultivar-lociso | 251.22         | 63   | 3.99      | <0.001 |
|      |           | cov             | 0.22           | 1    | 0.22      | <0.638 |
|      | F-1       | cultivar        | 205.58         | 26   | 7.91      | <0.001 |
|      |           | Loc iso         | 26.39          | 3    | 8.8       | <0.001 |
|      |           | Cultivar-lociso | 334.06         | 63   | 5.3       | <0.001 |
|      |           | cov             | 7.96           | 1    | 7.96      | 0.005  |

Table VI: GLM analysis of STB field data at two locations in 2006 and 2007 based on percentage necrosis.

### Type I resistance to FHB

Despite the significant year.location and location.cultivar effects (data not shown), we identified highly resistant and susceptible germplasm both in 2006 and 2007. Based on Gs 450 and Gst 450 in 2006 we identified ND2710 and Sumai 3 as the most resistant lines in the spring wheat set; C10 SRSN 165 in the CIMMYT set; and IFA.136.6.1.1, 20828 and 04 CY BH FU 12 in the winter wheat set. The most susceptible line in the spring wheat set was Guadalupe.

In 2007, pair wise testing at 0.05 probabilities showed that 04 CY BH FU 12, C10 SRSN 315, C10 SRSN 215, C10 SRSN 108, C10 SRSN 204 and C10 SRSN 165 were highly resistant to FHB and Guadalupe, Bio2000 were again in the most susceptible set of cultivars (Table VII). In 2007, Roysac got fewer symptoms than the two years before, because natural infection did not occur during flowering, but it is usually highly infected after spray inoculations.

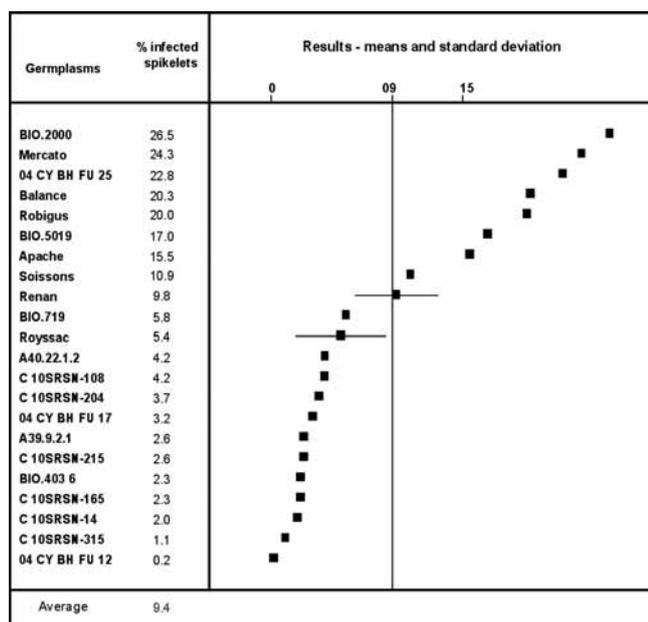


Table VII: Type I resistance to FHB on winter wheat at Arvalis in 2007.

### Type II resistance to FHB

Type II analyses were carried out by inoculating 10 spikes per plot. Pair wise testing of predicted values (PV) determined homogenous groups with significantly different disease levels at 0.05 % probability. Despite the significant effect of inoculation day and significant year.location.cultivar effects on the expression of Type II resistance we were able to identify highly resistant germplasm (Tables VIII and IX). In 2006, cvs. Sumai 3 and CM 82036 were the best resistant lines in the spring wheat set; cv. Centrum was the most resistant cultivar in the winter wheat set. Interestingly, cv. Charger was not significantly different from cv. Centrum for Type II resistant although it was highly susceptible for Type I resistance. The most susceptible cultivars were cvs. Guadalupe and 04CY BP77. In 2007, some resistant lines such as Centrum, 20828, IFA.136.6.1.1, CM 82036, ND2710 were missing. At Serasem the most resistant lines were 04 CY BH FU 12, C10 SRSN 165 and 04 CY BH FU 17, and at Florimond Desprez, 04 CY BH FU 17, 04 CY BH FU 12 and C10 SRSN 165 showed the highest FHB resistance. Over years and locations 04 CY BH FU 12 and 04 CY BH FU 17 showed the highest levels of Type II resistance to FHB at 0.05 probability.

| Material type    | Variables       | df  | Mean deviance | Deviance ratio |
|------------------|-----------------|-----|---------------|----------------|
| Spring wheat set | Inoculation day | 1   | 35.1          | 29.90 ***      |
|                  | Lines           | 20  | 5.8           | 4.97 ***       |
|                  | Residual        | 206 | 1.18          |                |
| Winter wheat set | Inoculation day | 4   | 58.1          | 19.78 ***      |
|                  | Lines           | 60  | 14.1          | 4.80***        |
|                  | Residual        | 632 | 2.9           |                |

Table VIII

| Fixed Term       | Wald Statistic | d.f. | Wald/df | Probability |
|------------------|----------------|------|---------|-------------|
| Year.location    | 2.8            | 2    | 1.41    | 0.244       |
| Cultivar         | 211.9          | 28   | 7.57    | <0.001      |
| Yearloc.cultivar | 88.9           | 36   | 2.47    | <0.001      |

Table IX. GLM analysis of FHB screening for Type II resistance in 2006 and 2007.

## ► Discussion

### Resistance to STB

The exploitation of the French and global *M. graminicola* isolates and their virulence spectrum on the known *Stb* genes enabled the identification and characterization of germplasm with potentially new resistance genes to STB. Sometimes cultivars were highly resistant in the seedling stage but susceptible in the adult plant stage such as cv. C4013 to isolate IPO98047. Based on the collected data the following new DH populations will be developed for STB QTL mapping and marker development that will be studied in the remainder of the project: FD02112 (Nogal) x Bio.719, FD02112 (Nogal) x Soissons, FDH 2054.3 x Soissons and 02CY 399 x Soissons.

### Resistance to FHB

We categorized the tested germplasm in the following categories:

1. Lines with Type I and Type II resistance; such as cv. 04 CY BH FU 12
2. Lines with Type I resistance but lower Type II levels; such as cvs. A.39.9.2.1 and A40.22.1.2
3. Lines with Type II resistance but lower Type I levels; such as cvs. Charger and Centrum
4. Lines with no Type I and Type II resistance; such as cv. Roysac

Based on the collected data the following new DH populations will be developed for FHB QTL mapping and marker development that will be studied in the remainder of the project : 04 CY BH FU 12 x Guadalupe and A39.9.2.1 x Royszac.

The data generated so far have shown that identification of resistance to FHB is very complicated and strongly influenced

by (micro)climatic factors such as temperature and relative humidity (RH) as well as the physiological state of the wheat head (inoculation day). These factors will be used to carefully plan future experiments for QTL mapping and marker development and will also be supplemented with DON data. In addition we will address the significant differences that we observed between Type I and Type II ranking of cultivars.

## Références bibliographiques

- Adhikari TB**, Anderson JM and Goodwin SB (2003) Identification and molecular mapping of a gene in wheat conferring resistance to *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* 93: 1158-1164
- Adhikari TB**, Cavaletto JR, Dubcovsky J, Gieco JO, Schlatter AR and Goodwin SB (2004a) Molecular mapping of the *Stb4* gene for resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. *Phytopathology* 94: 1198-1206
- Adhikari TB**, Wallwork H and Goodwin SB (2004b) Microsatellite markers linked to the *Stb2* and *Stb3* genes for resistance to *septoria tritici* blotch in wheat. *Crop Science* 44: 1403-1411
- Adhikari TB**, Yang X, Cavaletto JR, Hu X, Buechley G, Ohm HW, Shaner G and Goodwin SB (2004c) Molecular mapping of *Stb1*, a potentially durable gene for resistance to *septoria tritici* blotch in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 944-953
- Arraiano LS**, Chartrain L, Bossolini E, Slatter HN, Keller B and Brown JKM (2007) A gene in European wheat cultivars for resistance to an African isolate of *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Pathology* 56: 73-78
- Arraiano LS**, Worland AJ, Ellerbrook C and Brown JKM (2001) Chromosomal location of a gene for resistance to *septoria tritici* blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in the hexaploid wheat 'Synthetic 6x'. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 758-764
- Bai GH**, Kolb FL, Shaner G and Domier LL (1999) Amplified fragment length polymorphism markers linked to a major quantitative trait locus controlling scab resistance in wheat. *Phytopathology* 89: 343-348
- Bai GH** and Shaner G (1994) Scab of Wheat - Prospects for Control. *Plant Disease* 78: 760-766
- Bennett JW** and Klich M (2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 497-+
- Brading PA**, Verstappen ECP, Kema GHJ and Brown JKM (2002) A gene-for-gene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the *Septoria tritici* blotch pathogen. *Phytopathology* 92: 439-445
- Chartrain L**, (2004) Gene for isolate-specific and partial resistance to *septoria tritici* blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in wheat. Norwich, UK, University of East Anglia, PhD thesis.
- Chartrain L**, Berry ST and Brown JKM (2005a) Resistance of wheat line Kavkaz-K4500 L.6.A.4 to *Septoria tritici* blotch controlled by isolate-specific resistance genes. *Phytopathology* 95: 664-671
- Chartrain L**, Joaquim P, Berry ST, Arraiano LS, Azanza F and Brown JKM (2005b) Genetics of resistance to *septoria tritici* blotch in the Portuguese wheat breeding line TE 9111. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 1138-1144
- Desjardins AE**, Proctor RH, Bai GH, McCormick SP, Shaner G, Buechley G and Hohn TM (1996) Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9: 775-781
- Eriksen L**, Shaw MW and Ostergard H (2001) A model of the effect of pseudothecia on genetic recombination and epidemic development in populations of *Mycosphaerella graminicola* (vol 91, pg 240, 2001). *Phytopathology* 91: 519-519
- Felsenstein FG** (1999) Mehltauereger in Getride Konnen sich schnell anpassen. *Ernahrungsdienst* 54, 4.
- Fisher N** and Griffing M (1984) Benzimidazole (MBC) Resistance in *septoria tritici*. *ISPP Chemical control Newsl.* 5, 8-9.
- Goswami RS** and Kistler HC (2004) Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5: 515-525
- Hunter T**, Coker RR and Royle DJ (1999) The teleomorph stage, *Mycosphaerella graminicola*, in epidemics of *septoria tritici* blotch on winter wheat in the UK. *Plant Pathology* 48: 51-57
- Jansen C**, von Wettstein D, Schafer W, Kogel KH, Felk A and Maier FJ (2005) Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 16892-16897
- Jiang GL**, Shi JR and Ward RW (2007) QTL analysis of resistance to *Fusarium* head blight in the novel wheat germplasm CJ 9306. I. Resistance to fungal spread. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 3-13
- Kema GHJ**, Verstappen ECP, Todorova M and Waalwijk C (1996) Successful crosses and molecular tetrad and progeny analyses demonstrate heterothallism in *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics* 30: 251-258
- Liu S**, Abate ZA, Lu H, Musket T, Davis GL and McKendry AL (2007) QTL associated with *Fusarium* head blight resistance in the soft red winter wheat Ernie. *Theoretical and Applied Genetics* 115: 417-427
- McCartney CA**, Brule-Babel AL, Lamari L and Somers DJ (2003) Chromosomal location of a race-specific resistance gene to *Mycosphaerella graminicola* in the spring wheat ST6. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1181-1186
- McMullen M**, Jones R and Gallenberg D (1997) Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease* 81: 1340-1348
- Mesterhazy A** (1995) Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Breeding* 114: 377-386
- Milus EA and Parsons CE (1994) Evaluation of foliar fungicides for controlling *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Disease* 78: 697-699
- Muriuki T**, Schilling AG and Gieger HH (2001) Molecular genetic diversity and variation for aggressiveness in population of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* sample from wheat field in different countries. *Phytopathology* 149, 641-648.
- Nganje WE**, Bangsund DA, Leistriz, FL, Wilson WW and Tiapo N M (2002). Estimating the economic impact of a crop disease: the case of *Fusarium* head blight in US. Wheat and barley. 2002 national *Fusarium* head blight forum proceeding. East Lansing. Michigan state university, pp.275-81
- Ribichich KF**, Lopez SE and Vegetti AC (2000) Histopathological spikelet changes produced by *Fusarium graminearum* in susceptible and resistant wheat cultivars. *Plant Disease* 84: 794-802
- Somasco OA**, Qualset CO and Gilchrist DG (1996) Single-gene resistance to *Septoria tritici* blotch in the spring wheat cultivar 'Tadina'. *Plant Breeding* 115: 261-267
- Van Ooijen JW** and Janson J (2007a) MapQTL 5.0 Software for the calculation of QTL position on genetic linkage map. Handout published by Kayazma company and Biometris Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.
- Van Ooijen JW** and Janson J (2007b) Joimmap 4.0 Software for the calculation of genetic linkage map. Handout published by Kayazma company and Biometris Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.
- Waalwijk C**, van der Lee T, de Vries I, Hesselink T, Arts J and Kema GHJ (2004) Synteny in toxigenic *Fusarium* species: The fumonisin gene cluster and the mating type region as examples. *European Journal of Plant Pathology* 110: 533-544
- Waldron BL**, Moreno-Sevilla B, Anderson JA, Stack RW and Froberg RC (1999) RFLP mapping of QTL for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Crop Science* 39: 805-811
- Zhou WC**, Kolb FL, Bai GH, Shaner G and Domier LL (2002) Genetic analysis of scab resistance QTL in wheat with microsatellite and AFLP markers. *Genome* 45: 719-727

# Méthodologie de caractérisation des variétés et proposition de conduites culturales adaptées à une agriculture durable

Marie-Hélène JEUFFROY<sup>1</sup>, Christine BOUCHARD<sup>1</sup>, Marianne CERF<sup>2</sup>, Arnaud GAUFFRETEAU<sup>1</sup>, Christophe LECOMTE<sup>3</sup>, Chantal LOYCE<sup>1</sup>, Lorène PROST<sup>1</sup>, Marie-Hélène BERNICOT<sup>4</sup>, Jean-Bruno BEAUFUME<sup>8</sup>, Sébastien CUVELIER<sup>6</sup>, Thierry DEMARQUET<sup>5</sup>, Daniel DOBROC<sup>6</sup>, Philippe DU CHEYRON<sup>4</sup>, Alain LAROCHE<sup>7</sup>, Olivier LEBLANC<sup>7</sup>, Philippe LONNET<sup>5</sup>, Eric MARGALÉ<sup>6</sup>, Marcel MEAUSOONE<sup>6</sup>, Jean-Patrick MONNIER<sup>6</sup>, Carine ROUSSILLOT<sup>8</sup>, Patrice SENNELARD<sup>7</sup>, Gilles STAGNARO<sup>8</sup>, Jérôme VAN SUYT<sup>5</sup>, Dominique VERGER<sup>6</sup>, Axel OLIVIER<sup>9</sup>,

**Coordinateur** : Axel OLIVIER, aolivier@invivo-group.com, Tél. : 01 40 66 20 78

1 - UMR Agronomie - INRA AgroParisTech, 78850 Thiverval-Grignon

2 - UMR SAD-APT - INRA AgroParisTech, 78850 Thiverval-Grignon

3 - INRA UMRLEG, INRA-ENESAD - 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex

4 - ARVALIS - Institut du végétal - La Minière, 78280 Guyancourt

5 - Florimond Desprez - 3 rue Florimond Desprez, BP 41, 59242 Cappelle en Pévèle

6 - Serasem - 10-12 rue Roger Lecerf, 59840 Prêmesques

7 - C.C.Benoist - Ferme de Moyencourt, 78910 Orgerus

8 - Limagrain Verneuil Holding - Ferme de l'Étang, BP 3, 77390 Verneuil L'étang

9 - GIE Club 5 - 83 avenue de la Grande Armée, 75782 Paris Cedex 16

Les conduites culturales répondant aux exigences d'une agriculture durable respectueuse de l'environnement reposent sur une utilisation réduite des intrants et sont donc caractérisées par une occurrence élevée de facteurs limitants variés (Loyce *et al.*, 2008). Ces facteurs limitants sont principalement l'azote (réduction de la fertilisation azotée), les maladies (réduction de la protection fongicide), mais aussi, comme dans des conduites plus classiques, l'eau et le climat (rayonnement et température). Partant de ce constat, certains sélectionneurs de blé ont engagé un processus de sélection de variétés susceptibles de tolérer ces facteurs limitants du milieu, c'est-à-dire dont la production (rendement et qualité) en situation limitante sera proche de celle en conduite intensive. Le Catalogue français s'enrichit régulièrement de variétés de blé qui cumulent productivité et résistance aux maladies (Lonnet, 1997). Ces variétés permettraient de réaliser des économies de fongicides et de répondre ainsi aux attentes des consommateurs vis-à-vis des modes de production respectueux de l'environnement. Cette éclosion d'un nouveau type variétal est le résultat d'efforts de longue haleine, de stratégies de sélection conçues sur le long terme et d'une politique volontariste du CTPS qui dote d'un bonus les variétés tolérantes aux maladies pour favoriser leur inscription (Mistou, 2001).

Parallèlement, la mise au point d'itinéraires techniques à bas niveaux d'intrants a beaucoup progressé. Plusieurs travaux ont clairement montré qu'un recours moindre aux traitements fongicides était d'autant moins risqué que l'on réduisait simultanément l'alimentation azotée précoce et la densité de plantes, facteurs favorisant le développement des maladies comme le piétin-verse, la septoriose et l'oidium (Saulas et Meynard, 1998; Loyce *et al.*, 2008). Ces réductions de la fertilisation azotée et de la densité de semis concourent également à l'économie d'intrants et contribuent à renforcer la résistance à la verse des peuplements. Meynard (1985 ; 1991) a ainsi défini des réductions équilibrées des différents intrants en fonction de l'objectif de rendement en utilisant des modèles agronomiques simples.

Cependant, ces variétés restent encore peu cultivées, bien que leur intérêt économique ait été clairement démontré dans un contexte de prix du blé faible à moyen (Loyce *et al.*, 2001; Félix *et al.*, 2002). Aussi, nous proposons de contribuer au développement de ces variétés par une meilleure connaissance de leurs caractéristiques, associée à un choix adéquat de conduite de culture, l'ensemble contribuant à une agriculture durable au plan économique et environnemental.

Dans ce contexte, la sélection de variétés nécessite : (1) de disposer de variétés bien adaptées à des conduites caractérisées par une réduction de l'utilisation des intrants (azote, pesticides en particulier, eau éventuellement), mais aussi (2) d'être capable de proposer des conduites à bas niveau d'intrants adaptées aux caractéristiques variétales, pour assurer une rentabilité économique au producteur, condition expresse pour que ces variétés soient cultivées. L'adoption de ces variétés est donc très contingente de notre capacité à identifier des couples variété x itinéraire technique ayant un intérêt économique et environnemental. Il a en effet été clairement démontré que les intérêts environnementaux des variétés sont étroitement liés aux itinéraires techniques qui leur sont appliqués et aux systèmes de culture dans lesquels elles sont insérées (Fargue, 2002). La sélection de variétés multirésistantes et productives, bien adaptées aux conduites culturales à bas niveau d'intrants existe depuis plusieurs années. Mais il est souvent difficile, alors que les variétés sont prêtes à être inscrites, d'identifier, dans la liste des variétés effectivement inscrites, celles qui sont adaptées à ces conduites et, surtout, d'identifier les caractéristiques propres de chaque variété qui pourraient être valorisées dans une conduite à bas niveau d'intrants : les notes de résistance variétale aux maladies donnent une indication partielle sur les réductions de fongicides possibles, mais insuffisante, et d'autres caractéristiques ne sont pas connues (tolérance à des réductions de densités de semis ou de fertilisation azotée, tolérance au stress hydrique, etc.). Or, pour réussir la conduite culturale d'une variété, il est nécessaire de l'adapter aux caractéristiques de cette variété, afin de valoriser au mieux l'ensemble de ses atouts.

De plus, il apparaît nécessaire de vérifier la faisabilité et les limites d'une expérimentation visant à comparer le comportement de variétés dans des conduites à bas niveau d'intrants. Dans ces essais, un même itinéraire technique est appliqué à l'ensemble des lignées en comparaison dans l'essai, alors que celles-ci couvrent souvent une gamme très large de précocité. Or, les différences de précocité jouent de manière importante sur la réponse des variétés aux techniques. Ainsi, par exemple, selon la position du dernier apport d'azote par rapport à la floraison, les lignées les plus précoces et les lignées les plus tardives auront des réponses différentes en terme de rendement et surtout de teneur en protéines, que l'on pourrait attribuer à tort à une caractéristique variétale. Par ailleurs, un traitement fongicide unique pourra être bien positionné pour certaines variétés et mal pour d'autres, ce qui

peut les désavantager. Les différences de précocité jouent également sur l'effet attendu de certains facteurs limitants observés (comme, par exemple, une note de maladie, observée à une date identique pour toutes les lignées).

Pour accroître la fiabilité du tri effectué lors du processus de sélection, et en particulier dans les dernières étapes de ce processus, et en augmenter la rapidité, en particulier en réduisant les coûts inhérents à la mise en œuvre des expérimentations au champ, il nous semble donc indispensable d'accroître notre connaissance des caractéristiques propres de chaque variété pouvant être valorisées par les conduites culturales à bas niveau d'intrants, et de proposer une méthode permettant d'adapter rapidement l'itinéraire technique à ces caractéristiques variétales.

L'objectif de cette étude est de proposer des méthodes pour caractériser et prédire le comportement des variétés de blé pour des conduites de culture et des milieux variés.

## 1. Connaître les variétés dans leur réponse aux facteurs limitants du milieu

### ► DIAGVAR : un outil pour caractériser les variétés dans leur réponse aux facteurs limitants du milieu

#### Présentation de la méthode et de l'outil

L'outil DIAGVAR, conçu à partir de la méthode mise au point par Lecomte (2005), est structuré en trois parties. Il est alimenté par des fichiers d'entrée dont le format est standardisé : par essai (lieu\*année\*conduite), on doit disposer d'un fichier "météo" contenant les données du 1<sup>er</sup> août de l'année d'implantation jusqu'à la date de récolte, et d'un fichier "récolte" qui contient les données de rendement, de stades, de notations sur les variétés présentes dans les essais.

La première partie consiste à préparer les données d'entrée qui vont être utilisées. L'outil va chercher les données contenues dans les couples de fichiers "météo" et "récolte" qui alimentent les calculs. Il transforme un certain nombre d'observations réalisées sur les variétés en indicateurs caractéristiques des différents facteurs limitants existants, tous sur une même échelle.

La deuxième partie réalise le diagnostic agronomique des facteurs limitants dans chaque milieu du réseau, et la quantification de leurs effets sur le rendement. Ce diagnostic se fait à partir d'observations sur un nombre limité de variétés appelées génotypes révélateurs. Il est basé sur une régression linéaire multiple qui vise à expliquer l' "écart du rendement observé au rendement potentiel", le rendement potentiel correspondant au rendement maximal que peut atteindre la variété quels que soient le lieu et la conduite : c'est une donnée que l'on possède a priori. Les variables explicatives sont les indicateurs des facteurs limitants calculés dans la première phase de la démarche. Cette étape du diagnostic est effectuée pour chacun des génotypes révélateurs.

La troisième partie permet de caractériser la résistance de toutes les variétés présentes dans le réseau à ces facteurs limitants. On s'intéresse donc, dans cette étape, à toutes les variétés du réseau et plus seulement aux témoins révélateurs utilisés pour le diagnostic agronomique. Dans cette phase, on utilise une régression factorielle pour décomposer l'interaction génotype\*milieu. Les variables explicatives de cette régression sont les facteurs limitants mis en évidence dans l'étape précédente.

L'outil a, pour résumer, trois objectifs :

- identifier les facteurs limitants présents dans chaque milieu d'un réseau d'essais,
- quantifier la contribution de chaque facteur limitant aux pertes de rendement observées, dans chaque milieu et pour chaque génotype révélateur,
- quantifier la résistance de chaque génotype testé vis-à-vis des facteurs limitants identifiés.

DIAGVAR est donc un outil de caractérisation des milieux et des génotypes.

#### Conception en interaction avec les utilisateurs

Le travail réalisé avec les partenaires du projet autour de l'outil DIAGVAR a consisté en quatre phases : une première phase de découverte des attentes des utilisateurs, de familiarisation avec leurs problématiques et de mise au point du prototype, une deuxième phase de test du prototype par les utilisateurs en utilisant les données produites dans un réseau expérimental des partenaires du projet, une troisième phase de retour entre concepteurs sur l'outil DIAGVAR pour tenir compte des remarques des utilisateurs, puis une quatrième phase de retour vers les utilisateurs pour récolter les impressions des partenaires quant à la méthodologie mise en place dans cette action (Prost, 2008).

Ces quatre phases nous ont permis d'arriver à la mise au point d'un prototype opérationnel de caractérisation des milieux et des variétés d'un réseau, d'initier l'utilisation de ce prototype et d'en retirer des pistes pour améliorer le logiciel et la méthode. Nous avons également choisi de nous focaliser sur les deux premières parties de l'outil (mise au point des indicateurs et diagnostic agronomique) au détriment de la partie "caractérisation des variétés" qui paraissait moins directement opérationnelle.

### ► Test de DIAGVAR sur les essais FSOV 2004-2006

#### Les essais

Le tableau 1 décrit les essais spécifiques réalisés dans le cadre du projet. Les dispositifs expérimentaux sont les dispositifs habituels des stations expérimentales retenues. Les essais présentent en général deux conduites : une conduite "intensive" (int) et une autre conduite, non traitée aux fongicides (nt) ou "bas niveau d'intrants" (ext), c'est-à-dire avec une réduction de la densité, de la fertilisation azotée et des régulateurs de croissance.

Des listes variétales différentes ont été utilisées sur les trois années expérimentales mais avec des témoins quasiment constants : "SOISSONS" et "CHARGER" sur les trois années, "CAPHORN" en 2004/2005 et 2005/2006.

| Années    | INRA                                      | GIE C5   | ARVALIS  |
|-----------|---|--|--|
| 2003/2004 | Dijon (int et ext)<br>Rennes (int et ext) | Brosse Montceaux (int et ext)<br>Cappelle (int et ext)<br>Houville (int et ext)<br>Orgéus (int et ext)<br>Prêmesques (int et ext)<br>Verneuil (int et nt)  | Etoile (int et ext)<br>Lhuitre (int et nt)<br>Ouzouer (int et ext) |
| 2004/2005 | Dijon (int et nt)<br>Rennes (int et fi)   | Brosse Montceaux (int et ext)<br>Cappelle (int et ext)<br>Houville (int et ext)<br>Orgéus (int et ext) date de semis n°1<br>Orgéus (int et ext) date de semis n°2<br>Prêmesques (int et ext)<br>Verneuil (int et nt) | Bouy (int)<br>Ouzouer (int et nt)                                  |
| 2005/2006 | Rennes ITK1 et ITK4                       | Cappelle ITK2 et ITK3<br>Orgéus T et NT<br>Prêmesques ext et int<br>Verneuil T<br>Brosse Montceaux int et ext  |  |

Tableau 1 : Localisation des essais et nature des essais

### Diagnostic des facteurs limitants dans les essais

Le résultat du diagnostic sur les trois témoins ("SOISSONS", "CHARGER", "CAPHORN") donne des  $R^2$  (coefficient de corrélation entre les pertes de rendement observées et les pertes estimées par le modèle de régression multiple) variant entre 43 % pour "SOISSONS" et 66 % pour "CAPHORN". Quinze facteurs limitants du rendement ont été identifiés dans les essais FSOV 2004/2006 : la carence azotée pendant la phase végétative, la rouille jaune pendant le remplissage des grains, la septoriose sur feuilles à montaison, le nombre de plantes par  $m^2$ , les températures froides hivernales, la sécheresse autour du stade "épi1cm", les températures élevées entre les stades "épi1cm" et "floraison", les températures froides dans le mois précédant la floraison (et entre les stades "méiose" et "floraison"), le rayonnement dans le mois précédant la floraison (et entre les stades "méiose" et "floraison"), les températures élevées et la sécheresse entre les stades "laiteux" et "maturité". Ces résultats ont été en grande partie confirmés par l'expertise des partenaires sur leurs lieux d'essais.

### Estimation de la résistance des variétés aux facteurs limitants caractérisés

Sur les 17 variétés communes à l'ensemble des milieux expérimentaux testés, six notes de résistance ont été sélectionnées et ont pu être estimées par l'outil à partir des quinze facteurs limitants dont le diagnostic avait démontré un effet significatif sur le rendement. La note de résistance de chaque variété est caractérisée par sa valeur moyenne et un écart-type. L'outil propose un classement relatif des notes, de manière à couvrir, parmi les variétés testées, la gamme de 1 à 9.

#### ► Recherche d'un indicateur de nutrition azotée fiable et facile d'accès

Dans l'outil DIAGVAR, le diagnostic de carence azotée pendant la montaison est réalisé au moyen d'une mesure de l'indice de nutrition azotée (INN) à floraison. Or cette mesure d'INN n'est pas adaptée aux pratiques des acteurs : c'est une mesure lourde, destructive et coûteuse qui nécessite de la main d'œuvre, déjà trop rare. De plus, elle requiert des expérimentateurs qu'ils passent dans leurs essais à floraison alors que les expérimentateurs d'essais variétaux passent généralement uniquement à épiaison. Nous avons donc cherché un indicateur mieux adapté aux pratiques des acteurs, mais tout aussi performant, en nous intéressant aux mesures fournies par un chlorophyll meter (SPAD 502 Minolta).

### Étude de la relation SPAD/INN

La première étape du travail a consisté à préciser le mode d'emploi du SPAD. Nous avons montré que les mesures réalisées sur les deux dernières feuilles de la tige sont étroitement corrélées, ce qui permet de recommander la mesure sur une seule de ces deux feuilles, la F2, *a priori* plus sensible aux variations de nutrition azotée.

Dans une seconde étape, à partir d'une base de données ancienne comportant 14 variétés, cinq modalités de fertilisation azotée et trois années, nous avons montré qu'il existait une relation exponentielle étroite ( $r^2=0.796$ ) entre les mesures SPAD et l'indice de nutrition azotée mesuré sur la culture. Cette relation comportant de forts effets "année" et "variété", nous avons exploré la relation entre l'INN et l'index SPAD, ce dernier étant le ratio entre la valeur SPAD d'une variété et la valeur SPAD de la même variété sur une modalité bien alimentée en azote. Cette relation est meilleure ( $r^2=0.892$ ) ; elle permet d'éliminer l'effet variété, mais conserve un effet année. Néanmoins, la qualité prédictive de cette relation est très satisfaisante (RMSEP=0.093).

### Évolution de la mesure SPAD autour de floraison

Pour intégrer cet indicateur dans les routines expérimentales des acteurs, celui-ci doit pouvoir être mesuré à l'occasion des visites réalisées habituellement par les expérimentateurs dans leurs essais, et notamment au moment de l'épiaison des variétés. Nous avons donc cherché à déterminer comment les mesures de SPAD évoluaient dans le temps pendant la période autour d'épiaison-floraison. Sur deux essais à Grignon, nous avons donc suivi le SPAD chaque jour pendant trois semaines autour de la floraison, sur trois variétés de précocité très contrastée et deux itinéraires techniques différant par les dates d'apport d'azote. À partir de ce suivi, nous avons déterminé la plage de temps autour de la floraison pendant laquelle les mesures SPAD étaient stables et non différentes de la valeur observée à floraison. Cette période s'étale de neuf jours avant floraison à quatre jours après floraison, ce qui laisse une souplesse aux expérimentateurs pour mesurer cet indicateur en même temps que le repérage des épiaisons, sur l'ensemble des variétés testées dans les essais.

## 2. Prendre en compte la précocité variétale dans la conduite des essais : conséquences pour l'évaluation des variétés

Les évaluations des caractéristiques variétales du blé tendre, sur lesquelles sont fondés les choix variétaux des agriculteurs, sont obtenues le plus souvent dans des essais en conduite intensive (azote non limitant, emploi systématique de régulateur de croissance, application de fongicides assurant une protection totale, etc.) ou combinant conduite intensive et absence de traitement phytosanitaire. De plus, ces essais de comparaison variétale comportent un grand nombre de variétés, couvrant généralement une gamme étendue de précocité. Or, les techniques culturales appliquées sur les essais le sont à une date unique et souvent au stade des variétés les plus précoces. Ces interventions seraient donc plus favorables pour certaines variétés que pour d'autres, selon leur stade de développement lors de l'application. La précocité variétale est ainsi rarement prise en compte dans la mise au point des protocoles expérimentaux et dans l'analyse des résultats obtenus. Or, cultivées dans des conditions moins intensives, les variétés peuvent rencontrer des facteurs limitants variés, de nature diverse, qui peuvent alors modifier sensiblement leurs performances (et en particulier l'effet de la précocité variétale sur ces performances qui peut être plus marqué).

Dans ce cadre, nous avons mis en place une expérimentation qui vise à quantifier les erreurs liées à la non prise en compte de la précocité des variétés dans la conduite de la culture (variant selon les dates des interventions techniques, calées sur les stades des variétés précoces ou tardives) sur différentes variables (notes de maladies, rendement, teneur en protéines des grains).

#### ► Le dispositif expérimental

L'expérimentation a été mise en place en 2004/2005 et 2005/2006 sur le site expérimental de l'INRA de Grignon (78) dans un sol limoneux (environ 60 % de limon) et derrière un maïs grain. Chaque année, les combinaisons de choix variétal et de date d'intervention ont été testées sur deux itinéraires techniques (ITK). L'ITK2 correspond aux recommandations locales des organismes de conseil tandis que l'ITK4 est caractérisé par un niveau d'intrants réduit (réduction de la densité de semis de 40 %, pas de régulateur ni de traitement fongicide, réduction de la dose d'azote de 60 kg/ha).

Les deux facteurs étudiés sont répartis sur un dispositif en split-plot avec trois répétitions. Dix variétés ont été

retenues de manière à couvrir une large gamme de précocité allant des plus précoces (note de précocité à épiaison du "GEVES" de 8), aux plus tardives (note de 4.5). Ces variétés présentent également des niveaux variés de résistance à la septoriose et à la rouille brune. Deux dates d'intervention (ou conduites) ont été appliquées pour chaque variété et sur les deux itinéraires techniques. Les dates d'interventions sont calées sur les stades des variétés les plus précoces, pour la conduite P, et des variétés les plus tardives pour la conduite T. Ces décalages dans les dates d'application concernent les second et troisième apports d'azote et l'application du régulateur de croissance.

Sur les plantes, nous avons réalisé un suivi des stades ("épi 1 cm", gonflement, épiaison et floraison), une mesure des composantes du rendement et du rendement, des mesures de biomasse et de teneur en azote à la sortie de l'hiver, à floraison et à maturité physiologique pour estimer en particulier l'Indice de Nutrition Azotée (INN) à floraison et la teneur en protéines des grains, des notations de maladies et de verse.

## ► Résultats

**Rythmes de développement et état du peuplement végétal**  
L'écart entre l'apparition du stade épiaison de la variété la plus précoce (Trocadéro) et celui de la plus tardive (Vivant) est de 20 jours en 2004/2005 et de 14 jours en 2005/2006. Cette gamme de précocité correspond à celle généralement observée dans les essais variétaux. Le classement issu des dates d'épiaison obtenues sur l'essai n'est pas strictement identique à celui issu des notes de précocité à épiaison du GEVES, mais la tendance est respectée.

Sur l'indice de nutrition azotée (INN) à floraison, nous constatons un effet de la conduite à l'avantage de la modalité P en 2004/2005 pour les deux ITK, dû à une moins bonne valorisation du deuxième apport d'engrais N sur la conduite T, à cause de conditions climatiques défavorables (Tableau 2). En 2005/2006, la différence de valeurs d'INN entre les deux conduites est moins forte et n'est présente qu'en ITK4. Ainsi, dans un contexte d'itinéraire technique à bas niveau d'intrants (ITK4), un décalage de date d'intervention peut avoir une incidence plus marquée sur la culture.

| Campagne  | ITK2 |      | ITK4 |      |
|-----------|------|------|------|------|
|           | P    | T    | P    | T    |
| 2004/2005 | 0.88 | 0.73 | 0.80 | 0.68 |
| 2005/2006 | 0.87 | 0.88 | 0.75 | 0.69 |

Tableau 2 : Valeurs moyennes d'INN à floraison sur l'ensemble des variétés.

Les maladies rencontrées sur les essais sont la septoriose et la rouille brune. Bien qu'en 2004/2005, la pression parasitaire ait été tardive, nous avons constaté des attaques assez fortes, principalement de septoriose. En 2005/2006, aucune attaque

sérieuse n'a été observée. Enfin, comme attendu, les attaques ont été beaucoup plus faibles (inférieures en moyenne à 10 %) en ITK2 du fait de la protection fongicide. A même date de mesure, le classement des attaques sur les variétés est cohérent avec les notes de résistance. Une analyse statistique a permis de montrer que les attaques étaient significativement plus fortes en date d'intervention P (précoce).

### *Influence de la conduite sur le classement des variétés pour le rendement*

La perte moyenne de rendement est de 11 q/ha entre l'ITK4 et l'ITK2, ce qui est cohérent avec la réduction des intrants entre ces deux ITK, bien qu'inférieur à la différence d'objectif de rendement attendue (de l'ordre de 20 q/ha). L'analyse de variance effectuée pour l'ITK4 en 2004/2005 indique une interaction entre les facteurs "date d'intervention" et "variété" ( $p=0.002$ ). Ainsi, le décalage des dates d'intervention influe sur le classement variétal. Bien que les dates d'intervention calées sur la variété précoce (P) favorisent le rendement pour la plupart des variétés, on constate que deux variétés (Isengrain et Récital) ont eu des rendements sensiblement supérieurs lorsque les interventions étaient calées sur les variétés tardives (Figure 1). Aucune interaction n'est observée en ITK2 ( $p=0.34$ ), ainsi qu'en 2005/2006.

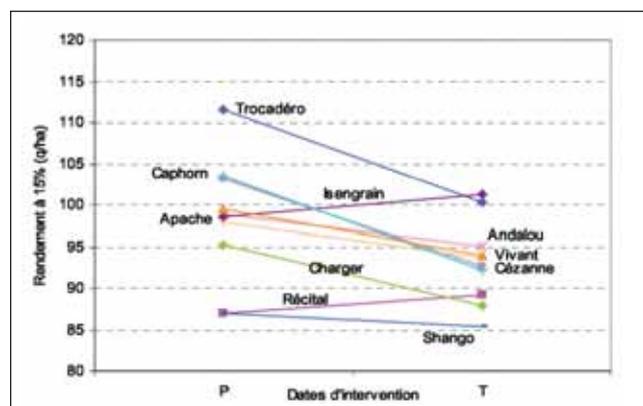


Figure 1 : Classement des variétés vis-à-vis du rendement selon les dates d'intervention en ITK4 en 2004/2005.

### *Influence de la conduite sur le classement des variétés pour la teneur en protéines*

Concernant la teneur en protéines, l'interaction entre l'effet de la date d'intervention et de la variété est significative en 2004/2005 et 2005/2006 et ce pour les deux itinéraires techniques ( $p=0.01$  pour ITK2 en 2004/2005 et  $p<0.0001$  par ailleurs). En date d'intervention P, Trocadéro, variété précoce, présente (en ITK4 pour les deux campagnes et en ITK2 en 2005/2006) une teneur en protéines supérieure à Vivant, variété tardive (Figure 2). Or, en date

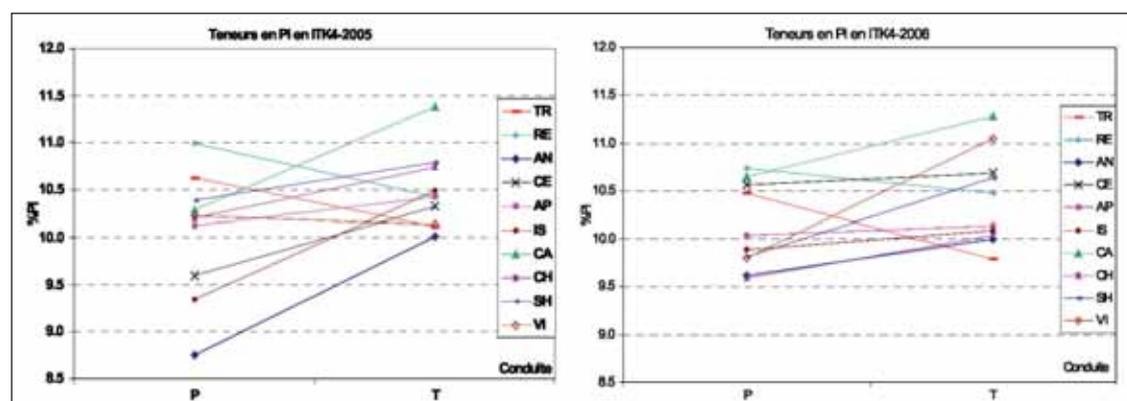


Figure 2 : Classement des variétés vis-à-vis de la teneur en protéines selon les dates d'intervention en ITK4.

d'intervention tardive (T), Vivant a une teneur en protéines supérieure à celle de Trocadéro. On peut faire le même constat entre Cézanne (précoce) et Shango (tardive) en ITK4. Enfin, si l'on compare les deux ITK (en 2004/2005), on constate que les écarts de teneurs en protéines entre les deux conduites P et T sont plus importants en ITK4.

### 3. Évaluer l'adaptation des variétés à des conduites à bas niveaux d'intrants

Cette dernière partie vise à évaluer la capacité du modèle Beta-var à prédire le comportement de variétés dans une conduite à niveau d'intrants réduit à partir de résultats expérimentaux obtenus sur les mêmes variétés mais conduites selon des itinéraires techniques (ITK) plus conventionnels (de type intensif-raisonné). Il s'agit donc d'apprécier s'il est pertinent d'utiliser le modèle Beta-var pour :

- limiter le coût expérimental en réduisant le nombre d'ITK testés,
- accroître la valorisation des essais réalisés aujourd'hui sur les variétés en offrant une prédiction convenable de leur comportement dans des situations différentes et plus prospectives.

#### ► Le modèle Beta-Var

Le modèle Beta-var (Loyce et al., 2002a et b ; Zhang, 2005) permet de simuler les conséquences sur le rendement, la teneur en protéines, la marge brute et le reliquat d'azote minéral dans le sol à la récolte, de différents ITK appliqués à différentes variétés de blé. Ce modèle non dynamique à vocation opérationnelle s'articule autour d'un nombre limité de relations organisées en quatre grands modules :

- un module "Semis", qui, à partir du rendement potentiel d'une variété donnée, estime la perte de rendement occasionnée par une densité de semis réduite,
- un module "Azote", qui estime les pertes de rendement liées à d'éventuelles carences azotées et calcule la teneur en protéines, qui dépend de la quantité d'azote absorbée et du rendement,
- un module "Maladie" qui, à partir des notes de résistance variétale aux maladies aériennes, et de la pression de chaque maladie, estime une perte de rendement liée aux maladies (Zhang *et al.*, 2007),
- un module "Economique", qui sert au calcul de marge (non utilisé dans cette étude).

#### ► Les données utilisées

Les essais que nous utilisons dans cette étude ont été réalisés en 2005-2006 sur quatre lieux, à Cappelle (59), Orgéus (78), Prêmesques (59) et Rennes (35). Sur chacun de ces lieux, 21 variétés, dont les notes de résistances aux maladies et les précocités ont été renseignées par le "GEVES", ont été conduites selon deux itinéraires techniques. L'ITK2 correspond aux recommandations locales, définies selon un objectif de rendement, et l'ITK3 a été établi selon un objectif de réduction raisonnée des intrants (semences, azote, fongicide et régulateur de croissance). La réduction de la dose totale d'azote entre les deux ITK a été systématiquement appliquée sur le deuxième apport. De plus, généralement, aucun traitement fongicide n'a été effectué sur la conduite extensive sauf à Cappelle où un traitement a été réalisé. Deux répétitions ont été réalisées pour chaque couple variété-itinéraire technique.

Pour chaque essai, les informations nécessaires au modèle ont été fournies par les expérimentateurs : densité de semis, bilan azoté en sortie d'hiver, date et dose des apports d'azote, niveau d'attaque des principales maladies (rouille brune, rouille jaune, oïdium et septoriose) sur une échelle discrète allant de 1 à 9, fongicides appliqués (matière active et dose), rendements et teneurs en protéines des grains mesurés à la récolte.

#### ► Méthodes d'évaluation de la qualité prédictive et décisionnelle du modèle

Dans un premier temps, nous avons évalué la capacité du modèle à prédire correctement des rendements et teneurs en protéines en conduite extensive. A cette fin, les sorties du modèle ont été comparées aux résultats obtenus en expérimentation. Nous avons également cherché à savoir si l'intégration d'un effet variétal dans le module maladie de Beta-var améliore significativement la qualité de ses prédictions de rendement. Pour ce faire, nous avons comparé la qualité des prédictions fournies par ce modèle avec celle offerte par un modèle (dit moyen) n'intégrant aucun effet variétal et associant à l'ensemble des variétés une perte de rendement moyenne identique (Colson *et al.*, 1995; Husson *et al.*, 1997). Cette perte de rendement a été estimée en moyennant les pertes observées entre l'ITK2 et l'ITK3 sur l'ensemble des variétés cultivées sur chaque lieu d'étude.

Cette analyse a été complétée par l'examen de la qualité décisionnelle du modèle, c'est-à-dire sa capacité à répondre aux attentes des sélectionneurs. Nous avons considéré que l'objectif des sélectionneurs était d'identifier, parmi les 21 variétés conduites dans les différents lieux d'essai, les  $n$  plus productives en ITK3 à partir des rendements obtenus pour ces mêmes variétés en ITK2. Pour juger de la capacité du modèle à répondre à cet objectif, nous avons défini les deux indicateurs suivants :

- nombre de variétés parmi les  $n$  meilleures en ITK3 (dans l'expérimentation) correctement identifiées par le modèle à partir des résultats obtenus en ITK2,
- perte moyenne de rendement occasionnée par l'utilisation du modèle et de résultats obtenus en ITK2 pour choisir les  $n$  meilleurs variétés en ITK3\*. Concrètement, il s'agit de la différence entre la moyenne des rendements en ITK3 des  $n$  variétés les plus productives selon l'expérimentation et la moyenne des rendements en ITK3 des  $n$  variétés les plus productives selon le modèle.

Pour évaluer la plus-value décisionnelle du modèle, nous avons comparé la valeur de ces indicateurs avec la valeur des mêmes indicateurs obtenue en utilisant seulement les résultats observés en ITK2 (sans utiliser le modèle) pour choisir les  $n$  variétés les plus productives en ITK3. Se baser sur les résultats obtenus en ITK2 pour choisir les meilleures variétés en ITK3 revient à penser que les variétés les plus productives en ITK2 le sont aussi en ITK3.

Ces indicateurs ont été calculés à l'échelle de l'essai et du réseau d'essais (constitué ici de quatre essais).

\* Soit  $PM$  la perte moyenne de rendement occasionnée par l'utilisation du modèle et de résultats obtenus en ITK2 pour choisir les  $n$  meilleurs variétés en ITK3

Soit  $RdtITK3i$  le rendement obtenu par la variété  $i$  en ITK3

Soit  $nVarMod$  les  $n$  variétés sélectionnées en utilisant le modèle  
Soit  $nVarExp$  les  $n$  variétés les plus productives en ITK3

Alors :

$$PM = \frac{1}{n} * \left( \sum_{i \in nVarExp} RdtITK3i \right) - \frac{1}{n} * \left( \sum_{i \in nVarMod} RdtITK3i \right)$$

## ► Résultats

La baisse de rendement entre ITK2 et ITK3 est systématique dans l'ensemble des sites et des variétés, mais elle est très variable selon le lieu (26 q/ha à Rennes, 22 q/ha à Prémesses, 14 q/ha à Orgerus, 9 q/ha à Cappelle), en lien avec les conditions pédoclimatiques et des différences dans les ITK appliqués. En moyenne sur l'ensemble des lieux, les pertes relatives de rendement varient en fonction des variétés, de 11.17 % (Koréli) à 24.35 % (Orvantis).

Le modèle utilisant en entrée des observations réalisées sur l'ITK2, prédit mal la teneur en protéines des grains (RMSEP de 0.97 %). En revanche, il a une assez bonne qualité prédictive pour le rendement. En effet, la RMSEP du modèle Betha-var est plus faible que celle obtenue en utilisant une perte de rendement moyenne par lieu (RMSEP = 4.72 q/ha et 5.44 q/ha respectivement) : l'intégration du facteur variétal dans le module maladie du modèle Betha-var semble donc avoir un effet bénéfique sur la qualité des prédictions du modèle. Une analyse plus fine des résultats montre que la prédiction des pertes de rendement entre les deux ITK n'est bien prédite par Betha-var que dans les situations où la pression de maladie est importante. Ce constat s'explique facilement par le fait que la variété n'est actuellement prise en compte dans le modèle qu'au sein du module "Maladie".

Enfin, il apparaît sur les figures 3 et 4 présentant les résultats obtenus à l'échelle du réseau d'essai qu'une utilisation du modèle Bétha-var à partir des résultats obtenus en ITK2 apporte une plus-value décisionnelle significative. D'après la figure 3, le modèle (associé aux résultats obtenus en ITK2) est mieux à même d'identifier les variétés les plus productives en ITK3 que l'utilisation directe des mesures issues de l'ITK2. En effet, le nombre de variétés correctement identifiées est toujours supérieur si nous utilisons le modèle plutôt que les seuls résultats obtenus en ITK2, le modèle permettant d'identifier 8 des 10 variétés les plus productives en ITK3 quand les résultats issus de l'ITK2 ne permettent d'en identifier que 6. De plus, la figure 4 montre que les pertes de rendement associées aux erreurs de choix variétal sont au moins deux fois plus faibles si nous corrigeons les résultats obtenus en ITK2 par l'utilisation du modèle. Il faut cependant remarquer que ces résultats sont beaucoup moins tranchés à l'échelle plus petite de l'essai.

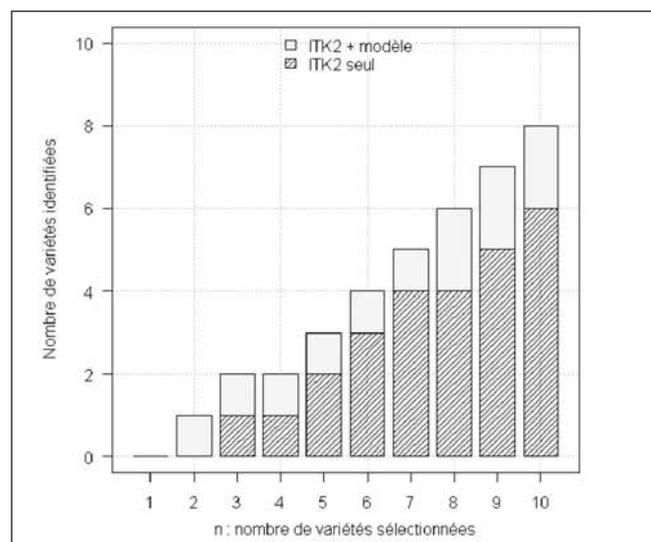


Figure 3 : Nombre de variétés, parmi les n meilleures en ITK3, correctement identifiées par une expérimentation en ITK2 associée ou non à l'utilisation du modèle Bétha-var.

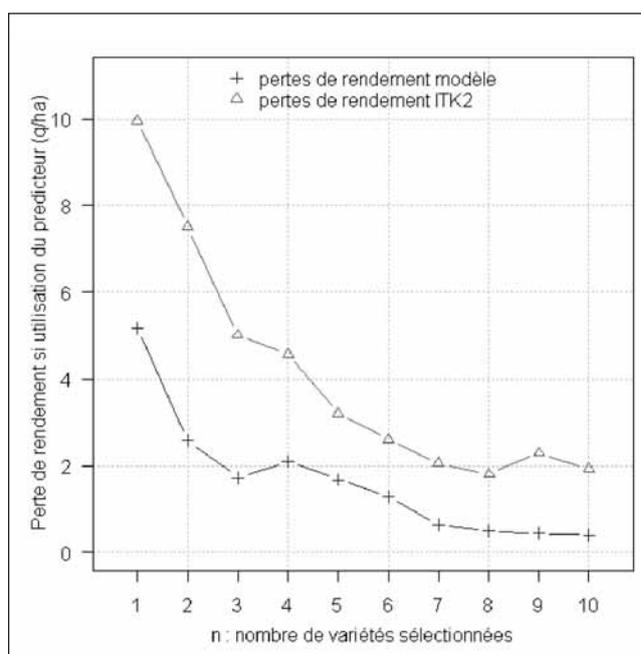


Figure 4 : Perte moyenne de rendement occasionnée par l'utilisation de résultats obtenus en ITK2 (corrigés ou non par le modèle Bétha-var) pour choisir les n meilleures variétés en ITK3.

## ► Conclusion-Perspective

Dans cette étude, nous avons mis au point un outil de caractérisation des milieux et d'évaluation des variétés, avec les acteurs impliqués dans l'évaluation variétale. Cet outil requiert encore quelques améliorations avant de pouvoir être utilisé en routine par les acteurs. Il pourrait par ailleurs être complété par des outils permettant de reconstituer l'historique de carences azotées, nécessaire pour correctement caractériser la réaction des variétés face à ce facteur limitant. Par ailleurs, cet outil pourrait également être appliqué au diagnostic de la teneur en protéines des grains chez le blé.

Nous avons montré que la gamme de précocité des variétés évaluées au sein d'un même essai pouvait entraîner des biais de classement des variétés, suite à une interaction forte entre la conduite appliquée de manière homogène sur l'essai et le stade de la variété. Les perturbations de ce classement semblent plus importantes en ce qui concerne la teneur en protéines qu'en ce qui concerne le rendement. Il serait donc nécessaire, dans l'avenir, de proposer des méthodes pour corriger les valeurs observées de teneur en protéines de ce biais.

Enfin, le modèle Betha-var apparaît comme un outil intéressant pour compléter les essais d'évaluation des variétés, réalisés dans une gamme réduite de conduites culturales pour des raisons de coût expérimental, en proposant une évaluation des variétés dans des conduites différentes, et en particulier dans des conduites à bas niveau d'intrants. L'évaluation de la qualité décisionnelle de ce modèle pourrait être poursuivie en identifiant les critères d'évaluation en relation directe avec l'activité de sélection.

## Références bibliographiques

- Colson J.**, Wallach D., Bouniols A., Denis J.B., Jones J.W., (1995). The mean squared error of yield prediction by Soygro. *Agronomy Journal* 87, 397-402.
- Fargue A.**, (2002). Maîtrise des flux de gènes chez le colza : Etude ex-ante de l'impact de différentes innovations variétales, Thèse de doctorat INA P-G, 168 p.
- Félix I.**, Loyce C., Bouchard C., Meynard J. M., Bernicot M. H., Rolland B., Haslé H., (2002). Associer des variétés rustiques à des niveaux d'intrants réduits : intérêts économiques et perspectives agronomiques. *Perspectives Agricoles* 279, 30-35.
- Lecomte C.**, (2005). L'évaluation expérimentale des innovations variétales. Proposition d'outils d'analyse de l'interaction génotype – milieu adaptés à la diversité des besoins et des contraintes des acteurs de la filière semences. Thèse de Docteur de l'INA P-G, pp.173.
- Husson, F.**, Wallach, D., Vandeputte, B. (1997). Evaluation of CECOL, a model of winter rape. *European Journal of Agronomy*.
- Lonnet P.**, (1997). Les résistances variétales chez le blé. *Comptes rendus de l'Académie d'Agriculture de France* 83, 37-50.
- Loyce C.**, Bouchard C., Meynard J. M., Rolland B., Doussinault G., Bernicot M. H., Haslé H., (2001). Les variétés tolérantes aux maladies : une innovation majeure à valoriser par des itinéraires techniques économes. *Perspectives Agricoles* 268, 50-56.
- Loyce C.**, Rellier J.P., Meynard J.M., (2002a). Management planning for winter wheat with multiple objectives (1) : the BETHA system. *Agric. Syst.*, 72, 9-31.
- Loyce C.**, Rellier J.P., Meynard J.M., (2002b). Management planning for winter wheat with multiple objectives (2) : ethanol-wheat production. *Agric. Syst.*, 72, 33-57.
- Loyce C.**, Meynard J.M, Bouchard C, Rolland B, Lonnet P, Bataillon P, Bernicot M.H, Bonnefoy M, Charrier X, Debote B, Demarquet T, Duperrier B, Félix I, Heddadj D, Leblanc O, Leleu M, Mangin P, Méausoone M, Doussinault G (2008). Interaction between cultivar and crop management effects on winter wheat diseases, lodging, and yield. *Crop protection*.27, 1131-1142.
- Meynard J. M.**, (1985). "Construction d'itinéraires techniques pour la culture du blé d'hiver," Thèse. INA-PG, Paris.
- Meynard J.M.**, (1991). Pesticides et itinéraires techniques. In "Phytoprotective, Protection des plantes, Biopesticides" (P. Bye, C. Descoins and A. Deshayes, eds.), pp. 85-100. INRA, Paris.
- Mistou M.N.**, (2001). Appréciation de la résistance aux maladies des variétés de blé tendre d'hiver. Les essais du CTPS. *Perspectives Agricoles* 268, 46-49.
- Prost, L.** (2008). Modéliser en agronomie et concevoir des outils en interaction avec de futurs utilisateurs : le cas de la modélisation des interactions génotype-environnement et de l'outil DIAGVAR. Thèse de Doctorat AgroParisTech, Paris (France), pp.198.
- Saulas P.**, Meynard J.M., (1998). Production intégrée et extensification sont-elles compatibles? Cas des céréales à paille. *Les dossiers de l'environnement de l'INRA* 16, 9-15.
- Zhang X.Y.**, (2005). Modélisation de la réponse des variétés de blé au niveau d'intensification. Influence de la pression de maladies foliaires. Thèse de Docteur de l'INA P-G, pp. 98.
- Zhang X.Y.**, Loyce C., Meynard J.M., Monod H., (2007). Modeling the effect of cultivar resistance on yield losses of winter wheat in natural multiple disease conditions. *European Journal of Agronomy*, 26, 384-393.

# Résistance à la fusariose et mycotoxines dans les grains de blé tendre

Axel OLIVIER\*<sup>2</sup>, Maxime TROTTET<sup>1</sup>, Philippe LONNET<sup>2</sup>, Éric MARGALÉ<sup>2</sup>, Jayne STRAGLIATTI<sup>2</sup>, Patrice SÉNELLART<sup>2</sup>, Jean-Baptiste REGNARD<sup>2</sup>, Philippe LEREBOURG<sup>3</sup>, Stephen SUNDERWIRTH<sup>4</sup>, Pierre ROUMET<sup>5</sup>

\* Coordinateur : Axel OLIVIER, aolivier@invivo-group.com, Tél. : 01 40 66 20 78

- 1 - INRA UMR 118, APBV - BP 35327, 35653 Le Rheu
- 2 - GIE Club 5 - 83 avenue de la Grande Armée, 75782 Paris Cedex 16
- 3 - Unisigma - Route de Noyers, 60480 Froissy
- 4 - SARL Adrien Momont - RN 154, 28150 Allonnes
- 5 - INRA UMR 1097, DIAPC - Domaine de Melgueil, 34130 Mauguio

La fusariose est une maladie des céréales à paille qui suscite beaucoup de travaux scientifiques depuis que l'on a pris conscience de l'importance de l'effet des mycotoxines produites par les *Fusarium* sur la santé des humains et animaux. Les travaux sur la résistance montrent clairement que les interactions génotype × espèce ou isolat de *Fusarium* sont faibles et ne remettent pas en cause le classement des variétés pour la résistance à la contamination de l'épi à la floraison (van Eeuwick *et al.*, 1995 ; Wong *et al.*, 1995 ; Mesterházi *et al.*, 1999 ; Dusabenyagasani *et al.*, 1997). Par contre on connaît mal les interactions pour l'accumulation de mycotoxines, mais Stack *et al.* (2000) ont montré que cet effet était important : en contaminant une variété de blé par 12 cultures de *F. graminearum* ils n'ont trouvé aucune corrélation entre la production de mycotoxines *in vitro* et *in planta*. D'autres études suggèrent que les grains de certaines variétés résistantes pourraient détoxifier le DON (Miller, et Arnison, 1986). Les *Fusarium* peuvent également contaminer les grains sans provoquer de symptômes si l'attaque a lieu après la floraison, et cet aspect est peu étudié dans la littérature. Nous avons montré (Trottet, 1997) que des contaminations par *F. culmorum*, échelonnées de 250 à 450 °C jour après la floraison produisaient peu de symptômes en végétation, mais que plus de 60 pour cent des grains asymptotiques pouvaient être contaminés par *F. culmorum* et que leur faculté germinative pouvait être réduite à un niveau inférieur au seuil réglementaire pour la commercialisation des semences. Seuls, Hart *et al.* (1984) ont montré que des toxines peuvent être produites par des contaminations très tardives pendant une période humide suffisamment longue. Les trichothécènes sont plus concentrés dans les glumes et rachis que dans les grains. Kang et Buchenauer (1999) ont montré que le DON et ses dérivés étaient transportés dans l'épi et les grains à partir des régions de l'épi colonisées par le champignon.

Lorsqu'on contamine avec un même isolat, la relation entre quantité de symptômes, échaudage du grain et teneur en mycotoxines est assez bonne, la sélection pour la résistance contribuera donc à diminuer la teneur en mycotoxines, cependant il existe une variabilité pour l'accumulation de mycotoxines par les grains entre variétés d'un bon niveau de résistance (Šíp, 2002).

Les techniques de contamination sont bien maîtrisées. La quantité de symptômes dépend du stade de la plante au moment de la contamination, le pic de sensibilité correspond à la floraison des variétés (Saur et Trottet, 1981). L'ajustement de la quantité de spores apportées permet de faire varier la quantité de symptômes (Saur et Benacef, 1993), mais le climat au moment de la contamination et dans les jours qui suivent a également une grande influence. Il est important d'ajuster la concentration de l'inoculum en fonction du climat et de l'espèce pour ne pas détruire tous les grains et permettre les analyses de mycotoxines des grains d'une part et une bonne discrimination des réponses variétales. La technique de contamination par le sol à partir de grains contaminés artificiellement (Rudd *et al.*, 2001) ou des résidus de maïs permet de reproduire une attaque naturelle.

Bien que *F. graminearum* soit dominant, la plupart des études au champ avec contamination par une suspension de spores utilisent *F. culmorum* car il est plus facile de produire des spores en masse avec cette espèce. Les contaminations au sol sont majoritairement réalisées avec *F. graminearum*, car c'est l'espèce majoritaire sur le maïs et qu'elle produit des ascospores facilement disséminées par le vent.

Les méthodes de notations sont nombreuses, en fonction de l'objectif de l'étude. Différentes échelles ont été publiées (Rudd *et al.*, 2001). Elles peuvent être particulièrement lourdes et coûteuses pour estimer des composantes de la résistance. Si l'on ne retient que les méthodes visant à une observation synthétique du comportement, des notations globales selon une échelle de 1 à 9 (ou 0 à 9) ou estimant globalement le pourcentage d'épillets fusariés sont souvent pratiquées pour l'observation d'un grand nombre de génotypes. Les dénombrements d'épis ou d'épillets fusariés, beaucoup plus coûteux en temps, sont aussi utilisés pour des séries plus restreintes ou des analyses génétiques fines.

Les notations en végétation peuvent être complétées par des observations sur le grain : estimation de la proportion de grains momifiés, de l'échaudage, du poids de 1000 grains en comparaison avec un témoin sain, estimation de la proportion de grains "commercialisables". L'estimation de la proportion de grains ne présentant pas de symptômes contaminés par la fusariose peut aussi donner des indications sur le risque d'accumulation de

mycotoxines dans ces grains. La corrélation entre la teneur en mycotoxines et le pourcentage de grains fusariés ou la réduction du poids de 1000 grains est en général plus élevée que la corrélation avec les symptômes observés en végétation (Šíp, 2002). Cependant, la liaison entre accumulation de mycotoxines dans des grains *in vitro* et *in planta* peut être très faible (Stack *et al.*, 2000).

Les méthodes actuellement utilisées pour l'analyse des mycotoxines sont assez lourdes soit au regard du nombre d'échantillons analysables par unité de temps soit en raison de l'équipement qu'elles nécessitent (Chromatographie couplée ou non à de la spectrométrie de masse, méthodes immuno-chimiques -Elisa) (Mossoba *et al.*, 1996). Des tentatives d'analyse de mycotoxines par spectroscopie infrarouge semblent prometteuses quoique très controversées (Dowell *et al.*, 1999 ; Gorst-Allman, 1986, Maragos, 2001, Mirghani *et al.*, 2001, Mahaut *et al.*, 2007).

Un lot de grains est toujours hétérogène, et le développement d'agents pathogènes pendant la culture accroît cette hétérogénéité. Le fait d'agiter un lot composé d'éléments de tailles et de densités différentes ne fait qu'accroître l'hétérogénéité de répartition (Möbius *et al.*, 2001). Pour l'analyse des grains, il est nécessaire de travailler sur des échantillons représentatifs non biaisés. Une synthèse des techniques d'échantillonnage permettant d'arriver à ce résultat est présentée par Bar l'Helgouac'h (2001).

L'objectif de nos travaux était d'une part de préciser les potentialités de la spectroscopie proche infra rouge pour prédire les teneurs en DON des lots de grains contaminés de blé tendre et d'autre part d'estimer la part de la résistance au développement de *Fusarium* dans les épis sur l'accumulation de mycotoxines dans les grains après contamination à la floraison ou pendant la phase de remplissage des grains.

## 1. Matériel et méthodes

Pendant les trois années de l'étude : 2004, 2005 et 2006, 41 génotypes de blé tendre (six témoins communs à chacune des années et 35 lignées élites fournies par les sept participants) ont été étudiés pour évaluer leurs niveaux de résistance. L'expérimentation a été conduite dans sept lieux avec contamination artificielle par pulvérisation d'une suspension de spores de *Fusarium culmorum* appliquée sur les épis à la floraison de chaque génotype ou une contamination à partir de cannes de maïs déposées sur le sol après la levée, renforcée ou non par un épandage de grains de maïs contaminés par *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*). Le développement sur ces résidus et grains de maïs de périthèces de *G. zeae* qui libéreront des ascospores permet une contamination mimant le développement naturel de la maladie. A maturité, les grains ont été récoltés et une partie du matériel analysé pour la teneur en mycotoxines selon le processus suivant : les grains des six témoins provenant de chacun des lieux sont analysés par la méthode HPLC pour estimer le niveau moyen et la variabilité de la contamination par les mycotoxines. Des lieux représentatifs de la variabilité de l'ensemble sont choisis et les grains des 10 à 15 génotypes, ayant développé le moins de symptômes, analysés par une méthode moins coûteuse l'ELISA.

Dans six des lieux, un second essai incluant les six témoins communs et les dix meilleurs génotypes des études avec contamination à la floraison réalisées l'année précédente ont été contaminés entre 200 et 450 °C jour après la floraison, selon les lieux. L'objectif était de voir quelles quantités de mycotoxines peuvent s'accumuler dans les grains après des contaminations qui ne produisent pas ou peu de symptômes visibles et d'estimer la relation avec l'accumulation de mycotoxines après contamination à la floraison. La procédure décrite pour le choix des lieux pour les contaminations à la floraison a également été appliquée à ces essais. Les meilleurs génotypes de l'année 2004 ont été étudiés ainsi en 2005 et les meilleurs de 2005 en 2006.

Les témoins ont été choisis pour représenter une gamme de niveaux de résistance à la fusariose, trois appartiennent à un groupe plutôt résistant : Apache, Parador et Renan et trois sont plutôt sensibles : Trémie, Charger et Shango. Ils servent à ajuster les niveaux de contamination entre années pour les génotypes étudiés une seule année.

Au total, 144 échantillons de blé tendre (dont 6 variétés témoins) correspondant aux années de récolte 2005 et 2006, ont été analysés. Les analyses chimiques de référence de la teneur en DON de chacun de ces lots ont été effectuées au laboratoire INZO par Chromatographie liquide haute performance (HPLC).

Les collectes de spectres ont été réalisées sur grains entiers. Elles ont été acquises à l'aide d'un appareil de type monochromateur (Foss 6500) travaillant en réflectance et générant des longueurs d'ondes dans la gamme 400 - 2500 nm par pas de 2 nm. Pour chaque lot, 2 répétitions de grains entiers ont été réalisées. Les données ont été acquises sur un échantillon d'environ 150 grammes.

Toutes les données spectrales ont été exprimées en  $\log(1/R)$ , R étant la réflectance. Afin de ne pas prendre en compte les variations entre les échantillons liées à des différences de granulométrie, les dérivées première ou seconde des courbes de  $\log(1/R)$  ont été calculées et utilisées pour construire les calibrations. Les analyses en composantes principales, les méthodes de régression Partial Least Square (PLS) ont été utilisées pour traiter l'information spectrale et construire les équations de prédiction. Le choix de la meilleure équation possible a été fait en prenant en compte 2 paramètres : l'adéquation entre les prédictions et les valeurs de référence (valeurs maximales de  $R^2$ ) et surtout le niveau d'Erreur de Cross Validation (valeur minimale de SECV) qui est un indicateur de la précision des prédictions associées à des échantillons n'ayant pas participé à la construction de la calibration.

## 2. Résultats

Chaque année, le niveau de contamination a été élevé. Les différences des niveaux moyens d'attaque des différents lieux d'essais et années sont dues aux variations du climat, de régimes d'irrigation des essais et aussi d'échelles de notation. Pour les regroupements annuels ou pluriannuels des symptômes observés au champ ou des quantités de mycotoxines accumulées dans les grains, nous avons dû homogénéiser les données en centrant et réduisant les valeurs obtenues dans chaque essai. Ce qui explique les valeurs négatives dans certains tableaux ou graphiques.

## ► Appréciation de l'effet année

Cet effet a été apprécié pour les six témoins qui ont été observés chaque année et quelques génotypes ont été répétés dans certains lieux pendant deux ou trois ans (Tab. 1), ce qui nous a permis d'estimer l'interaction génotype année. Nous avons également utilisé des résultats d'un essai réalisé en 2003 dont les grains ont été analysés pour leur teneur en mycotoxines en 2004 dans le cadre du contrat. L'effet lieu était assez important pour chacune des années et l'interaction génotype × lieu significative, cependant on observe une bonne concordance entre les moyennes des témoins et autres génotypes communs qui ont été répétés dans certains lieux pendant au moins deux années (Fig. 1 & Tab. 2). Les liaisons entre les moyennes des essais de chaque année sont plus stables que celles que nous avons observées intra année entre les différents essais. Ceci suggère que les différents essais donnent une estimation de la valeur des génotypes étudiés, probablement peu précise et que le cumul des essais permet d'augmenter la précision de l'estimation de la valeur de chaque génotype. L'estimation de l'intensité des liaisons entre années par les coefficients de corrélation linéaire (Tab. 3) est un peu surestimée par le fait que nous avons trois témoins résistants et trois sensibles et que les autres génotypes répétés appartenaient au groupe des résistants. On estime donc surtout la stabilité de l'appartenance aux groupes des points des résistants ou des sensibles, comme le suggère la figure 1.

| Génotypes            | 2003   | 2004  | 2005  | 2006   |
|----------------------|--------|-------|-------|--------|
| Apache <sup>1</sup>  | -0.361 | -0.83 | -0.80 | -0.638 |
| Trémie <sup>1</sup>  | 0.890  | 1.53  | 1.17  | 1.045  |
| Renan <sup>1</sup>   | -1.056 | -0.52 | -1.00 | -1.068 |
| Charger <sup>1</sup> | 1.437  | 1.51  | 1.65  | 1.749  |
| Parador <sup>1</sup> | -0.497 | -0.65 | -0.03 | -0.050 |
| Shango <sup>1</sup>  | 1.023  | 1.31  | 1.44  | 1.382  |
| DI00010              |        | -0.96 | -0.82 |        |
| Skalmeje             |        | -1.17 | -0.87 | -0.409 |
| Anthus               |        | -1.06 | -0.48 |        |
| 04 FU SE 3           |        | -0.74 | -0.84 |        |
| CF99105              |        | -0.48 | -0.69 |        |
| CF99102              |        |       | -0.92 | -0.827 |
| DI04027              |        |       | -0.72 | -0.457 |
| EM01343              |        |       | -0.67 | -0.610 |
| UN 20-05             |        |       | -0.36 | 0.881  |

<sup>1</sup> témoin présent chaque année dans tous les essais

Tableau 1 : Valeurs moyennes sur l'ensemble des lieux des AUDPC, centrées réduites, pour chacune des années de l'étude, des génotypes étudiés au moins deux ans.

| Variétés | Contamination à la floraison |         |         |         | post floraison |         |
|----------|------------------------------|---------|---------|---------|----------------|---------|
|          | 2003                         | 2004    | 2005    | 2006    | 2005           | 2006    |
| Apache   | 6678.7                       | 6218.9  | 3940.3  | 2697.7  | 4601.0         | 2537.0  |
| Renan    | 4121.3                       | 3519.0  | 4553.1  | 3367.1  | 519.5          | 2949.3  |
| Parador  | 8669.3                       | 5269.3  | 9800.9  | 12086.9 | 1477.3         | 12773.3 |
| Trémie   | 19496.0                      | 10044.0 | 15243.7 | 10831.9 | 11067.8        | 7518.5  |
| Charger  | 11045.0                      | 11931.1 | 15693.1 | 31500.3 | 3293.8         | 15402.0 |
| Shango   | 23264.3                      | 14121.4 | 24173.1 | 18389.0 | 988.7          | 17875.8 |

Tableau 2 : Valeurs moyennes sur l'ensemble des lieux des teneurs en mycotoxines ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ), des six témoins pour chacune des années de l'étude et les deux modes de contamination.

|      | 2003  | 2004  | 2005  | 2006  |
|------|-------|-------|-------|-------|
| 2003 |       | 0.875 | 0.931 | 0.956 |
| 2004 | 0.935 |       | 0.895 | 0.834 |
| 2005 | 0.965 | 0.946 |       | 0.858 |
| 2006 | 0.978 | 0.913 | 0.926 |       |

Tableau 3 : Valeur des coefficients de corrélation ( $r$ ), sous la diagonale, et de détermination ( $r^2$ ), au dessus de la diagonale, pour la valeur moyenne annuelle de l'AUDPC obtenue dans chaque lieu avec les témoins et génotypes observés plusieurs années.

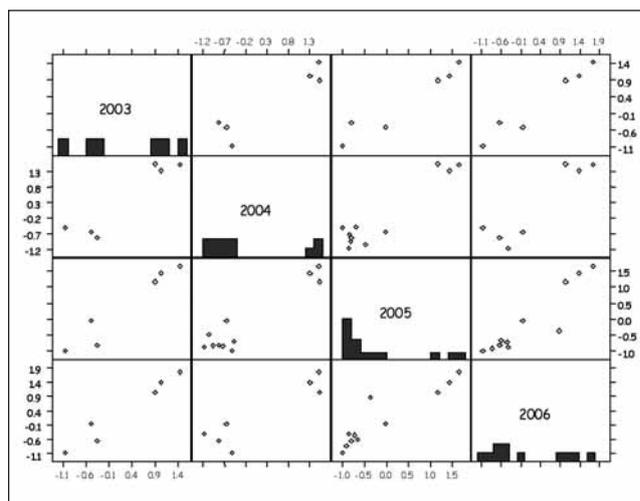


Figure 1 : Symptômes, moyennes annuelles des valeurs centrées réduites des AUDPC issues des observations réalisées dans les sept lieux, pour les témoins et lignées communes pour les années 2003 à 2006.

## ► Analyse des symptômes observés

### Contamination à la floraison

Pendant les trois années du contrat, 105 génotypes de blé tendre ont été étudiés, en plus des six témoins. Nous avons mis en évidence chaque année des géniteurs de résistance au développement des symptômes et à l'accumulation de mycotoxines dans les grains utilisables dans les programmes de sélection.

### Contaminations tardives post floraison

Vingt génotypes et six témoins ont été analysés au cours des trois années. Ces contaminations ont produit peu ou pas de symptômes sauf dans un lieu où la contamination avait été réalisée environ 200 °C jour après la floraison. L'objectif de cet essai n'était pas d'obtenir des symptômes visibles sur les épis, mais d'obtenir des grains asymptomatiques contaminés.

## ► Analyse de l'accumulation de mycotoxines dans les grains

Chaque année, les analyses ont été réalisées en deux temps, d'abord les six témoins de chaque dont les résultats ont permis de choisir les lieux pour lesquels on a ensuite analysé les 10 à 15 génotypes ayant développé le moins de symptômes. Comme pour les symptômes développés, la variabilité de la quantité de mycotoxines accumulées dans les grains est très variable selon les essais et années. Ce qui confirme l'effet du climat et des méthodes de contamination sur ce caractère. Pour les témoins, les liaisons entre les moyennes de chacune des années sont assez importantes, mais un peu moins intenses que celles observées pour les symptômes (Tab. 4).

|         | Contamination à la floraison (F) |       |       |       | Post floraison (PF) |       |
|---------|----------------------------------|-------|-------|-------|---------------------|-------|
|         | 2003                             | 2004  | 2005  | 2006  | 2005                | 2006  |
| 2003 F  |                                  | 0.763 | 0.674 | 0.342 | 0.872               | 0.385 |
| 2004 F  | 0.873                            |       | 0.873 | 0.582 | 0.600               | 0.691 |
| 2005 F  | 0.821                            | 0.934 |       | 0.836 | 0.571               | 0.785 |
| 2006 F  | 0.585                            | 0.763 | 0.914 |       | 0.261               | 0.900 |
| 2005 PF | 0.934                            | 0.775 | 0.756 | 0.511 |                     | 0.284 |
| 2006 PF | 0.620                            | 0.831 | 0.886 | 0.949 | 0.533               |       |

Tableau 4 : Valeur des coefficients de corrélation ( $r$ ), sous la diagonale, et de détermination ( $r^2$ ), au dessus de la diagonale, pour la valeur moyenne annuelle des teneurs en mycotoxines (DON) obtenues dans chaque lieu avec les six témoins étudiés chaque année.

Les niveaux de contamination des grains par des mycotoxines observés dans nos essais sont très élevés et sont souvent très supérieurs à la norme fixée par la Communauté européenne (1250 g / Kg), même pour les variétés les plus résistantes. Ceci tient au fait que les sélectionneurs souhaitent évaluer le risque dans des conditions correspondant à de fortes attaques naturelles et pour tenir compte des aléas climatiques obtiennent des niveaux de contamination plus élevés que ceux que l'on observe dans la nature.

► **Liaison entre la sensibilité estimée par le développement des symptômes sur épis et l'accumulation de mycotoxines dans les grains.**

Les analyses de mycotoxines représentant un coût important, auquel il faut ajouter celui de la récolte et de conditionnement des grains, il peut être intéressant de chercher à estimer l'accumulation de mycotoxines dans les grains à partir des symptômes observés sur les épis après contamination à la floraison.

Lors des analyses annuelles de chacun des essais, nous avons observé des liaisons d'intensité variables entre le développement de la fusariose sur les épis et la quantité de mycotoxines accumulées dans chacun des essais. Si nous nous intéressons aux valeurs moyennes annuelles, nous constatons une bonne liaison entre les symptômes observés après contamination à la floraison et la quantité de mycotoxines accumulées dans les grains (Fig. 2 et 3). La quantité de symptômes sur épis explique près des deux tiers de la quantité de mycotoxines dans les grains. Ceci n'est pas seulement dû aux témoins sensibles, puisqu'en 2006 où les génotypes intermédiaires ont aussi été analysés le rapport de corrélation ( $r^2$ ) est du même ordre de grandeur qu'en 2005 où seulement les témoins et les génotypes les moins sensibles avaient été analysés.

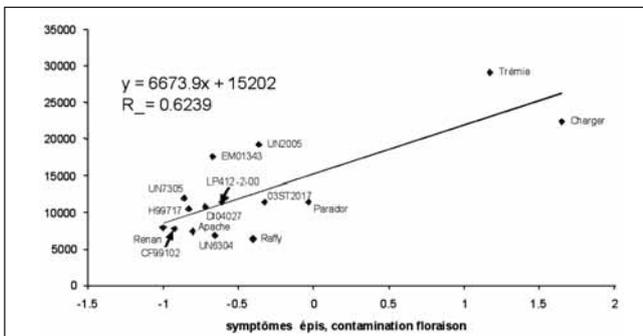


Figure 2 : Relation entre les symptômes observés et l'accumulation de mycotoxines dans les grains après contamination à la floraison, moyenne des six essais de l'année 2005.

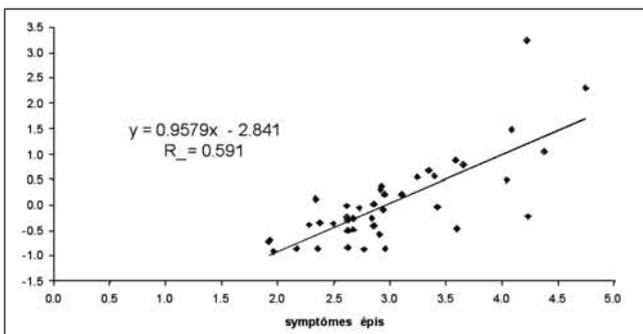


Figure 3 : Relation entre les symptômes observés en végétation et la quantité de mycotoxines accumulées dans les grains après contamination à la floraison, moyenne des valeurs centrées réduites des essais 2006.

La liaison entre les quantités moyennes annuelles de mycotoxines accumulées dans les grains pour des contaminations à la floraison et pendant le remplissage du grain est également élevée ( $r^2 = 0,57$ ) (Fig. 4 et 5). On montre également que la quantité de mycotoxines accumulée après contamination pendant le remplissage du grain est fortement liée avec la sensibilité moyenne des génotypes après contamination des épis à la floraison.

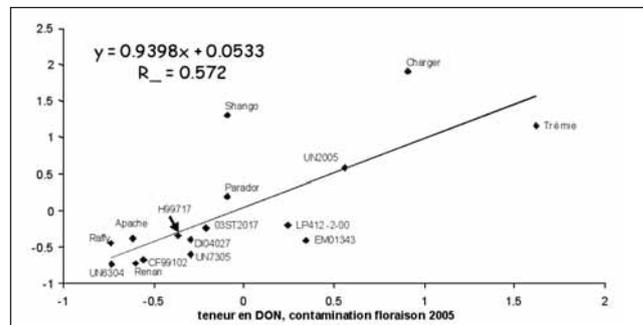


Figure 4 : Relation entre les teneurs en DON après contamination à la floraison et après contamination post-floraison moyenne des valeurs centrées réduites de cinq essais en 2005 et 3 essais en 2006.

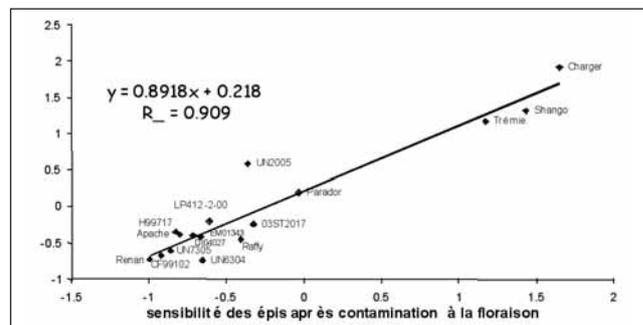


Figure 5 : Relation entre les teneurs en DON après contamination post-floraison, moyenne de 3 essais en 2006, et la sensibilité des épis après contamination à la floraison, moyenne de 6 essais en 2005.

► **Prédiction des teneurs en mycotoxines par spectrométrie infra-rouge**

Les teneurs en DON des 144 échantillons étaient comprises dans une fourchette très large allant de 20 à 84000 ppb. La distribution des données était très déséquilibrée avec une sur-représentation des individus ayant des teneurs en DON inférieures à 2000 ppb (40 %).

Une courbe de calibration a été réalisée sur l'ensemble des échantillons disponibles (Fig. 6). L'ajustement entre données de références et données prédites était correct ( $R^2=0.909$ ) alors que l'erreur de validation croisée (SECV) était élevée : 4871. Au cours de cette analyse, 6 données se sont révélées aberrantes et ont dû être écartées.

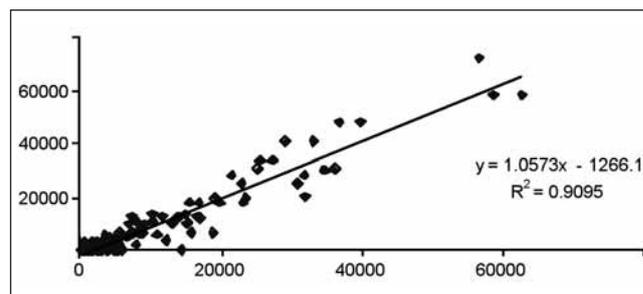


Figure 6 : Relations entre données prédites et données de référence pour la teneur en DON (n = 138 échantillons).

### 3. Discussion et conclusion

Il est difficile de généraliser, à partir d'un petit nombre de résultats, mais nous montrons qu'il est nécessaire de réaliser un nombre minimum d'essais pour estimer correctement le niveau de résistance d'un génotype. Dans une publication récente, Bockus *et al.* (2007) estiment à cinq le nombre minimum d'essais nécessaires pour caractériser avec suffisamment de précision la résistance à la fusariose de l'épi. Nous avons obtenu des résultats satisfaisants avec six essais.

La liaison entre les symptômes après contamination à la floraison et l'accumulation des mycotoxines a déjà été décrite, par exemple Wong *et al.* (1995) pour trois espèces de *Fusarium*, Dusabenyagasani *et al.* (1997), Mesterházy *et al.* (1999) pour *Fusarium graminearum* et Miedaner et Reinbrecht (2001) pour *F. culmorum*. Dans des essais liés à d'autres contrats concernant la résistance à la fusariose du blé tendre, nous avons également trouvé une liaison entre la sensibilité mesurée par le développement des symptômes après contamination à la floraison et l'accumulation de mycotoxines après contamination pendant le remplissage du grain, ces liaisons étaient plus faibles que celle présentée ici (Trottet, 2007).

Il est donc probable qu'une partie des mécanismes intervenant dans la résistance à la contamination des épis à la floraison interviennent également dans la résistance aux contaminations pendant le remplissage des gains. Mais cela ne signifie pas qu'il ne puisse pas y avoir également des mécanismes spécifiques pour la résistance aux contaminations plus tardives.

Ces résultats valident l'intérêt d'une sélection par étape en fonction du coût de l'acquisition de chaque donnée. Il est raisonnable de sélectionner d'abord sur les symptômes observés après contamination à la floraison puis d'étudier l'accumulation des mycotoxines sur les génotypes les moins sensibles.

Sur la base des échantillons analysés, nos résultats montrent que la spectrométrie dans le visible et le proche infra rouge avait de réelles potentialités pour caractériser la teneur en DON de grains entiers de blé tendre. Ces résultats sont conformes à ceux que nous avons obtenus sur des lots de blé tendre issus de contamination naturelle (Roumet *et al.*, 2007) : les valeurs du coefficient de détermination sont correctes ( $R^2 > 0.90$ ) mais l'erreur associée à la cross validation reste importante (SECV=4900 ppb). Encourageant en première approche, sur les potentialités de cette méthode SPIR pour prédire le taux de contamination des lots issus d'inoculation, ces résultats doivent être considérés avec beaucoup de prudence pour au moins 3 raisons :

- les saisies spectrales sur grains entiers n'ont été réalisées que sur un petit nombre d'échantillons représentant très peu de génotypes (6),
- la distribution des analyses de références très déséquilibrée vers les valeurs les plus faibles de notre échantillon,
- enfin, à ce stade, nous n'avons pas montré que, pour une même série expérimentale, cette méthode permettait de différencier les lots présentant des niveaux de contamination différents.

Le bilan de ce projet est donc (1) d'avoir montré qu'une sélection pour la réduction des symptômes avait un effet sur l'accumulation de mycotoxines dans les grains et (2) d'avoir mis en évidence et validé des géniteurs de blé tendre et des méthodes d'évaluation pour créer des variétés peu sensibles à la fusariose de l'épi et permettant de satisfaire les nouvelles normes fixant des limites à la teneur en fusariotoxines des grains commercialisés.

## Références bibliographiques

- Bar l'Helgouac'h C.** coord. (2001) Contrôle de la qualité des céréales et des protéagineux – Guide pratique. 2<sup>e</sup> ed. ITCF, Paris. pp. 15-35.
- Bockus, W. W., Z. H. Su, K. A. Garrett, B. S. Gill, J. P. Stack, A. K. Fritz, K. L. Roozeboom & T. J. Martin** 2007. Number of experiments needed to determine wheat disease phenotypes for four wheat diseases. *Plant Disease* 91: 103-108.
- Dowell F. E., Ram M. S., Seitz L. M.** 1999. Predicting scab, vomitoxin, and ergosterol in single wheat kernels using near-infrared spectroscopy. *Cereal Chem.* 1999. 76: 573-576.
- Dusabenyagasani M., Hamelin R. C., Collin J., Dostaler D.** (1997). Importance de l'interaction entre les cultivars de blé et les souches du *Fusarium graminearum* dans l'évaluation de la résistance à la fusariose de l'épi. *Phytoprotection* 78, 53-60.
- Eeuwijk F. A. van, Mesterházy A., Kling C. I., Ruckenbauer P., Saur, L., Bürstmayr H., Lemmens M., Keizer L. C. P., Maurin N., Snijders C. H. A.** (1995). Assessing non-specificity of resistance in wheat to head blight caused by inoculation with European strains of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. nivale* using a multiplicative model for interaction. *Theor. appl. Genet.* 90, 221-228.
- Gorst-Allman C. P.** (1986). Application of ultraviolet and infrared spectroscopy in the analysis and structural elucidation of mycotoxins. Modern methods in the analysis and structural elucidation of mycotoxins. Academic Press, Inc, Orlando, Florida, USA: 1986. 95-121. 76 ref. Editor Cole R. J.
- Hart L. P., Pestka J. J., Liu M. T.** (1984). Effect of kernel development and wet period on production of deoxynivalenol in wheat infected with *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 74, 1415-1418.
- Kang Z., Buchenauer H.** (1999). Immunocytochemical localization of *Fusarium* toxins in infected wheat spikes by *Fusarium culmorum*. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 55: 275-288.
- Mahaut B., Leblanc M. P., Cosson C., Vogel S.** 2007. Potential of NIR for the prediction of DON contamination in wheat. (13th ICNIRS), June 2007
- Maragos C. M.** (2001). Novel sensors for detecting mycotoxins in foods. *Mycotoxins* 51, 1, 51-58.
- Mesterházy Á., Bartok T., Mirocha C. G., Komoroczy R.** (1999). Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breed.* 118, 97-110.
- Miedaner T., Reinbrecht C.** (2001). Trichothecene content of rye and wheat genotypes inoculated with a deoxynivalenol- and a nivalenol-producing isolate of *Fusarium culmorum*. *J. Phytopathol.* 149: 245-251.
- Miller J. D., Arnison P. G.** (1986). Degradation of deoxynivalenol by suspension cultures of the *Fusarium* head blight resistant wheat cultivar Frontana. *Can. J. Plant Pathol.* 8: 147-150.
- Mirghani, M. E. S., Che Man, Y. B., Jinap, S., Baharin, B. S., Bakar, J.** (2001). A new method for determining aflatoxins in groundnut and groundnut cake using Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflectance. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78, 10, 985-992.
- Möbius M. E., Lauderdale B. E., Nagel S. R., Jaeger H. M.** (2001) Brazil-nut effect: Size separation of granular particles *Nature* 414, 270.
- Mossoba M. M., Adams S., Roach J. A., G. Trucksess M. W.** (1996). Analysis of trichothecene mycotoxins in contaminated grains by gas chromatography/matrix isolation/Fourier transform infrared spectroscopy and gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC International.* 79, 1116-1123.
- Roumet P., Boinot N., Boudra H., Compan F.** (2007). Potentialités de la spectroscopie proche infra rouge pour le développement de prédictions de la teneur en DON de grains de blé tendre. Colloque Maîtrise des risques liés aux fusarioses. Arcachon 12-13 Sept 2007.
- Rudd J. C., Horsley R. D., McKendry A. L., Elias E. M.** (2001). Host plant resistance genes for *Fusarium* head blight: sources, mechanisms, and utility in conventional breeding systems. *Crop Sci.* 41, 620-627.
- Saur L., Benacef, N.** (1993). Relation entre les symptômes de fusariose de l'épi et la perte de rendement chez le blé tendre. *Agronomie* 13, 829-833.
- Saur L., Trottet M.** (1981). Problèmes posés par le jugement du comportement de lignées de blé tendre et espèces voisines vis-à-vis de deux parasites de l'épi *Septoria nodorum* Berk. et *Fusarium roseum* (Link) Sn. et H. Mise en évidence de quelques sources de résistance. *C. R. Acad. Agric. France* 67, 139-145.
- Šíp V., Syrkorova S., Stuchlíková E., Chrpová J.** (2002). The effect of infection with *Fusarium culmorum* L. on deoxynivalenol content in grain of selected winter wheat varieties. *J. appl. Genet.* 43A, 319-332.
- Stack R. W., Wolf-Hall C. E., Casper H. H., Hansen J. M.** (2000). DON level in grain from wheat inoculated with *F. graminearum* is not correlated to the don producing potential of individual cultures. 2000 National *Fusarium* Head Blight Forum. Erlanger, KY, December 10-12, 2000 : 198.
- Trottet M.** (1997). Effet des contaminations tardives par les fusarioses sur le rendement du blé tendre et la qualité des semences produites. In *Épidémiologie et lutte contre les maladies transmises par les semences : l'antracnose du pois et les fusarioses du blé*. Rapport final, contrat de branche 1994-1996. 7 pp + tableaux & figures.
- Trottet M.** (2007). Incidence des contaminations tardives du blé tendre par *F. culmorum* sur la contamination par les TCT. Colloque Maîtrise des risques liés aux fusarioses. Arcachon 12-13 Sept 2007.
- Wong L. S. L., Abramson D., Tekauz A., Leisle D., McKenzie R. I. H.** (1995). Pathogenicity and mycotoxin production of *Fusarium* species causing head blight in wheat cultivars varying in resistance. *Can. J. Plant Sci.* 75, 261-267.

# Comportement de variétés de blé tendre à la fusariose des épis et à l'accumulation de mycotoxines dans les grains

Daniel CARON\*<sup>1</sup>, Thierry MOMONT<sup>2</sup>, Marie-Noël MISTOU<sup>3</sup>, Maxime TROTTE<sup>4</sup>,

\* **Coordinateur** : Daniel CARON, d.caron@arvalisinstitutduvegetal.fr, Tél. : 05 62 71 79 49

1 - ARVALIS - Institut du végétal - 6 ch. Côte Vieille, 31450 Baziège

2 - AFSA - 7 rue Coq Héron, 75030 Paris Cedex 01

3 - GEVES - rue Georges Morel, BP 90024, 49071 Beaucozézé

4 - INRA UMR 118, APBV - BP 35327, 35653 Le Rheu

## Résumé

Les essais de plein champ sur la sensibilité variétale à la fusariose des épis comportent un bruit de fond important que l'on attribue principalement aux variations climatiques. Dans cet environnement, certaines variétés sont plus instables que d'autres avec des variations autour de la moyenne de +/- 5 % à +/- 25 % perturbant complètement le classement variétal d'un essai à l'autre. Les essais doivent donc être nombreux et comporter plusieurs variétés de sensibilité de référence dans les différents groupes de précocité. Les contaminations par pulvérisation de conidies ou par épandage de résidus de cannes de maïs ont conduit à des quantités de maladie équivalentes : respectivement 33 et 31 %. En considérant variété par variété, la relation reste acceptable :  $R^2 = 0,65$ . Les ascospores libérées par les périthèces des résidus de cannes de maïs sont fortement dépendant des pluies et doivent être régulé par de l'arrosage ou de la brumisation pendant les floraisons. Quelques variétés ont des durées d'incubation et des vitesses de croissance différentes de l'ensemble, ce qui oblige à tenir compte prioritairement des observations finales et notamment de la notation tardive avant le virage de la maturité. La corrélation entre la fréquence d'épis atteints et la note de proportion de surface atteinte est  $R^2 = 0,91$ . Les 520 analyses multitrichoécènes en HPLC sont aussi sujettes à ce bruit de fond climatique et la relation entre la note de maladie et le DON est faible :  $R^2 = 0,28$ . La moyenne par variété permet de gommer ce bruit de fond et permet de constater une bonne relation de  $R^2 = 0,88$ .

**Mots-clés** : Blé tendre, variétés, résistance, *Fusarium*, inoculum, mycotoxines.

## Summary

Comportment of common wheat cultivars to *Fusarium* head blight and mycotoxin accumulation in kernels.

The field trials on the varietal susceptibility to *Fusarium* head blight include a significant background noise that is attributed mainly to changes in climate. In this environment some cultivars are more unstable than others with variations around the average of +/- 5 % to +/- 25 % completely disrupting the varietal classification of a trial to another. The trials should be numerous and include several varieties of sensitivity of reference in different groups of precocity. The contamination by conidia spraying or spreading residue of corn stubbe led to equivalent amounts of disease respectively 33 and 31 %. Considering variety by variety, the relationship is still acceptable:  $R^2 = 0.65$ . The ascospores released by peritheces from the residues of corn stubbe is heavily dependent on rainfall and should be regulated by watering or misting during the flowering. Some varieties have incubation periods and different speeds of growth of all, forcing a priority to take account of observations including late scoring before the turn of maturity. The correlation between scabbed ears and the note of proportion of ear surface reached is  $R^2 = 0.91$ . 520 multitrichoecenes HPLC analysis are also subject to the background noise climate and the relationship between the disease note and the DON is low:  $R^2 = 0.28$ . The varietal average can erase the background and can lead to a good relationship  $R^2 = 0.88$ .

**Key words**: common wheat, cultivars, resistance, *Fusarium*, inoculum, mycotoxins.

La fusariose des épis de blé tendre, bien que moyennement fréquente, est une maladie très préjudiciable pour les rendements et pour la qualité des grains lorsqu'elle survient.

L'atteinte de la qualité sanitaire est la plus grave car lorsque la production de mycotoxines dépasse les seuils réglementaires, les grains ne sont plus commercialisables.

La qualité technologique est modifiée par la fusariose jusqu'à rendre le blé impanifiable.

La qualité semencière est, elle aussi sévèrement atteinte, car la fusariose réduit la germination.

La lutte contre la maladie est nécessaire sur plusieurs fronts.

Les techniques agronomiques de conduite des cultures : rotations, précédent, travail du sol, broyage des résidus, sont pour l'agriculteur un élément majeur de la lutte, car les produits fongicides ne présentent qu'une efficacité moyenne sur cette maladie.

Dans ce contexte, sans même évoquer l'agriculture durable et la réduction des pesticides, la résistance variétale qui fait l'objet de cette étude est la voie incontournable de contrôle de la qualité et des rendements.

L'objectif de ce travail est donc :

- de fiabiliser les méthodes expérimentales de sélection de la résistance variétale,
- d'orienter la sélection et l'inscription vers un protocole efficace et économe, utilisable routine,
- de dégager les méthodes d'analyse qui permettraient de réduire la variabilité des résultats observés.

## 1. Matériel et méthode

Le noyau du protocole d'expérimentation commun est décrit ci-dessous. Les pratiques expérimentales concernant la taille des parcelles, le nombre d'épis notés, la méthode de notation, les dates de notations, l'irrigation, l'épandage des résidus de cannes de maïs, les souches ou le mélange de souches de *Fusarium* utilisées, la concentration des conidies pulvérisées, le volume /ha de pulvérisation... ont été réalisées selon les pratiques expérimentales propres à chaque organisme partenaire.

### Variétés utilisées

Les 20 variétés (Figure 1) ont été choisies à dire d'experts selon trois niveaux de sensibilité à la fusariose (à vérifier dans les essais) et huit niveaux de précocité :

- assez résistantes, moyennement sensibles, sensibles,
- précocité de : 4 (précoces) à 7.5 (tardifs).

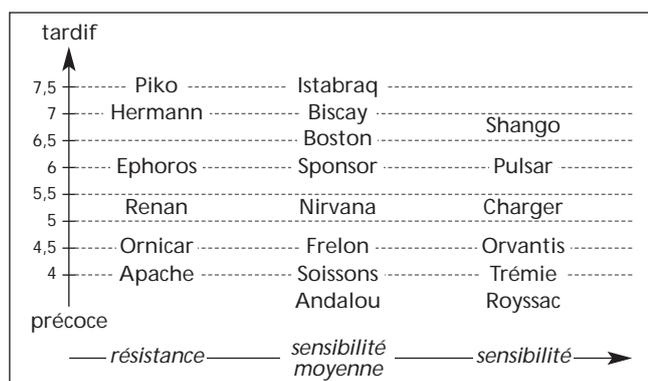


Figure 1 : Caractéristique des variétés utilisées.

### Lieux d'essais de plein champ

Six lieux situés dans la moitié nord de la France (Tableau 1) qui se décomposent en 26 modules de 20 variétés sur 2 campagnes agricoles.

|                                 | Contamination artificielle (spores) |                             | Contamination semi naturelle (cannes maïs) | Contamination semi naturelle renforcée (cannes maïs + mycélium sur grains) |
|---------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|--|--|
|                                 | <i>Fusarium culmorum</i>            | <i>Fusarium graminearum</i> |  |  |
| ARVALIS Boigneville (91)        |                                     |                             | X  |  |
| GEVES La Minière (78)           | X                                   | X                           |  |  |
| INRA Le Rheu (35)               | X                                   | X                           | X  |  |
| RAGT R2N Louville (28)          | mélange                             | X                           |  |  |
| SERASEM DESPREZ Prêmesques (59) |                                     | X                           |  |  |
| UNISIGMA Froissy (60)           |                                     |                             | X  | X  |

Tableau 1 : Conditions de réalisation des essais.

### Contaminations

Deux principaux types de contamination en comparaison avec quelques variations :

- pulvérisations :
  - conidies de *Fusarium graminearum*. Souches monoconidiennes seules ou en mélange. Souches de l'INRA de Bordeaux : Fg F1/G2, FG F6/G10,
  - conidies de *Fusarium culmorum*. Souches monoconidiennes seules ou en mélange. Souche de l'INRA de Bordeaux : G7/G5,
  - mélange de conidies des 2 espèces de *Fusarium* avec des souches issues des partenaires et ayant donné satisfaction les années précédentes,
  - de  $10^5$  à  $10^6$  sp./ml selon les climats et les pratiques usuelles de chaque partenaire,
  - stade 61,
  - basse pression : 1 bar,
  - 300 à 600 L/Ha,
  - sur parcelles labourées pour éviter les contaminations naturelles en bruit de fond.
- épandage au sol de résidus de cannes de maïs :
  - cannes de maïs : de novembre à février; entre la quantité naturelle derrière récolte et des alignées de cannes bout à bout écartées d'environ 1 m, selon les partenaires,
  - cannes de maïs + mycélium de *Fusarium graminearum* cultivé sur grains et épandus au sol à la volée avec une jetée régulièrement répartie d'environ 200 g minimum de grains contaminés humides recouverts de mycélium pour 10 m<sup>2</sup>. Cet épandage est réalisé 3 semaines avant la floraison pour permettre la constitution des périthèces et la maturation des ascospores. Le champignon étant homothallique, l'induction des périthèces se réalise rapidement en plein champ sous le couvert végétal. La maturation des périthèces nécessite de l'humidité. Ensuite, l'éjection des ascospores est un phénomène actif de projection qui nécessite le gonflement et une constriction par l'eau des parois du périthèce.

### Traitements

- épis traités ou non traités : pas de modules non contaminés non traités obligatoires, mais quelques essais comportant ce module pour contrôle et analyses différentielles selon les partenaires,
- les produits de traitement spécifiques de la fusariose des épis ont été réalisés avec du tébuconazole à 250 g/ha ou du metconazole à 90 g/ha,
- des traitements en végétation (S 31-32 et 39-45) sont nécessaires pour lutter contre les autres maladies. Ils ne comportent en aucun cas ces matières actives ni d'autres matières actives ayant quelque efficacité contre les *F. graminearum* ou *F. culmorum*.

### Humidification et mouillage des épis

L'humidification des épis pendant la contamination et la phase d'incubation est essentielle. Selon les équipements de chaque partenaire, les essais sont brumisés ou arrosés avec un rythme correspondant au climat et à la région d'implantation de l'essai (Tableau 2).

### Notations épis

2 notations repères serviront de point d'ancrage :

- stade 61 (début floraison) + 350<sup>ème</sup> jour : marque l'apparition des symptômes pour les variétés à durée d'incubation courtes à moyennes,
- stade 61 (début floraison) + 450<sup>ème</sup> jour : marque le plein développement des symptômes.

Les stades ultérieurs qui représentent l'état final de la maladie peuvent encore être utilisés jusqu'à 550 °C jour, mais il faut des expérimentateurs avertis pour éviter de confondre

la sénescence naturelle des glumes avec la sénescence due à la maladie.

### Observations secondaires

Dissémination des ascospores : sur le dispositif de Boigneville avec apport de résidus de cannes de maïs, des piégeages de spores continus ont été effectués sur la période de l'épiaison à la maturation : aspiration active de 1m<sup>3</sup>/h directement au niveau des épis.

### Analyses de mycotoxines

Les analyses multi trichothécènes ont été réalisées par chromatographie HPLC.

## 2. Résultats

### Différence du pouvoir pathogène d'une souche à l'autre

Les résultats sont présentés sur la figure 2.

On observe une différence importante d'une souche à l'autre. La souche F6/G10 ne semble pas utilisable. Les autres souches permettent une utilisation correcte. Il faut toutefois se méfier des souches les plus pathogènes qui peuvent lors d'années très favorables provoquer trop de maladie et gommer les différences variétales en égalisant vers 100 % de maladie.

### Comparaison des 2 types de contamination

Les résidus de maïs épandus au sol ont permis d'obtenir des niveaux de fusariose intermédiaires entre les résultats des pulvérisations de conidies des souches faiblement et fortement pathogènes (Figure 3).

| Espèce :                 | <i>Fusarium graminearum</i>   |                        |  | <i>Fusarium culmorum</i>          |                                   |
|--------------------------|---|------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|
|                          | ascospores  |                        |  | conidiospores                     | conidiospores                     |
| Type de spores           |   |                        |  |                                   |                                   |
| Support de contamination | Cannes de maïs épandues au niveau du sol  |                        | Grains de maïs contaminés par du mycélium, épandus au sol                              | pulvérisation                     | pulvérisation                     |
| Méthode d'apport         | Précédent cultural  | épandage               | épandage   | pulvérisation                     | pulvérisation                     |
| époque                   | semis   | février                | 3 semaines avant floraison + 1 apport par semaine ?<br>10 g / m <sup>2</sup> (à 50g ?) | début floraison                   | début floraison                   |
| Quantité                 |   |                        |  | 10 <sup>6</sup> sp/ml<br>600 l/ha | 10 <sup>6</sup> sp/ml<br>600 l/ha |
| Apport d'eau             | Irrigation journalière depuis l'épandage des grains ou 1 semaine avant flo jusqu'à 1 à 3 semaines après floraison |                        |  |                                   |                                   |
| Forme d'apport           | Sprinkler pour mouillage du sol puis brumisation ou sinon, sprinkler tout du long                                 |                        |  |                                   |                                   |
| Quand                    | Soir et matin   |                        |  |                                   |                                   |
| Quantité                 | 0 à 10 mm / j selon le climat (pluies) avec un total journalier minimal de 5 mm / j                               |                        |  |                                   |                                   |
| Caractéristiques         | naturelle   | naturelle              | souche labo productrice DON  | souche labo productrice DON       | souche labo productrice DON       |
| Fourniture               | agricole  | récup agricole automne | souche labo croissance avril   | production mai ou congélation     | production mai ou congélation     |

Tableau 2 : Conditions de réalisation des contaminations.

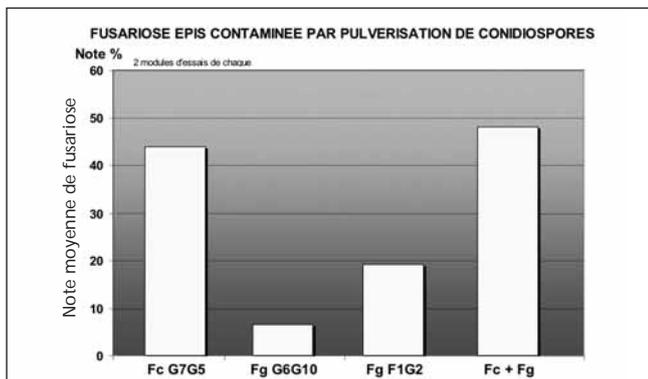


Figure 2 : Fusariose épi moyenne occasionnée en fonction des souches utilisées en pulvérisation.

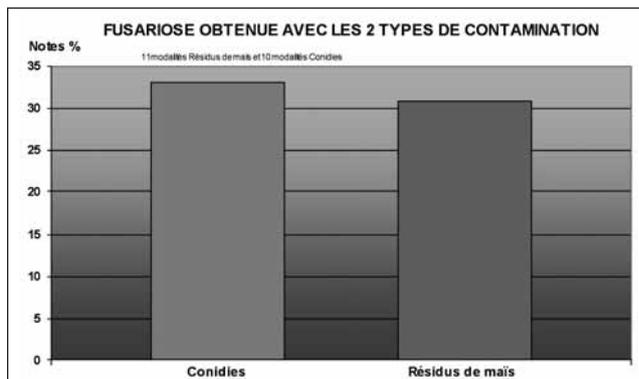


Figure 3 : Fusariose épi moyenne occasionnée en fonction des types de contaminations par pulvérisation ou par cannes de maïs.

La tendance de l'importance de la maladie avec les résidus de maïs (Figure 4) suit grossièrement le classement de l'attaque des variétés classées selon la maladie obtenue avec la pulvérisation de spores.

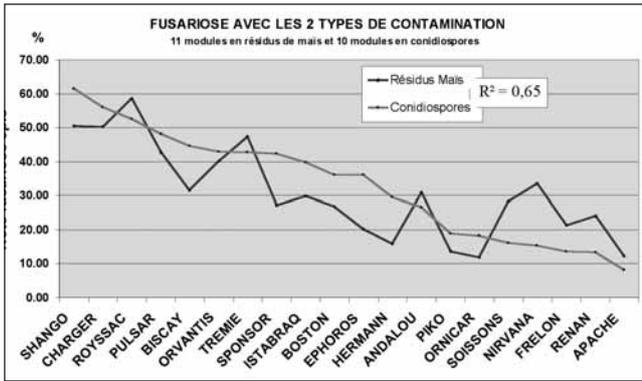


Figure 4 : Fusariose épi moyenne occasionnée par variété en fonction des contaminations par pulvérisation ou par cannes de maïs.

**Dissemination des ascospores : piègeages des ascospores à BOIGNEVILLE**

L'appareil de piégeage des spores utilisé à Boigneville permet de constater que les épis reçoivent des ascospores de l'épiaison jusqu'aux stades du début de la maturation. Le piégeage des spores n'a pas été poursuivi au-delà, étant donné que la période de sensibilité visée est essentiellement la floraison.

Le cumul des ascospores reçues par les épis pendant cette période est indiqué figure 5.

Selon cette courbe, l'arrosage ou la brumisation tout au long de la floraison et de l'évolution de la maladie, des variétés précoces à tardives (plus de trois semaines), a pour effet d'amplifier et de régulariser la libération des ascospores. La comparaison entre les deux courbes de la figure 5 montre une amplification d'environ un facteur 50 entre la situation sans brumisation et la situation brumisée.

Toutefois, l'observation journalière des ascospores capturées au niveau des épis nous montre que les contaminations par les périthèces sur les résidus de maïs

se font par lots successifs des disséminations (Figure 6).

Lors de cette expérimentation la brumisation a été arrêtée pendant les périodes pluvieuses.

Il a été considéré que les pluies devaient participer suffisamment aux contaminations. Or la courbe de la figure 6 montre que les pluies tombées en faible quantité (de 3 mm au plus) n'ont engendré que peu de dissémination de spores.

La brumisation effectuée entre ces périodes pluvieuses a permis une dissémination bien plus importante et elle a vraisemblablement permis les contaminations principales.

Cette irrégularité dans les disséminations pourrait apporter des biais en fonction de la période de sensibilité maximale de chacune des variétés. Toutefois, nous ne savons pas quel est le niveau optimal de dissémination nécessaire pour apporter suffisamment de maladie. Il est possible que la relation entre la quantité de spores et le niveau de maladie ne soit pas linéaire mais, peut-être de type exponentiel. D'autre part, les spores déposées sur les épis peuvent s'accumuler et attendre quelque temps et les meilleures conditions pour leur germination en émoussant les irrégularités journalières observées.

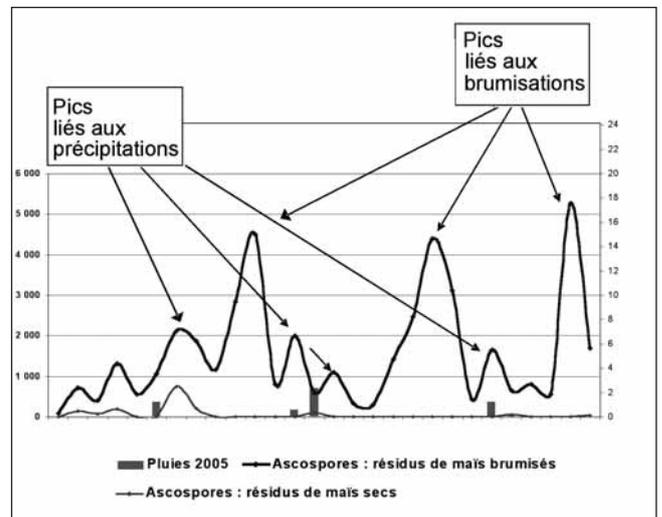


Figure 6 : Libération journalière des ascospores.

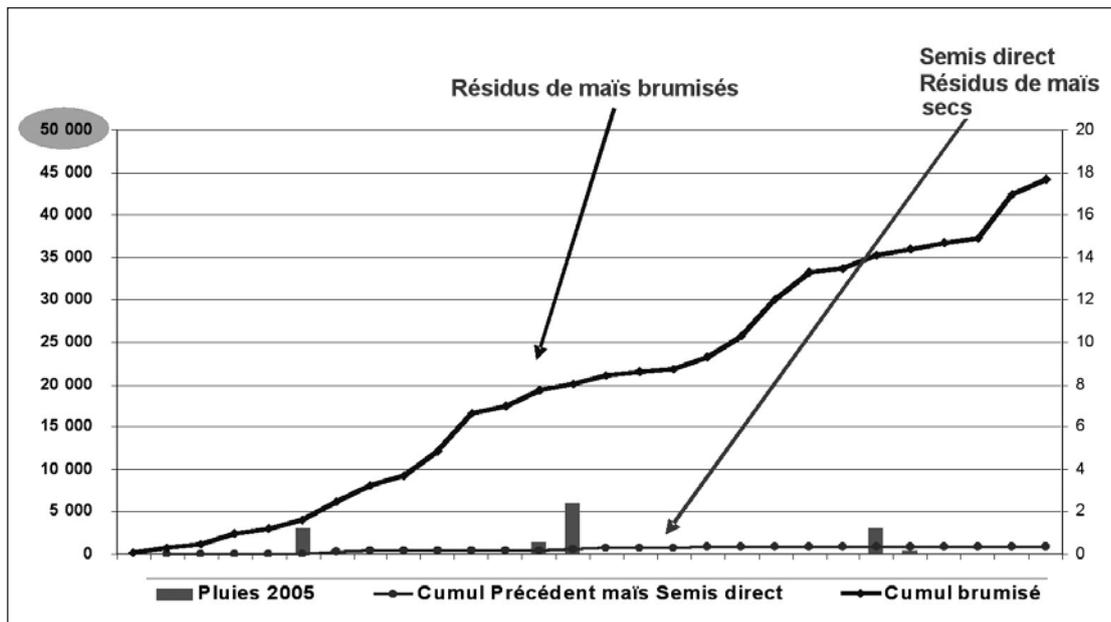


Figure 5 : Cumul des ascospores capturées au niveau des épis tout au long de la période de sensibilité floraison des variétés précoces à tardives.

### Évolution de la maladie au cours du temps

Le niveau final de la maladie n'est pas directement accessible par les notations à cause de la confusion entre la couleur blanche occasionnée par la fusariose et le dessèchement entraîné par la maturation. La dernière notation possible se situe avant le dessèchement de la maturation des autres notations antérieures sont aussi possibles et ont été réalisées. Le graphique de la figure 7 montre qu'au cours de cette période entre 250<sup>ème</sup> jour et 450<sup>ème</sup> jour et l'évolution de la fusariose n'a pas été identique pour toutes les variétés. Certaines variétés

comme Sponsor ont présenté un début de maladie tardif pour montrer un niveau de sensibilité important alors que d'autres variétés comme Shango ont montré des symptômes très précocement sans pour autant développer un niveau de maladie supérieur à celui de Sponsor.

L'époque de notation retenue pour comparer les variétés se situe donc comme un des éléments importants qui peut amener de grandes perturbations dans le classement variétal. Si l'on fait l'évaluation de la maladie par la fréquence d'épis atteints, le phénomène observé en 2005 au Rheu est encore plus flagrant (Figure 8).

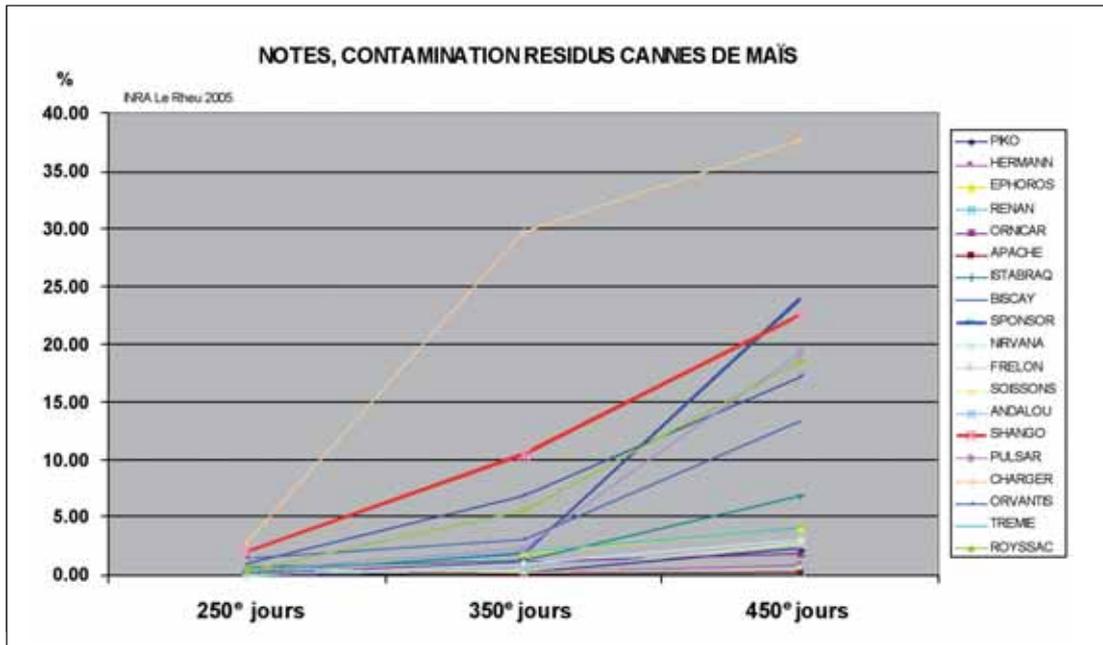


Figure 7 : Évolution de la maladie sur les épis au cours du temps pendant la période où la notation est réalisable.

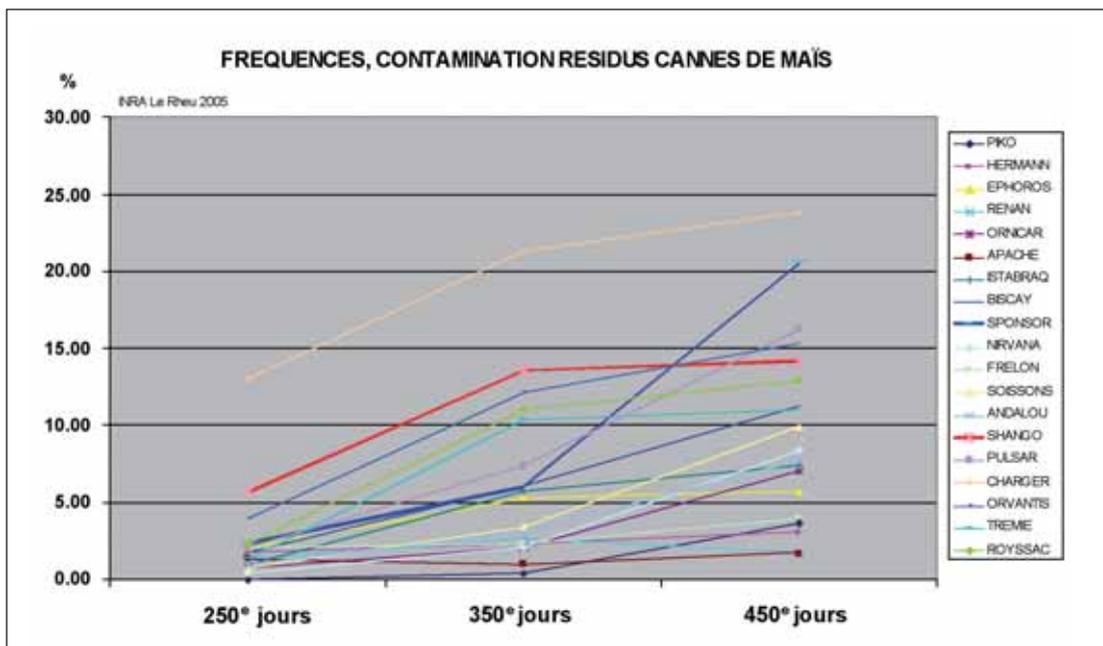


Figure 8 : Fréquence d'épis atteints au cours du temps pendant la période où la notation est réalisable.

### Relations entre les notes et fréquences

Globalement les fréquences sont un peu plus élevées que les notes (Figure 9) ce qui se comprend par le fait que la plupart des épis ne sont pas entièrement couverts par la maladie.

### Classement variétal

Sur la figure 9, les variétés de la zone de gauche avaient été répertoriées par les experts comme assez résistantes et celles de la zone centrale comme moyennement sensibles. Les résultats des 21 modules montrent que certaines variétés avaient été mal jugées. Notamment en ce qui concerne la variété Frelon qui s'avère plus résistante que prévu ou la variété Ephoros qui s'avère plus sensible.

### Variabilité variétale

D'un essai à l'autre, on a pu constater que le classement des variétés n'est pas totalement identique. En considérant tous les essais, on peut remarquer que certaines variétés ont des résultats très instables alors que d'autres sont beaucoup plus stables (Figure 10).

Le calcul de la SCE par rapport à la moyenne sur l'ensemble des résultats rend compte d'une inégalité de stabilité des variétés face à la maladie sans que ce soient les variétés sensibles qui sont les plus affectées (numéros de 1 à 20 identiques à la Figure 9).

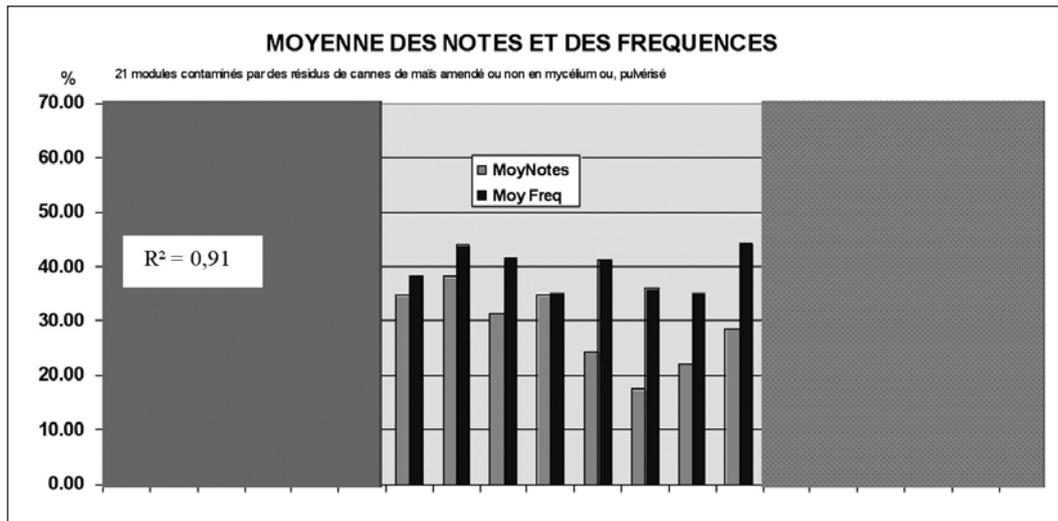


Figure 9 : Comparaison entre les fréquences d'épis atteints et les notes en pourcentage de surface couverte.

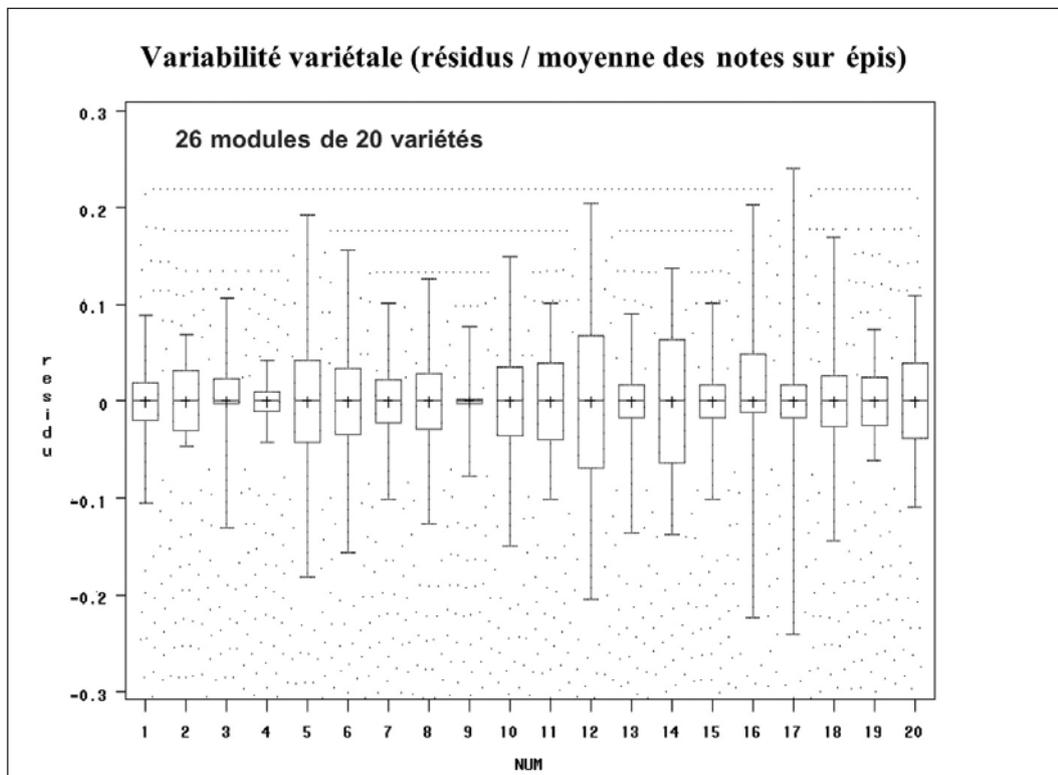


Figure 10 : Stabilité des variétés face à la fusariose des épis.

### Mycotoxines

C'est le déoxynivalénol (DON) qui est la mycotoxine la plus représentée dans ces essais. Elle correspond à ce qui est le plus souvent observé en France. Il est vraisemblable que les souches naturelles rencontrées sur les cannes de maïs des essais soient représentatives de cette situation. Pour les pulvérisations de conidies, les souches avaient été choisies en fonction de leur chémotype DON.

La représentation de tous les points des 520 analyses montrent une dispersion importante de tous les résultats consécutifs aux différentes conditions de croissance et de production des mycotoxines ( $R^2 = 0,28$ ) pour les niveaux de maladie et de croissance du *Fusarium* observés (Figure 11). La réduction des données obtenue en réalisant les moyennes par variété permet de situer plus précisément les relations entre la proportion de maladie et le niveau de mycotoxines ( $R^2 = 0,88$ ) (Figure 12).

Nous rencontrons donc pour la biosynthèse des mycotoxines un niveau de variabilité des résultats qui vient s'ajouter à celui de la variabilité des réponses variétales à la maladie et à celle du pouvoir pathogène des souches.

### Discussion

L'objectif de cette étude est de caractériser la réponse variétale, c'est-à-dire de distinguer les variations d'une variété à l'autre, parmi les variations engendrées par les conditions expérimentales qui forment un bruit de fond important. Ce bruit de fond déforme les réponses d'un essai à l'autre, à tel point qu'il est difficile de comparer les essais 2 à 2. Cette variabilité est occasionnée par les modifications au cours des stades clés, des conditions climatiques subies par les plantes et le pathogène. Les valeurs climatiques se modifient amplement d'un jour à l'autre sur les 3 semaines d'échelonnement de la floraison et s'appliquent sur les variétés et le pathogène à des stades décalés. Le climat exerce donc un effet inégal sur les facettes d'édification de la maladie pour chacune des variétés qui s'ajoute à l'effet variétal lui-même que l'on cherche à isoler.

#### Recherche du mode de contamination idéal

La maladie n'étant pas présente régulièrement, la réussite de l'expérimentation nécessite de s'assurer des contaminations et de leur régularité par un mode d'inoculation contrôlé.

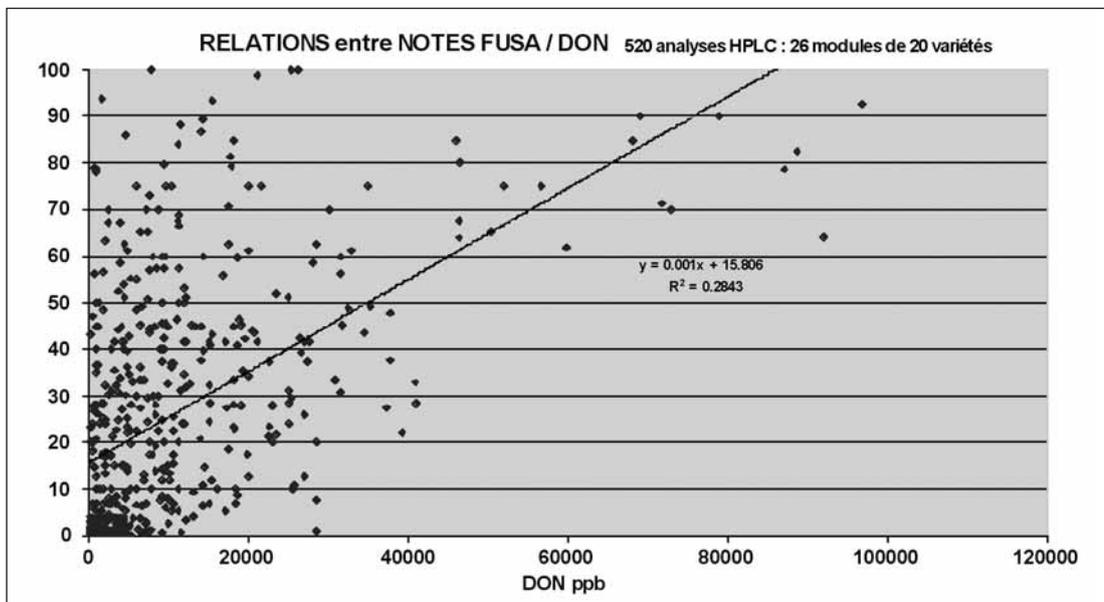


Figure 11 : Niveau de DON en fonction de la maladie pour les 520 analyses de base.

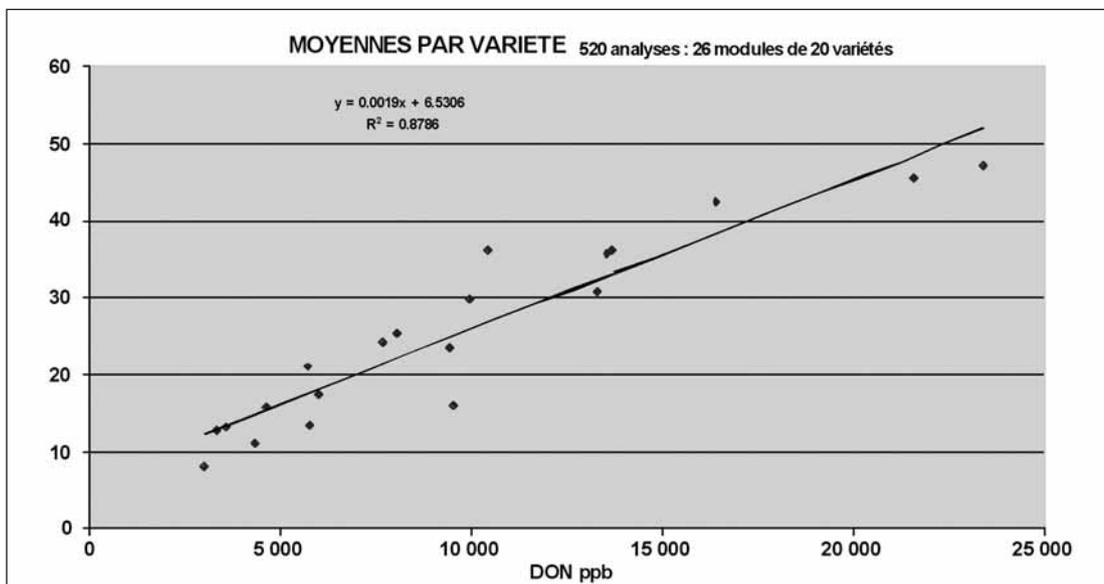


Figure 12 : Moyenne par variété des niveaux de DON en fonction de la maladie.

Du point de vue de l'équipe technique, le meilleur est celui qui permettra le maximum d'inoculations dans le temps le plus court. Il peut y avoir jusqu'à plusieurs milliers de parcelles élémentaires à contaminer.

Du point de vue du résultat, c'est celui qui permettra la meilleure distinction entre les variétés qui devra être retenu.

Deux voies d'inoculations sont couramment utilisées au champ, ce qui induit les avantages et les inconvénients suivants :

- Pulvérisation de conidiospores sur les épis au stade 71.

**Avantages :**

- maîtrise du stade de contamination : toutes les plantes sont théoriquement contaminées au même stade, ce qui doit apporter de la précision.

**Inconvénients :**

- contaminations avec des conidies qui ne représentent pas la voie naturelle principale,
- préparation de l'inoculum compliqué, nécessite un laboratoire,
- l'épandage des spores nécessite une opération de pulvérisation avec un matériel d'expérimentation,
- dans l'absolu, il faudrait une pulvérisation pour le stade 71 adaptée à chaque variété. Comme cela se révèle impossible, les variétés de précocités proches sont regroupées. Ceci induit des fluctuations dans la réceptivité de la variété à l'inoculum et fait perdre de la précision,
- chaque date de contamination est soumise à des événements climatiques différents.

- Contaminations semi naturelles par épandage de résidus de cannes de maïs au sol.

**Avantages :**

- contamination par les ascospores qui représentent la voie naturelle principale,
- épandages en fin d'hiver, pas de pulvérisations,
- couverture en inoculations proche des conditions naturelles agricoles.

**Inconvénients :**

- pas de maîtrise des stades de contamination,
- épuisement de l'inoculum au cours du temps possible,
- temps de réception d'inoculum plus long pour les variétés précoces que pour les variétés tardives.

**D'autre part :**

- Quel que soit le mode d'inoculation, les températures moyennes pour les stades sensibles des variétés précoces sont presque toujours différentes (plus basses...) que celle des variétés tardives.
- Les pulvérisations contaminent la totalité de la surface des épis et ne permettent de suivre que la résistance à l'infection des épis (Résistance de type I).
- Les contaminations par ascospores des résidus de maïs moins denses, ne contaminent que des points localisés de l'épi et les notations rendent compte sans distinction d'un ensemble de résistance à la contamination des épis (Type I), de la résistance à l'extension des symptômes (Type II) ainsi que de la résistance au dessèchement du DON (bleaching).

Les résultats pour les deux types de contamination sont pratiquement du même niveau (Figure 3). Les résultats individuels variété par variété (Figure 4) montrent une bonne corrélation ( $R^2=0,65$ ) mais les 2 pratiques n'étant pas en comparaison sur les mêmes essais, ne permettent pas d'avancer si elles induisent des différences variétales.

Les deux types de contamination amenant en moyenne la même quantité de maladie, il n'y a pas de raison d'éliminer ou de favoriser un type de contamination par rapport à l'autre dans ces essais.

S'il existait des différences, il serait encore difficile de dire laquelle des deux représente mieux la réalité agricole.

#### **Importance de la souche utilisée en inoculation**

Le choix des souches a son importance par rapport à l'objectif poursuivi :

- L'utilisation de résidus de cannes de maïs permet de travailler avec l'état naturel du pathogène. En ce qui concerne *Fusarium graminearum*, Brygoo en 2007 a indiqué que la variabilité au champ est presque aussi importante que la variabilité régionale. Il est probable que cela se retrouve dans les résidus de culture que l'on épand dans nos essais. Reste à mettre en hypothèse que c'est également réparti sur l'ensemble des résidus utilisés, sinon il existe un risque d'avoir des différences d'un bout de l'essai à l'autre. D'autre part, on ne contrôle pas le chémotype des souches présentes ce qui peut amener quelques déviations dans un essai. Dans cette série d'expérimentation, 520 modalités ont été contrôlées (bulk de 3 répétitions), aucune déviation n'a été enregistrée.
- Le pouvoir pathogène des 3 souches sélectionnées pour ces essais a été mesuré par la notation maladie. Les résultats sont très différents d'une souche à l'autre (Figure 2).
  - La souche F6/G10 qui est hyperproductrice de DON avec un profil DON-ZEA (INRA MycSA Bordeaux) a révélé un faible pouvoir pathogène dans ces essais ou tout au moins irrégulier. Il est difficile d'utiliser de telles souches et ce sont les souches F1/G2 (chémo-type DON) à pouvoir pathogène moyen et G7/G5 à fort pouvoir pathogène qui ont été utilisées.
  - G7/G5 : cette souche n'est pas interchangeable et ne peut être utilisée que pour les pulvérisations de conidies car il s'agit de *Fusarium culmorum* dont les conidies, sont faciles à produire mais qui ne produit pas d'ascospores.
  - F1/G2 : il s'agit ici de *Fusarium graminearum* qui peut être utilisé pour les pulvérisations de conidies et l'ajout de mycélium aux cannes de maïs, afin d'augmenter la production d'ascospores.

L'utilisation de *Fusarium culmorum* est fréquente dans ce type d'essai pour la relative facilité de production des conidies. Cette espèce était parfois considérée comme majoritaire jusqu'au début des années 90. Depuis la fin des années 90 jusqu'à maintenant, *Fusarium graminearum* est nettement dominant (Dubournet, et al., 2008). L'inoculum conidien étant plus difficile à produire, l'utilisation de *F. culmorum* a perduré sans que l'on puisse faire de distinction entre les 2 espèces dans les résultats de classement variétal, comme dans cette série d'essais.

#### **Disséminations des ascospores obtenues sur résidus de cannes de maïs**

Les ascospores sont produites dans les périthèces qui se constituent à la surface des résidus de cannes de maïs.

Pour que les ascospores soient produites en masse à la floraison des blés, il faut s'assurer de l'humidité du sol dans les trois semaines précédentes. Un arrosage est donc régulièrement nécessaire en cas de sol sec.

À la floraison, l'arrosage ou la brumisation régulière des épis doit être réalisé de façon à permettre la germination des spores et la contamination, ainsi que la croissance du

mycélium dans les organes floraux. Cet arrosage ou brumisation doit être régulièrement poursuivi tout au long de la floraison des variétés précoces aux variétés tardives. Cela doit donc durer au moins trois semaines.

Un piégeage d'ascospores a été réalisé à Boigneville et a permis de constater qu'entre le 24 mai et le 30 juin 2005, les ascospores ont été régulièrement disséminées (Fig. 5). Cependant, l'observation journalière (Fig. 6) a montré qu'il était nécessaire de ne pas s'occuper des faibles pluies qui n'apportent pas assez d'humidité. Il faut continuer régulièrement la brumisation pour ne pas engendrer trop de baisse de régime de la dissémination.

La figure 5 montre aussi que les variétés précoces reçoivent plus de contaminants que les variétés tardives.

#### *Évolution de la maladie au cours du temps*

L'évolution de la maladie notée au cours du temps, représentée sur les fig. 7 et 8, montre qu'elle est assez semblable d'une variété à l'autre. Toutefois nous avons observé dans un essai le comportement atypique de deux variétés.

Les symptômes de la variété Sponsor sont apparus modestement entre 250 °C jour et 350 °C jour après la floraison puis se sont développés très rapidement à un niveau élevé.

Les symptômes de la variété Shango sont apparus très rapidement en forte quantité à 250 °C jour puis ont ralenti leur progression pour terminer à un niveau modeste.

L'évolution de la maladie sur les épis progresse donc en majorité de façon identique d'une variété à l'autre mais dans quelques cas une évolution différente, fonction de la durée d'incubation et de la vitesse de croissance, peut-être observée. Il est donc important de réaliser les notations tardives qui rendent le mieux compte du niveau final de la maladie, objet de l'étude.

#### *Relations entre notes et fréquences*

L'utilisation de la fréquence à la place des notes de proportion de surface d'épis atteints pourrait être utile dans la mesure où elle est beaucoup plus rapide. La figure 9 montre une bonne relation entre ces deux paramètres :  $R^2 = 0,91$ .

Il faut toutefois rester prudent, car la fréquence ne représente qu'une information partielle de la résistance de type I.

#### *Variabilité des variétés*

La variabilité de chacune des variétés est assez différente. Dans ces essais par exemple, la variété 4 est apparue stable alors que la variété 12 est apparue instable. Ou pourrait-on dire réactive aux phénomènes environnementaux ? Ce phénomène ajoute non seulement une difficulté dans le classement, mais aussi un problème de décisions.

S'il est assez facile de placer une variété stable sur l'échelle de résistance, pour une variété instable il faudra déterminer si l'on prend la moyenne ou un indice comme le premier quartile pour classer la variété ou bien encore des valeurs inférieures ou supérieures observées.

D'autre part, cette variabilité produit un bruit de fond important masquant la résistance des variétés et qu'il va falloir abaisser. Dans cette situation la méthode statistique la plus courante est de multiplier les essais pour que s'annulent les effets positifs et négatifs du bruit de fond et qu'émerge l'effet toujours dans le même sens du phénomène recherché. Dans notre cas, il sera donc

nécessaire de faire un effort pour augmenter le nombre d'essais à mettre en place, mais cela restera limité pour des raisons pratiques. Bockus en 2007 relatait dans leurs expérimentations en randomisation totale à 4 répétitions qu'il fallait 5 essais valables pour obtenir une valeur de résistance de 1 à 9 avec +/- 1,5 de marge d'erreurs et un  $R^2$  de corrélation de 0,66 à 0,85 avec les tests en serre. Or nous avons émis le souhait d'une marge d'erreur plus faible de +/- 1. Il est vraisemblable que pour y parvenir, nous devons insister sur la segmentation des précocités pour y ajouter plusieurs références de résistance dans chaque segment.

Pour des séries pas trop importantes, une première information précieuse pourrait être obtenue en conditions contrôlées (serre, chambre climatique) avec des pulvérisations sur épis au stade 71, mais cela ne rendrait compte que de la résistance interne de la plante. Les paramètres naturels d'adaptation à l'environnement (voies de contamination, moyennes climatiques régionales, phénomène d'échappement...) ne pouvant être expérimentés qu'au champ.

#### *Mycotoxines*

Les 520 analyses multitrichothécènes nous ont montré que les grains de ces essais inoculés étaient régulièrement contaminés en DON.

Les résultats parcellaires, comme il est fréquent, ne présentent pas entre eux de relation directe entre la maladie et la mycotoxine ( $R^2 = 0,28$ ). En effet, les symptômes sont la réaction de la plante à l'agression : en fonction du climat, la quantité de symptôme formé par unité de mycélium s'avère différente comme est différente la quantité de mycotoxines produite par unité de mycélium.

La réaction variétale a aussi le même effet, mais comme c'est l'effet que l'on cherche à mettre en évidence, il suffira d'effectuer la moyenne par variété pour annuler les différents effets climatiques et révéler l'effet variétal de correspondance entre la Notation maladie et le niveau de DON :  $R^2 = 0,88$ .

Cette correspondance n'étant pas parfaite, nous trouverons quelques différences dans le classement variétal entre le classement notations et le classement mycotoxines. Par exemple, pour un niveau de DON proche de 10 000 ppb, la variété Nirvana ne présente que 16 % de fusariose sur épis alors que la variété Pulsar en présente 36 % soit 20 % d'écart, ce qui est remarquable.

La résistance aux mycotoxines ne semble donc pas tout à fait superposable à la résistance à la maladie.

## **Conclusion**

Douze essais ont été réalisés afin de dégager les éléments d'une méthode d'expérimentation fiable pour mesurer la résistance des blés tendres à la fusariose des épis. Ils rassemblaient 23 modules de 20 variétés de précocités 4 à 7,5 et de 3 niveaux de sensibilité. Ils ont été réalisés en 2005 et 2006, à l'INRA, au GEVES, chez DESPREZ, SERASEM, R2N, UNISIGMA et à ARVALIS. Une des difficultés est de mettre en commun des résultats obtenus parfois de façon différente et diminuant la précision des conclusions.

La plus grosse difficulté est de réduire le bruit de fond dû à l'effet climatique sur la maladie au cours des 3 semaines que représentent l'écart des précocités floraison des variétés.

Pour réduire ce bruit de fond, il sera nécessaire d'augmenter le nombre d'essais mais aussi de structurer les essais avec de nombreuses variétés de référence stables. Il serait aussi nécessaire d'intégrer dans tous les groupes de précocité une même variété semée à des dates différentes pour mieux mesurer l'impact climatique sur l'essai afin de pouvoir le déduire.

La contamination artificielle en plein champ est nécessaire pour couvrir cet espace de temps et pour palier à la faible fréquence de la maladie sur le terrain. Les 2 méthodes de contamination expérimentées : pulvérisations de conidiospores sur les épis au stade début floraison ou épandage de résidus de cannes de maïs produisant des périthèces, se sont avérées comparables. Elles peuvent être toutes deux utilisées en sachant qu'elles ne sont pas tout à fait équivalentes en matière de type de résistance observée (Types I, II et III).

Pour garder le différentiel variétal le plus large possible, il ne faudra pas hésiter à éliminer tout ou partie des essais à trop faible ou trop fort niveau de maladie. En ce qui concerne les notations, il faudra utiliser préférentiellement la notation la plus tardive avant le virage de la maturation des épis qui représente le mieux la maladie sur le grain, produit final consommé.

Pour une étude de classement des variétés, il serait utile de normaliser les données afin d'éliminer encore une

partie du bruit de fond. Selon les objectifs, il pourrait être utile d'utiliser la fréquence d'épis atteints qui est une donnée rapide à acquérir, sachant qu'elle représente plutôt la résistance de type I.

Des paramètres comme l'aire sous la courbe pourraient être utiles dans la mesure où elles tamponnent l'évolution de la maladie et pourraient gommer une partie de la variabilité dû au bruit de fond.

Si les coûts des technologies évoluent, il serait utile de se servir des techniques PCR, et surtout des automates de broyage et de PCR quantitative pour fiabiliser les résultats. Ces techniques permettent de suivre la maladie à n'importe quelle époque de son développement alors que les notations sont stoppées au virage de la maturité des glumes. L'application au grain à la récolte permettrait de se passer de l'extrapolation implicite que l'on effectue avec les notations. Il faut toutefois porter attention au fait que ces analyses sont destructrices des grains analysés.

Pour diminuer le nombre d'essais de plein champ à mettre en place, il pourrait aussi être utile de tester les variétés en conditions contrôlées (serres ou chambres climatiques) pour déterminer la résistance intrinsèque des variétés. Les particularités climatiques régionales complémentaires et les résistances d'échappement s'exprimant dans les essais de plein champ.

## Références bibliographiques

**Bockus, W. W., SU, Z., Garrett, K. A., Gill, B. S., Stack, J. P., Fritz, A. K., Roozeboom, K. L., and Martin, T. J.** 2007. Number of experiments needed to determine wheat disease phenotypes for four wheat diseases. *Plant Dis.* 91:103-108.

**Brygoo Y., Gautier A.**, 2007. Polymorphisme moléculaire des souches de *Fusarium* isolées sur épis de blé et de maïs en France. Colloque Mycotoxines fusariennes des céréales – Arcachon – 11//13 septembre 2007. [www.symposcience.org](http://www.symposcience.org) 22p.

**Caron D., Malavergne D., Dupont de dinechin L.**, 2007. Impact des facteurs agro environnementaux sur le niveau d'inoculum et la cinétique de dissémination des ascospores de *Gibberella zeae*. Colloque Mycotoxines fusariennes des céréales – Arcachon – 11//13 septembre 2007. [www.symposcience.org](http://www.symposcience.org) 12p.

**Dubournet P., Gestat T., Maily T.**, 2008. *Fusarium* head blight: main conclusion of the Bayer Cropscience France monitoring. *Cereal Research Communications*, Vol 36, Supplementum B. pp. 703-706.

# Sensibilité à la germination avant récolte et aux bas temps de chute de Hagberg : déterminants, enjeux et évaluation variétale

Philippe GATE\*<sup>1</sup>, Marie-Laure CASALS<sup>2</sup>, Jean Albert FOUGEREUX<sup>2</sup>, Pascal GIRAUDEAU<sup>3</sup>, Françoise CORBINEAU<sup>4</sup>, Benoît MÉLÉARD<sup>5</sup>, Philippe GRAPPIN<sup>6</sup>,

\* **Coordinateur** : Philippe GATE, p.gate@arvalisinstitutduvegetal.fr, Tél. : 01 30 12 96 20

1 - ARVALIS - Institut du végétal - La Minière, 78280 Guyancourt

2 - FNAMS - Impasse Le Verger, 49800 Brain sur Authion

3 - CETAC - 7 rue Coq Héron, 75030 Paris Cedex 01

4 - LPVA - UPMC P6, Site d'Ivry, boîte 152 - 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05

5 - ARVALIS - Institut du végétal - 91720 Boigneville

6 - UMR INRA INA PG, Biologie des Semences - 16 rue Claude Bernard, 75005 Paris

Étudiantes ayant effectué leur mémoire de fin d'études dans le cadre de ce projet :

Anne Dorothée Lesergent (2005) et Sophie Simon (2006) - DESS P et M Curie, Paris ; Virginie Lucas (2007) INH Angers.

Les aptitudes à la panification d'un blé sont largement affectées en présence de grains germés ou d'activité précoce des alpha-amylases.

Le déclenchement de ces deux phénomènes est fonction de facteurs génétiques et variétaux en relation étroite avec les conditions environnementales.

Par ailleurs, la germination avant récolte et l'indice de temps de chute de Hagberg (test prédictif de l'intensité de l'activité des alpha-amylases) ne sont pas toujours liés. Si effectivement le processus de germination requiert préalablement l'hydrolyse d'une partie des réserves amylacées, une activité alpha-amylasique peut apparaître indépendamment. En ce cas, le déclenchement est plus précoce et fait appel à d'autres mécanismes physiologiques et génétiques.

Dans le cadre de ce projet, nous tentons d'identifier les différents déterminants de la germination avant récolte et du temps de chute de Hagberg afin de formaliser leur rôle respectif dans l'expression de ces deux processus. Sur cette base de compréhension, nous proposons des indicateurs robustes capables de classer spécifiquement les variétés vis-à-vis de ces deux phénomènes.

## ► La germination sur pied

La germination sur pied des céréales correspond à la germination des grains dans l'épi avant la récolte (Gate, 1995). Elle résulte d'une levée de dormance accompagnée de conditions favorables à la germination. Rappelons que la germination sensu stricto correspond à la percée de la radicule hors des téguments de la graine. Elle dépend principalement de la disponibilité en eau et en oxygène et de la température (Finch-Savage et Leubner-Metzger, 2006).

La dormance constitue le facteur principal de la résistance à la germination sur pied. La dormance des céréales se définit comme une inaptitude de la semence à germer à des températures élevées, inaptitude qui est levée dès lors que les grains sont soumis à des températures fraîches. Une semence non dormante sera donc capable de germer dans une large gamme de températures alors qu'une semence

dormante germera uniquement à des températures basses de l'ordre de 10 °C (Corbineau *et al.*, 1993).

Il existe une relation très étroite entre la dormance et la germination sur pied : les variétés les plus sensibles à la germination sur pied sont aussi celles qui germent le plus facilement dans une large étendue de températures (Gate, 1995).

A partir de ces résultats, un indice de dormance (ID) a été défini par Gate (1995) comme suit :

$$ID = \frac{CG(10\text{ °C}) - CG(25\text{ °C})}{CG(10\text{ °C})}$$

où CG (10 °C) est la capacité germinative à 10 °C et CG (25 °C), la capacité germinative à 25 °C.

La sensibilité à la germination sur pied dépend des variétés, de par une dormance plus ou moins longue : la période de dormance peut aller de quelques jours à quelques mois selon les variétés (Belderok, 1965). Le niveau de tolérance des variétés est jugé au moment de leur inscription au Catalogue officiel par un test *in vitro* mis au point par le "GEVES" (Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés et des Semences, par Renard et Lerebour).

Ces différences variétales peuvent s'expliquer par les variations de composition en composés phénoliques, composés qui piègent l'oxygène nécessaire à la germination (Corbineau *et al.*, 1993) et en inhibiteurs de la germination (catéchine) (King, 1989). Elles peuvent aussi être fonction de la structure de l'épi, de la présence ou non de barbes, de l'épaisseur des téguments, ces éléments pouvant réduire la disponibilité en eau et en oxygène du grain et inhiber la germination (Gate, 1998).

Le ratio acide abscissique (ABA) sur *gibbérélines* (GA), et non les quantités absolues de ces deux hormones, contrôlerait la dormance et la germination. Ainsi, le maintien de la dormance nécessite un haut ratio ABA/GA et la levée de dormance résulte d'une nette augmentation de la synthèse en GA et de la dégradation de l'ABA, amenant à un faible

ratio ABA/GA. Associé au ratio ABA/GA, le passage de l'état dormant à l'état non dormant se caractérise par une baisse de la sensibilité à l'ABA et une hausse de la sensibilité aux GAs (Finch-Savage et Leubner-Metzger, 2006).

Le climat exerce un rôle déterminant sur la germination sur pied dans la mesure où même une variété tolérante peut germer suite à des conditions climatiques particulières (Gate, 1998). Il semble que le climat intervienne à deux étapes distinctes, qui se succèdent dans le temps au cours du remplissage du grain : au début du remplissage, chaque parcelle se caractérise par une durée de dormance potentielle, fonction de la variété : cette durée est d'autant plus longue en jours que la variété est tolérante (Belderok, 1965 ; Gate, 1998). Cette durée serait par la suite plus ou moins rapidement réduite par le climat au cours du remplissage à partir d'un stade proche de la maturité physiologique (Belderok, 1965). D'après cet auteur, ce sont les excès de chaleur reçus par le grain ( $T > 12,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , à partir de ce stade) qui sont à l'origine de la diminution de la durée de dormance. Cependant cette relation n'est pas corroborée par tous les auteurs (Lunn *et al.*, 2002 ; Strand, 1989). De plus, tous les auteurs ne sont pas d'accord non plus sur le début de la période de sensibilité du grain aux fortes températures établie par Belderok.

### ► Le temps de chute de Hagberg (TCH)

Une activité alpha-amylasique peut apparaître sans pour autant se traduire par un déclenchement de la germination (Lunn *et al.*, 2001). En ce cas, il s'agit de déclenchements précoces qui résultent de phénomènes d'entrées et de sorties d'eau (donc d'oxygène) dans les grains. L'étude de Sophie Simon (2006) a montré la significativité (70 %) du facteur pluie dans l'explication du TCH avec un effet préjudiciable des pluies seulement après la maturité physiologique. Cet effet fortement préjudiciable de la pluie se retrouve aussi dans une étude de Mares (1993), avec une relation significative entre la chute du TCH et le cumul des pluies pendant 20 jours avant la récolte.

Vis-à-vis de la sensibilité variétale à la germination, les acquis mettent en évidence deux freins directement conditionnés par le climat :

- un frein température, fonction de la variété et lié à la dormance du grain qui se formalise par le fait que les variétés germent dans une gamme plus ou moins large de température,
- un frein imbibition d'eau (et disponibilité en O<sub>2</sub>), susceptible lui aussi d'être variétal.

Vis-à-vis du TCH, il apparaît aussi important de tester si le deuxième frein est également dans ce cadre d'origine variétale.

Par ailleurs, il apparaît important de vérifier si l'action des excès de chaleur débute à partir de la maturité physiologique ou si la dormance peut être modifiée par des événements plus précoces.

Les entrées d'eau dans le grain constituant un élément clé dans le déclenchement des deux phénomènes (germination et TCH), il nous a semblé nécessaire de concevoir un modèle de dessiccation capable de prendre en charge l'action des pluies.

Enfin, nous avons également comme objectif de construire un modèle dynamique d'évolution du TCH en fonction de la pluie ; les modèles actuels sont statiques et ne permettent pas de recalage en cours de dessiccation (Simon, 2006).

## 1. Matériel et méthode

Des expérimentations spécifiques comportant 4 variétés de sensibilité distincte (Soissons, Récital, Caphorn et Charger) ont été mises en place dans différents types de milieu et sur plusieurs années. Afin d'obtenir des conditions environnementales variées, des recours à des dates de semis échelonnées ou à la brumisation ont été effectués.

Au cours de la formation et de la dessiccation des grains, des grains ont été prélevés dans le but de décrire l'évolution de certains paramètres : teneur en eau des grains, faculté germinative à 4 niveaux de température, taux de germination *in vitro* et au champ, activité  $\alpha$ -amylasique, ainsi que l'indice de temps de chute de Hagberg.

Les tests de germination aux différentes températures ont permis de calculer un indice de dormance.

Ce premier dispositif est complété par des expérimentations plus classiques de comparaison de variétés. Environ 25 variétés ont été semées sur 2 années et dans 8 lieux géographiquement distincts (réseau CETAC et réseau ARVALIS). Sur ces essais ont été effectués des prélèvements de grains issus de la récolte, destinés à l'estimation de l'indice de dormance et au TCH.

Nous avons également testé si la détection immunoenzymatique de la L-isoaspartylméthyltransférase (PIMT) peut constituer un marqueur biochimique d'évaluation de la sensibilité à la germination.

## 2. Principaux résultats

### ► Évolution de l'indice de dormance : sensibilité variétale à la température

Quelle que soit la sensibilité de la variété, cette dernière est capable de germer à basse température ( $10 \text{ }^\circ\text{C}$ ) à partir d'un stade identique que l'on peut estimer en quantité de chaleur reçue par le grain depuis la floraison.

La figure 1 rassemble les situations pour les deux variétés les plus éloignées vis-à-vis de leur sensibilité à la germination (Soissons, la plus tolérante et Récital, la plus sensible). Pour les différentes années et les deux lieux Brain sur l'Authion (Maine et Loire) et La Minière (Yvelines), on constate que la capacité germinative à  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  suit une loi identique. La capacité germinative à  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  est atteinte quels que soient les sites-années, à une date correspondant en somme de température à la maturité physiologique.

En revanche ce qui différencie le comportement des variétés est leur sensibilité propre à germer en fonction des températures plus élevées ( $> 10 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

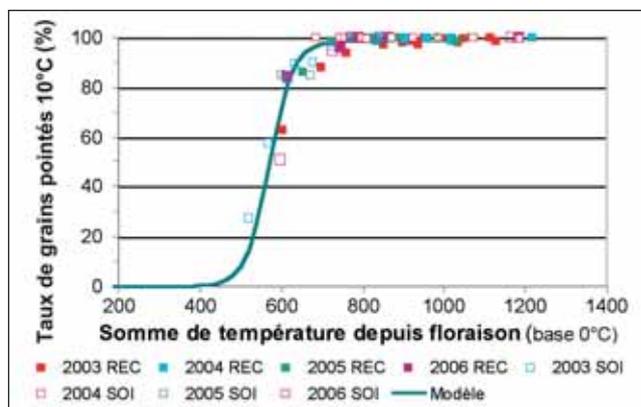


Figure 1 : Évolution du taux de grains germés à  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  pour Récital (sensible) et Soissons (tolérant) en fonction des sommes de  $T > 10 \text{ }^\circ\text{C}$  depuis la floraison.

On note effectivement un écart d'indices de dormance quasi constant entre les deux variétés et significatifs (Figure 2). Une seule année sur le site de Brain fait exception, caractérisée par un indice bas y compris sur la variété tolérante.

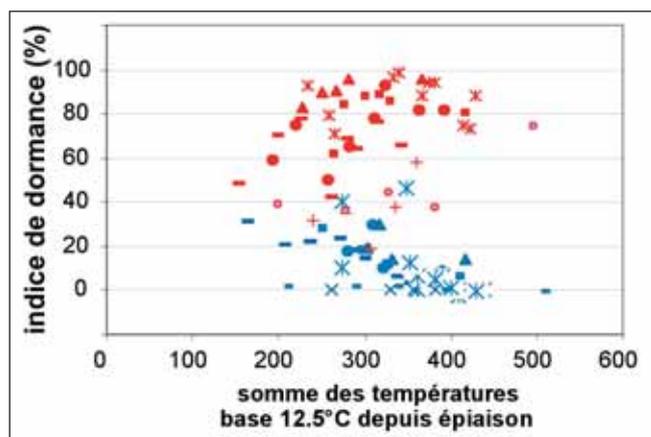
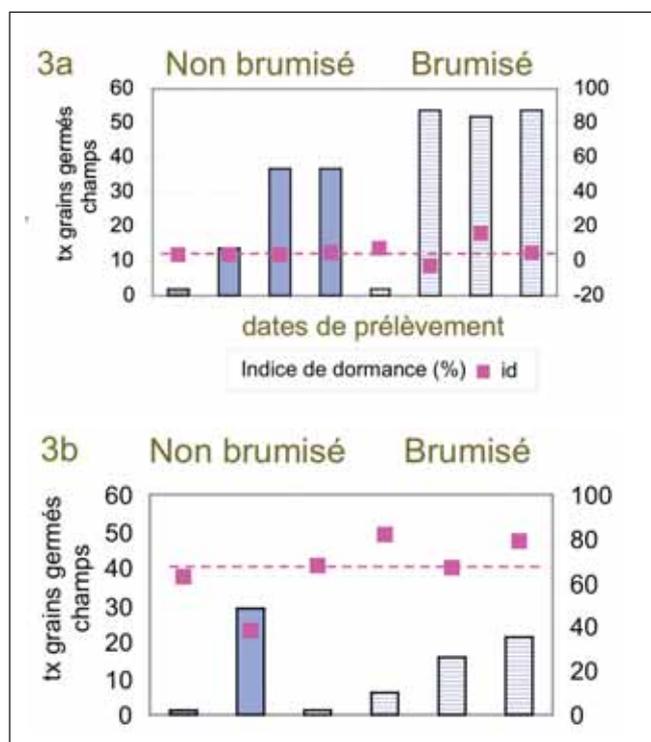


Figure 2 : Évolution de l'indice de dormance (10 et 25 °C) pour Réctal (points bleus) et Soissons (points rouges) en fonction de la quantité de chaleur reçue par le grain.

En fonction de la température reçue depuis la floraison, il est possible par variété d'évaluer son indice de dormance et d'en déduire par la suite son évolution. Comparativement à d'autres indicateurs comme le pourcentage de grains germés *in vitro* ou *in situ*, l'indice de dormance calculé sur la base de tests de faculté germinative à 2 températures (10 et 25 °C) s'avère beaucoup moins conditionné par les variations locales de l'environnement, notamment celles liées aux entrées d'eau. A titre d'exemple, les figures 3a et 3b illustrent sur une même parcelle, l'évolution comparée au cours du temps de l'indice de dormance et du taux de grains germés, avec et sans brumisation.



Figures 3a et 3 b : Évolution du taux de grains germés et l'indice de dormance (id) (à 10 et 25 °C) pour Réctal (a) et Soissons (b) en fonction des dates de prélèvement pour le témoin climatique (à gauche) et le traitement brumisé (résultats acquis à Brain).

Les mesures d'indice de dormance effectuées sur plusieurs années et un certain nombre de sites différenciés ont permis d'apporter des éléments nouveaux quant à son déterminisme climatique.

Tout d'abord, il apparaît clairement que l'indice de dormance pour une même variété peut être différent dès la maturité physiologique. Par exemple, pour Soissons si la moyenne est de l'ordre de 80 %, l'étendue varie de 20 à 100. En outre, le mode d'action de la température pour cette phase précoce précédant la maturité physiologique ne correspond pas à celui décrit dans la littérature ; nos références dévoilent en effet que la quantité de chaleur (température excédant 12,5 °C) augmente la dormance (Figure 4).

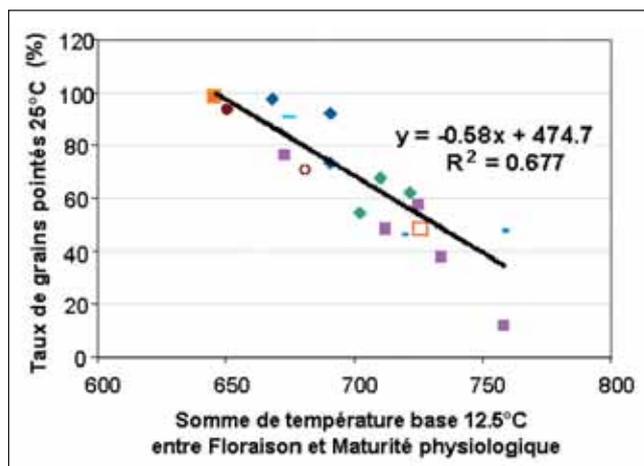


Figure 4 : Évolution du taux de grains germés à 25 °C en fonction de la somme de T °C base 12,5 entre la floraison et la maturité physiologique. Variété Soissons tous sites et années.

Entre la maturité physiologique et la récolte, nous retrouvons les mêmes lois que celles présentées dans la bibliographie : la quantité de chaleur lors de cette deuxième phase réduit la dormance. Avec notre jeu de données, nous concluons que la quantité de chaleur explique 70 % de la variation de l'indice relevé à la récolte ; toutefois, la valeur de l'indice à la maturité physiologique en explique plus de 80 %.

Par ailleurs, vis-à-vis de la dormance, nous n'avons pas trouvé de liens ou d'évolutions cohérentes entre le taux de grains germés et la quantité d'anticorps détectée. La quantité de PIMT induite au cours de la maturation n'est pas en relation avec la sensibilité variétale ; elle est en revanche davantage fonction du stade de prélèvement et des conditions hydriques.

#### ► Le facteur hydrique : impact variétal marginal

L'expression de la germination nécessite une entrée d'eau dans le grain. D'après nos résultats, cette entrée d'eau ne correspond pas à une prise d'eau minimale, mais à l'atteinte d'une teneur en eau seuil, proche de 37 %. Cette valeur seuil a été établie *in vitro*, via des pesées de grains récoltés au moment du prélèvement (différents stades en ont fait l'objet) puis au moment du pointage. Également, l'analyse des situations aux champs a permis de faire le même diagnostic convergent.

Cette aptitude à l'entrée d'eau est fonction de la teneur initiale : plus un grain est sec et plus il est capable de prendre rapidement de l'humidité. En revanche, cette capacité n'est que très peu influencée par la variété, ce qui renforce la pertinence de l'indicateur indice de dormance pour caractériser la sensibilité à la germination sur pied.

Mais pour une variété sensible, si la germination s'exprime pour une même teneur en eau seuil, un séjour de quelques jours seulement à une telle humidité permet la germination. Pour une variété tolérante, la durée nécessaire à une telle humidité s'avère beaucoup plus grande.

Par ailleurs, l'ensemble des données de teneur en eau des grains a permis de construire un modèle de dessiccation simulant les sorties d'eau (dessiccation) et les entrées (imbibition, suite à la pluie). Il s'agit d'un modèle dynamique à pas de temps journalier.

*Le classement des variétés à la germination sur pied : par l'indice de dormance*

Compte tenu des résultats présentés ci-dessus, nous concluons que le comportement de la variété au champ dépend en premier lieu de son aptitude à la germination dans une gamme plus ou moins large de température. Le facteur hydrique indispensable à l'expression de la germination ne semble pas faire intervenir la variété.

Une première étude a permis de mettre en évidence la "fenêtre" de prélèvement permettant de discriminer au mieux les variétés. Pour cela, nous avons procédé à des ajustements mathématiques de l'évolution des indices de dormance en fonction des degrés jours depuis la date d'épiaison (Figure 5). Il en ressort que la date permettant de maximiser les écarts de dormance entre les variétés se situe aux alentours de 1150 °C, soit à une date correspond à la récolte (15% d'humidité).

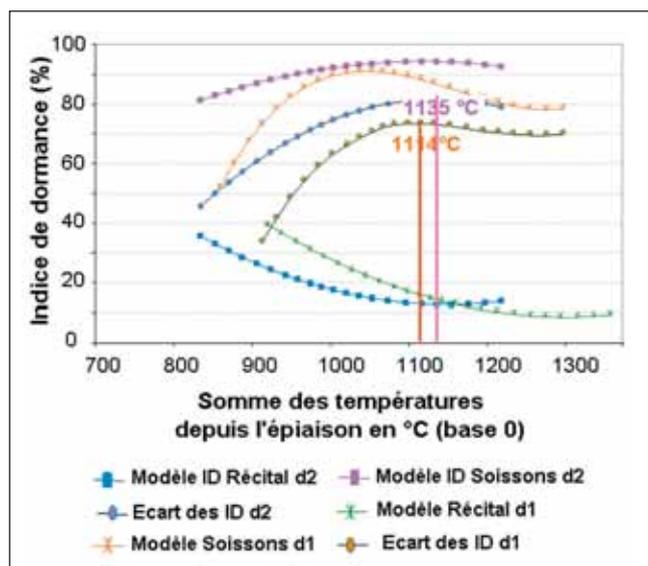


Figure 5 : Exemple d'évolution de l'indice de dormance de Soissons et de Réctal, et de l'écart sur un essai. Les évolutions correspondent à des ajustements. d1 et d2 correspondant à 2 dates de semis échelonnées.

Ainsi, mis en œuvre sur le réseau variétal multi local et sur les deux années de l'étude, ce test permet de classer les variétés de manière correcte et robuste (Figure 6). Le test de germination *in vitro* a donné quant à lui des résultats moins satisfaisants, avec notamment une forte interaction avec l'année. Au contraire, les résultats de l'indice de dormance montrent que le classement variétal est très stable d'une année à l'autre.

Ce dernier peut être exprimé selon l'ordre de la variété dans la liste (Figure 6) ou bien avec la valeur de l'indice de dormance. Le point le plus éloigné de la tendance

correspond à une variété qui a versé une des deux années. La performance du classement est améliorée si l'on retire deux essais caractérisés par une dormance très faible, y compris des variétés tolérantes.

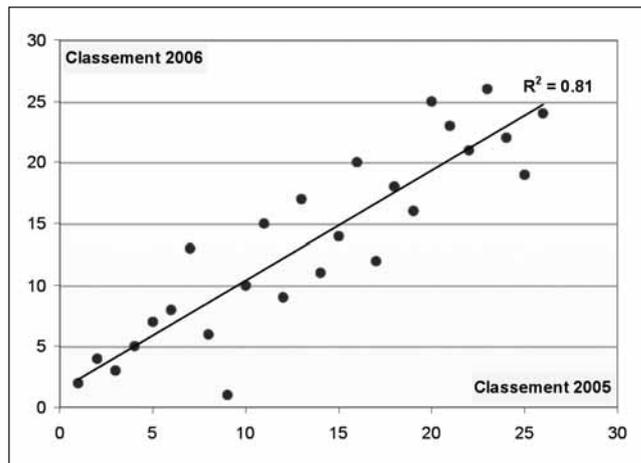


Figure 6 : Classement variétal avec l'indice de dormance effectué à partir de grains issus de la récolte. Chaque point correspond à l'ordre moyen d'une variété calculé par année.

► **Temps de chute de Hagberg : regard critique et modélisation**

Nos résultats montrent que le temps de chute est très peu lié à l'indice de dormance ou bien au pourcentage de grains germés *in vitro*.

Il y a de plus une dissociation nette entre le TCH et l'activité  $\alpha$ -amylasique dans les essais 2007 sur Soissons et Réctal. Jusqu'à une teneur en eau du grain de 20 %, l'activité  $\alpha$ -amylasique de Soissons et de Réctal reste à peu près identique alors que le TCH de Réctal baisse et pas celui de Soissons. Ce fait pourrait s'expliquer par les causes suivantes :

- la mesure directe de l'activité  $\alpha$ -amylasique mesure l'action des amylases de l'échantillon sur un substrat donné qui est toujours le même et non sur l'amidon de l'échantillon, alors que le test du TCH est un test avec l'amidon même de l'échantillon. Par conséquent, il peut être supposé que la valeur du TCH résiderait dans la sensibilité de l'amidon de la variété : Réctal aurait un amidon qui se dégrade plus vite sous l'effet d'une même quantité  $\alpha$ -amylasique que Soissons, d'où un TCH plus faible pour une même quantité  $\alpha$ -amylasique,
- la structure de l'amidon, et principalement la viscosité intrinsèque indépendamment de l'activité  $\alpha$ -amylasique intervient : les variétés ont une viscosité à chaud plus ou moins élevée (Massaux *et al.*, 2004). Réctal et Soissons ayant le même TCH initial auraient initialement la même viscosité à chaud. Mais celle-ci diminuerait différemment sur Réctal (sans lien et sans effet sur l'activité des  $\alpha$ -amylases), provoquant ainsi une baisse de TCH. L'amidon de Soissons serait quant à lui moins sensible aux conditions environnementales et de ce fait sa viscosité à chaud resterait constante.

En conclusion, il faut distinguer 3 aspects dans le TCH : la quantité en  $\alpha$ -amylases intrinsèque, la sensibilité de l'amidon de la variété à cette quantité d'amylases et les modifications de la structure et des propriétés de l'amidon, indépendamment de l'activité  $\alpha$ -amylasique. Les deux premiers aspects auront un impact sur le TCH et la panification, car ils sont liés à la dégradation de l'amidon

par les  $\alpha$ -amylases. Par contre, le dernier aspect pourra faire chuter le TCH sans intervenir sur la réussite de la panification. L'étude présente confirme donc les doutes sur la réelle interprétation du TCH : il y a amalgame entre la véritable intervention des  $\alpha$ -amylases et le rôle de la structure de l'amidon dans la valeur du TCH. On ne peut, non plus, proposer la mesure directe de l'activité  $\alpha$ -amylasique comme remplacement au TCH, car cette mesure ne prend pas en compte la sensibilité de l'amidon d'une variété à une quantité précise d' $\alpha$ -amylases. Il faudrait rajouter au test du TCH un test de viscosité à chaud.

Les données de suivi du TCH sur 3 années et 2 lieux ont permis de concevoir un modèle dynamique de son évolution. Cette dernière a été modélisée en prenant en compte l'action de la pluie et en formulant des hypothèses. Le TCH de départ avant l'action de la pluie est fixé à 350 s et celui-ci ne peut être dégradé qu'à partir de la maturité physiologique. L'analyse des données révèle que le TCH n'est dégradé qu'à partir d'un cumul de pluies minimal ; en cours de dégradation, l'action de la pluie peut durer jusqu'à 3 jours consécutifs, selon la valeur de la pluie du jour (effet report). L'ensemble des paramètres du modèle a fait l'objet d'une optimisation.

La RMSE est de 34.9 s pour l'ensemble des points, et de 29 s si l'on ne considère que les points correspondant à la récolte (Figure 7). Nous avons testé le modèle sur un jeu de données extérieures de 1995 à 2000 issues de sites différents, d'une variété de sensibilité proche (Trémie). Le modèle initial sans modification de paramétrage aboutit à une RMSE à peine dégradée (40 s).

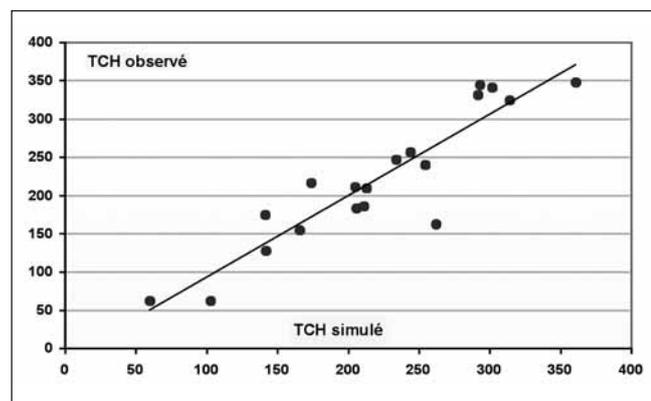


Figure 7 : Relation entre le TCH mesuré et simulé par le modèle. Ensemble des points de Réctal.

## Conclusion et perspectives

La sensibilité à la germination d'une variété au champ dépend en premier lieu de son aptitude à germer dans une gamme plus ou moins étendue de température. L'évaluation de la sensibilité variétale à la germination sur pied peut donc être appréciée, via des tests de germination à 10 et à 25 °C, à condition de prélever les grains après un certain stade de croissance (aux alentours de la maturité récolte).

Nos résultats démontrent que l'évolution de l'indice de dormance répond à un mode d'action différencié de la température, fonction de son stade de croissance. Dès la maturité physiologique, la dormance peut fortement varier, ce résultat constituant une référence nouvelle. De plus, durant cette première phase qui précède la maturité physiologique, la quantité de chaleur augmente la dormance. Après la maturité physiologique, la loi d'action de la température est conforme à celle déjà mentionnée par différents auteurs : un excès de température réduit la dormance. Notre jeu de données est insuffisamment variable, si bien que nous ne pouvons conclure si la dormance à la récolte est plus sensible au rôle de la température après la maturité physiologique ou à l'état de dormance à la maturité physiologique.

Le fait que l'expression de la germination au champ met en jeu une durée d'exposition à une même teneur en eau seuil, mais plus ou moins longue selon les variétés, renforce l'hypothèse du rôle exercé par les composés phénoliques dans les téguments. On peut émettre l'hypothèse que la variation de cette durée est fonction de la quantité de ces composés.

Pour évaluer strictement la sensibilité variétale aux bas temps de chute de Hagberg, nous proposons de brumiser les cultures avant la période de dessiccation, à un moment où la dormance est encore présente.

Le modèle de simulation du TCH a donné des résultats satisfaisants. Néanmoins, il est possible que certaines de nos hypothèses soient dépendantes de notre jeu de données : pas de dégradation avant la maturité physiologique et valeur identique (350 s) quelle que soit la variété.

La conception du modèle agroclimatique de dessiccation des grains ouvre des perspectives opérationnelles, car il devient envisageable de déterminer un risque de germination ou de dégradation du temps de chute de Hagberg, à différents niveaux d'échelle (parcelle, région).

## Références bibliographiques

- Belderock 1965.** Influence of preharvest weather on wheat dormancy and its tendency to sprout in the ear. *Z. Acker-Pflanzenbau*, 122, 297-313.
- Corbineau F., Benamar A., Couvreur F., Gate P. et Côme D., 1993.** La germination sur pied du blé tendre : recherche de critères prévisionnels. *Comptes-rendus de l'académie d'agriculture de France*, 79, 47-54.
- Finch-Savage W.E. et Leubner-Metzger G., 2006.** Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171, 501-523
- Gate P., 1995.** Ecophysiologie du blé : de la plante à la culture. Lavoisier Tec&Doc, Paris, 429p.
- Gate P., 1998.** Germination sur pied et poids spécifique : les enseignements de la récolte 1997. *Perspectives agricoles*, 235, 32-36.
- King R.W., 1989.** Physiology of sprouting resistance. In 'Pre-harvest field sprouting in cereals'. (Ed. NF Derera) pp. 27-60.
- Lenartz J., Massaux C., Sinnaeve G., Sindic M., Bodson B., Dardenne P., Falisse A. et Deroanne C., 2003.** Is the Hagberg falling number always linked to the  $\alpha$ -amylase activity of wheat ? *Proceedings du "Third European Symposium on Enzymes in Grain Processing : Recent Advances in Enzymes in Grain Processing"*, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgique, 25-27 septembre 2002, Delcour J. Editor - Laboratory of Food Chemistry, KUL, 29-31.
- Lunn G.D., Kettlewell P.S., Major B.J. et Scott R.K., 2002.** Variation in dormancy duration of the U.K. wheat cultivar Hornet due to environmental conditions during grain development. *Euphytica*, 126, 1, 89-97.
- Mares D.J., 1993.** Pre-harvest sprouting in wheat. I. Influence of cultivar, rainfall and temperature during grain ripening. *Aust J. Agric. Res.*, 44, 1259-72.
- Massaux C., Lenartz J., Sindic M., Sinnaeve G., Bodson B., Deroanne C., Dardenne P. et Falisse A., 2004.** L'amidon du grain de froment : une composante à valoriser par des productions différenciées ? Livre Blanc "Céréales" F.U.S.A et C.R.A. Gembloux. [<http://www.fsagx.ac.be/pt/LBfev2004/Amidon.doc>]
- Simon S., 2006.** Sensibilité à la germination avant récolte et aux bas temps de chute de Hagberg chez le blé tendre : déterminants, enjeux et évaluation variétale. Mémoire de fin d'études Master de Biologie Intégrative et Physiologie, spécialité Sciences du Végétal, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 60 p.
- Strand E., 1989.** Studies on seed dormancy in small grain species. II. Wheat. *Norwegian Journal of agricultural Sciences*, 3, 101-115

# Étude et prédiction des fractions protéiques de réserve et indices de sélection pour la qualité

Gérard BRANLARD\*<sup>1</sup>, François-Xavier OURY<sup>1</sup>, Pierre MARTRE<sup>1</sup>, Thierry AUSSENAC<sup>2</sup>, Jean-Baptiste REGNARD<sup>3</sup>,

\* Coordinateur : Gérard BRANLARD<sup>1</sup>, branlard@clermont.inra.fr, Tél. : 04 73 62 43 16

1 - INRA UMR 1095 - UBP - 234 av. du Brezet, 63000 Clermont Ferrand

2 - Institut Polytechnique LaSalle Beauvais - rue Pierre Wagué, 60026 Beauvais Cedex

3 - GIE Club 5 - 83 avenue de la Grande Armée, 75782 Paris Cedex 16

## ► Mise en place de l'essai de 130 cultivars deux années consécutives 2004 et 2005

Le choix des cultivars fut basé sur les critères de diversité et d'origine génétique dans l'ensemble des variétés françaises récentes et dans les lignées en fin de sélection. Les caractéristiques de valeurs d'utilisation ont été prises en compte dans ce choix. Cette liste a été formée de :

- 22 cultivars (dont 12 variétés du domaine public) proposés par Benoît-Syngenta,
- 22 variétés proposées par Florimond Desprez,
- 42 cultivars (dont 11 variétés du domaine public) proposés par l'INRA,
- 22 cultivars (dont 8 variétés du domaine public) proposés par Nickerson-LVH,
- 22 cultivars (dont 11 variétés du domaine public) proposés par Sérasem.

La mise en place des essais multilocaux des 130 cultivars ; essai randomisé avec deux répétitions fut réalisé en trois lieux chaque année. Les conditions de fertilisation non excessives furent celles définies par un rendement en conventionnel avec une protection phytosanitaire. Ces lieux furent :

- en 2004 : les établissements Benoît-Syngenta (78), Sérasem (59) et l'INRA de Clermont-Ferrand (63),
- en 2005 : les établissements Florimond Desprez (59), Nickerson-LVH (28) et l'INRA de Clermont-Ferrand (63).

Chacun de ces essais fut réussi, les rendements furent proches, voire supérieurs aux témoins. Les grains nettoyés furent expédiés à l'INRA de Clermont-Ferrand pour analyses biochimiques et technologiques.

## ► Analyse de la diversité allélique des gluténines et des oméga-gliadines des 130 blés

La diversité allélique observée par électrophorèse monodimensionnelle (SDS- Page) sur les sous unités gluténines de haut poids moléculaire (SG-HPM) et de faible poids moléculaire (SG-FPM) s'est révélée, comme attendu, très importante. Trente et un allèles ont été au total identifiés pour les 3 loci *Glu-1* et *Glu-3*.

|        |    |                       |
|--------|----|-----------------------|
| Glu-A1 | 3  | a b c                 |
| Glu-B1 | 7  | a b c d f h i         |
| Glu-D1 | 4  | a b c d               |
| Glu-A3 | 4  | a b d e f             |
| Glu-B3 | 10 | a b b' c c' d f g i j |
| Glu-D3 | 3  | a b c                 |

Les allèles des oméga-gliadines ont aussi été analysés et leur polymorphisme fut comparable à celui des SG-FPM auxquelles elles sont génétiquement liées.

Cette diversité des protéines de réserve et principalement celle des gluténines fut associée aux variations des caractéristiques technologiques des 130 cultivars.

## ► Analyse des caractéristiques technologiques

Les analyses technologiques ont été réalisées sur chacun des 130 cultivars récoltés sur les six lieux (780 échantillons).

Les tests suivants ont été effectués :

- Densité du grain PS, Poids de mille grains PMG,
- Teneur en protéines du grain (Réalisées par Near Infrared Reflectance Spectroscopy : NIRS), Dureté du grain (NIRS),
- Sédimentation SDS, Alvéographe (5 paramètres), Mixographe (11 paramètres),

Les farines obtenues ont été transmises à l'Institut Polytechnique LaSalle Beauvais pour la détermination des distributions moléculaires des protéines de réserve par AFFFF-MALLS. Ces analyses ont fourni douze autres paramètres biochimiques.

|                             | F        | F             | F            | R <sup>2</sup> | H <sup>2</sup> |
|-----------------------------|----------|---------------|--------------|----------------|----------------|
|                             | Geno     | Lieux (année) | Geno x Lieux | modèle         | héritabilité   |
| Rdt grain                   | 3,17***  | 510,55***     | 0,79         | 0,928          | 0,145          |
| Prot                        | 13,88*** | 19,35***      | 1,26         | 0,969          | 0,368          |
| Dur                         | 80,29*** | 35,37***      | 1,25         | 0,989          | 0,909          |
| PMG                         | 8,76***  | 61,50***      | 1,36*        | 0,947          | 0,399          |
| PS                          | 2,15***  | 287,36***     | 0,59         | 0,922          | 0,119          |
| SDS                         | 26,24*** | 58,52***      | 1,36*        | 0,974          | 0,654          |
| W                           | 21,40*** | 9,10**        | 0,89         | 0,965          | 0,731          |
| P                           | 22,83*** | 155,62***     | 0,70         | 0,968          | 0,716          |
| L                           | 9,70***  | 124,98***     | 1,30*        | 0,951          | 0,386          |
| P/L                         | 9,03***  | 172,71***     | 0,86         | 0,941          | 0,499          |
| G                           | 8,18***  | 133,63***     | 1,09         | 0,945          | 0,380          |
| MLV                         | 16,20*** | 164,12***     | 0,99         | 0,969          | 0,461          |
| MLW                         | 16,57*** | 1,24          | 2,14***      | 0,968          | 0,434          |
| MPT                         | 6,08***  | 6,25*         | 0,77         | 0,940          | 0,339          |
| MPV                         | 19,82*** | 168,25***     | 1,11         | 0,974          | 0,464          |
| MPW                         | 10,36*** | 7,39**        | 1,55**       | 0,949          | 0,434          |
| MRV                         | 13,34*** | 102,64***     | 0,98         | 0,970          | 0,495          |
| MRW                         | 6,07***  | 31,90***      | 1,43*        | 0,943          | 0,365          |
| MTxV                        | 15,11*** | 194,37***     | 1,01         | 0,963          | 0,527          |
| MTxW                        | 8,10***  | 19,88***      | 1,38*        | 0,944          | 0,365          |
| MTI                         | 15,20*** | 166,01***     | 0,97         | 0,970          | 0,400          |
| WS                          | 9,40***  | 7,05**        | 2,41***      | 0,968          | 0,282          |
| Qté Mono                    | 10,52*** | 90,10***      | 1,02         | 0,961          | 0,334          |
| Qté Poly                    | 12,42*** | 6,86**        | 1,20         | 0,965          | 0,380          |
| Qté Tot                     | 10,67*** | 34,15***      | 1,09         | 0,965          | 0,315          |
| Poly/mono                   | 10,09*** | 202,13***     | 0,68         | 0,936          | 0,590          |
| Poly/tot                    | 10,36*** | 194,27***     | 0,71         | 0,937          | 0,593          |
| Mn                          | 0,15     | 0,22          | 0,19         | 0,540          | 0,008          |
| Mw                          | 3,62***  | 25,36***      | 1,13         | 0,905          | 0,232          |
| Maverage                    | 0,88     | 254,96***     | 0,72         | 0,924          | 0,008          |
| Rw                          | 4,46***  | 15,17***      | 0,82         | 0,899          | 0,354          |
| Raverage                    | 3,04***  | 2189,80***    | 1,23         | 0,981          | 0,030          |
| Mw/Mn                       | 3,10***  | 28,37***      | 1,21         | 0,894          | 0,189          |
| <sup>a</sup><br>(conf,plot) | 0,12     | 2,25          | 0,18         | 0,508          | 0,002          |

Le tableau ci-dessus montre que la plupart des paramètres technologiques varient, de manière très hautement significative, en fonction des lieux mais aussi et parfois

dans une moindre mesure, en fonction du génotype. Peu de paramètres révèlent une interaction G x E. L'analyse nous a permis d'estimer les composantes de la variance et ainsi de calculer l'héritabilité au sens large H<sup>2</sup>. Les principaux points suivants peuvent être soulignés :

- la dureté (comme attendu) est le paramètre le plus héritable,
- les paramètres sédimentation SDS, force W et ténacité P de l'alvéographe ont une héritabilité élevée. Celle-ci se retrouve également dans plusieurs paramètres décrivant la résistance de la pâte au cours du pétrissage : MLV, MLW, MPV, MPW, MRV, MTxV. Les rapports Poly/mono et Poly/tot des quantités de protéines polymériques / protéines monomériques et / protéines de réserve ont des valeurs H<sup>2</sup> comparables. Ces résultats montrent que les caractéristiques génétiques de la pâte peuvent être prises en compte par ces paramètres et qu'elles sont fortement dépendantes du gluten et vraisemblablement de sa composition,
- plusieurs paramètres sont très fortement influencés par les conditions environnementales. Nombreux sont connus : la teneur en protéines Prot, le poids spécifique PS, l'extensibilité et le gonflement de la pâte L et G, le temps pour atteindre la consistance maximum au mixographe MPT, l'affaiblissement de la pâte au cours du pétrissage WS. Mais les quantités de protéines monomériques Qté Mono, polymériques Qté Poly et de réserve Qté Tot ont aussi une héritabilité faible.

Les valeurs de ces paramètres technologiques ont été associées à la diversité allélique des protéines de réserve, en vue d'approfondir notre connaissance des facteurs génétiques impliqués dans la valeur technologique des blés et pour calculer les indices de sélection.

#### ► Établissement des indices de sélection basés sur la lecture allélique de la diversité des SG-HPM et SG-FPM

Ces indices font l'objet d'une publication en préparation (Oury et al., 2009). Ils ont été calculés pour l'essentiel à partir des analyses conduites sur cet essai des 130 cultivars expérimentés en six lieux en 2004 et 2005. Dans un souci d'approfondissement et de validation des relations entre la variabilité génétique des protéines de réserve et la valeur d'utilisation, d'autres essais mis en place par l'INRA ont été inclus dans cette recherche : Essais INRA interstation conduits entre 1995 et 2002 (impliquant 207 autres cultivars), et entre 2003-2005 (impliquant 100 autres cultivars). Ces essais apportent en plus des paramètres de teneur en protéines, de dureté, de sédimentation SDS, de Mixographe et d'alvéographe, les variables de la valeur boulangère appréciée soit par le test BIPEA (période 2003-2005), soit par le test CNERNA (période 1995-2002).

Les analyses confirment les effets de la diversité des SG-HPM et SG-FPM sur les variations de paramètres technologiques tels que le W, le P ou le L. L'effet des SG-HPM est souvent plus marqué que celui des SG-FPM. L'apport de la diversité des allèles des deux groupes SG-HPM et SG-FPM n'est pas strictement additif mais pour de nombreux cas il apparaît avantageux d'analyser les sous unités de haut et aussi celles de faibles poids moléculaire. En utilisant une analyse des effets par une approche de réduction des sommes des carrés d'écart à la moyenne par segmentation, l'étude montre que, pour les paramètres W, P et L, entre 32 et 60 % de ces écarts sont expliqués par les allèles aux six loci des gluténines.

La prédiction des caractéristiques de l'alvéographe obtenue par régression PLS (Partial Least Squares), principalement pour le W, est nettement améliorée lorsque sont intégrées, comme variables explicatives, la dureté et la teneur en protéines du grain. L'apport des SG-HPM et des SG-FPM permet d'augmenter le R<sup>2</sup> du W de 0,55 à 0,70. Si l'on ajoute la mesure de sédimentation du SDS alors les paramètres W, P et L sont respectivement expliqués à 0,80, 0,59 et 0,36 %. La contribution des SG-HPM et des SG-FPM dans la prédiction des variables de panification (BIPEA ou CNERNA) est plus faible : de 6 à 18 %.

Des équations de prédiction, basées sur plusieurs combinaisons de tests technologiques indirects (protéines, dureté, SDS, Mixographe) et les allèles des gluténines, ont été calculées. Le paramètre de l'extensibilité de l'alvéographe ainsi que les paramètres des panifications CNERNA et BIPEA n'ont pu être approchés par des équations satisfaisantes. Par contre les équations de prédiction du W de l'alvéographe sont apparues de bonne qualité, et les coefficients attribuables aux allèles des SG-HPM et des SG-FPM ont été calculés pour plusieurs combinaisons de tests indirects aisément praticables en sélection. Ces coefficients (ou valeur d'indice) peuvent désormais être pris en compte dans les opérations de sélection visant à améliorer le W. Ils sont composés de nouvelles valeurs d'indice des SG-HPM, auxquelles sont ajoutées désormais les valeurs des allèles observés aux loci Glu-3.

#### ► Dosage des fractions protéiques (gliadines et gluténines) et mesure des paramètres d'absorbance NIRS

Comme proposé dans le projet de recherche, l'INRA de Clermont-Ferrand a extrait les fractions gliadines et gluténines des 130 cultivars récoltés en 2004 sur son domaine expérimental. L'extraction manuelle bien que quasi exhaustive, par rapport au fractionnement automatique par HPLC, n'a pas offert une reproductibilité excellente des pourcentages de gliadines et gluténines (CV voisin de 12%). En conséquences les prédictions par NIRS, des valeurs de références ainsi obtenues, ont abouti à des coefficients d'explication R<sup>2</sup> de l'ordre 0,58 (n=130) par la mesure de l'absorbance sur les moutures complètes. L'analyse de prédiction des fractions n'a donc pas été poursuivie en prenant ce mode de fractionnement pour obtenir les valeurs de référence. L'approche de modélisation des fractions protéiques du grain, présentée ci-dessous page 71, utilise le dosage HPLC pour mesurer de manière satisfaisante les variations de ces fractions.

#### ► Calcul des équations de prédiction NIRS

Les échantillons des 130 cultivars, récoltés en 2004 et 2005 dans les trois lieux d'expérimentation, ont été analysés par NIRS. Chaque échantillon fut analysé, soit sous forme de mouture complète obtenue au moulin Cyclotec, soit sous forme de grain entier. Les échantillons ont été scannés tous les 2 nm entre 400 et 2500 nm. Les valeurs d'absorbance correspondantes furent utilisées comme variables explicatives dans le but de prédire les caractéristiques de composition (teneur en protéines) des paramètres physiques du grain (PMG, PS, dureté) ou technologiques mesurées sur la farine (SDS, 4 paramètres donnés par l'alvéographe et 3 du mixographe). Les équations de calibration aux valeurs de référence ont été recherchées par la méthode PLS modifiée. Les équations ont été recherchées, par lieu, et en prenant les valeurs obtenues dans les autres lieux pour la validation croisée.

Le tableau ci-dessous donne les paramètres statistiques des variables prédites qui ont été retenues pour les échantillons analysés sous forme de mouture complète.

| Paramètres       | Moy   | Min   | Max   | R <sup>2</sup> | SEC   | SECV  |
|------------------|-------|-------|-------|----------------|-------|-------|
| Mouture complète |       |       |       |                |       |       |
| Protéines        | 11,81 | 9,5   | 15    | 0,993          | 0,08  | 0,16  |
| Dureté           | 51,4  | 5,9   | 93,7  | 0,98           | 3,16  | 4,89  |
| SDS              | 45,6  | 23    | 76    | 0,84           | 3,8   | 4,71  |
| W                | 185,3 | 74    | 388   | 0,846          | 26,11 | 34,25 |
| P                | 66,2  | 25    | 111   | 0,708          | 10,49 | 10,8  |
| L                | 96,7  | 36    | 167   | 0,483          | 19,6  | 21,4  |
| MPV              | 36,6  | 24,4  | 47,9  | 0,728          | 2,36  | 2,61  |
| MTI              | 231,6 | 171,3 | 330,4 | 0,861          | 11,49 | 18,5  |

Pour les variables de ce tableau, on relève, qu'en plus de la teneur en protéines et la dureté, qui sont classiquement prédites par la mesure NIRS, il semble possible d'avoir une estimation des variables technologiques SDS, W, P, MPV, MTI et dans une moindre mesure du L de l'alvéographe. Les variables physiques du grain PMG, PS, technologiques P/L de l'alvéographe et MPT du mixographe n'ont pu être approchées par la mesure NIRS sur mouture complète (Figure 1 et 2).

Les équations de calibration obtenues sur les données de ce programme FSOV ont pour certains paramètres été

améliorées en intégrant des valeurs de référence obtenues sur d'autres matériels issus d'expérimentation INRA. Elles peuvent être dès maintenant utilisées par les membres du GIE Club 5 qui, de leur côté, peuvent chaque année tenter de les rendre plus précises en introduisant des valeurs de référence observées sur d'autres génotypes pouvant apporter des valeurs plus étendues.

Sur grain entier, les équations de prédiction sont nettement moins performantes (tableau ci-dessous). D'une part parce que les mesures ont été réalisées par réflectance (appareil NIRS 6500) et non par transmittance et surtout parce que la cellule de mesure (mini coupelle) n'offre qu'un volume réduit, laissant ainsi une possible hétérogénéité dans le remplissage de son contenu. Plusieurs variables peuvent néanmoins être approchées par la mesure, dans une mini coupelle, qui nécessite seulement 5 grammes de grains.

| Paramètres   | Moy   | Min | Max  | R <sup>2</sup> | SEC   | SECV  |
|--------------|-------|-----|------|----------------|-------|-------|
| Grain entier |       |     |      |                |       |       |
| Protéines    | 11,77 | 9,5 | 14,5 | 0,862          | 0,36  | 0,44  |
| Dureté       | 51,7  | 3,2 | 93,4 | 0,776          | 11,18 | 15,46 |
| PS           | 83,3  | 78  | 85   | 0,801          | 0,65  | 0,98  |
| SDS          | 51,9  | 27  | 75   | 0,665          | 5,17  | 6,59  |
| W            | 236,2 | 88  | 563  | 0,754          | 40,1  | 63,4  |

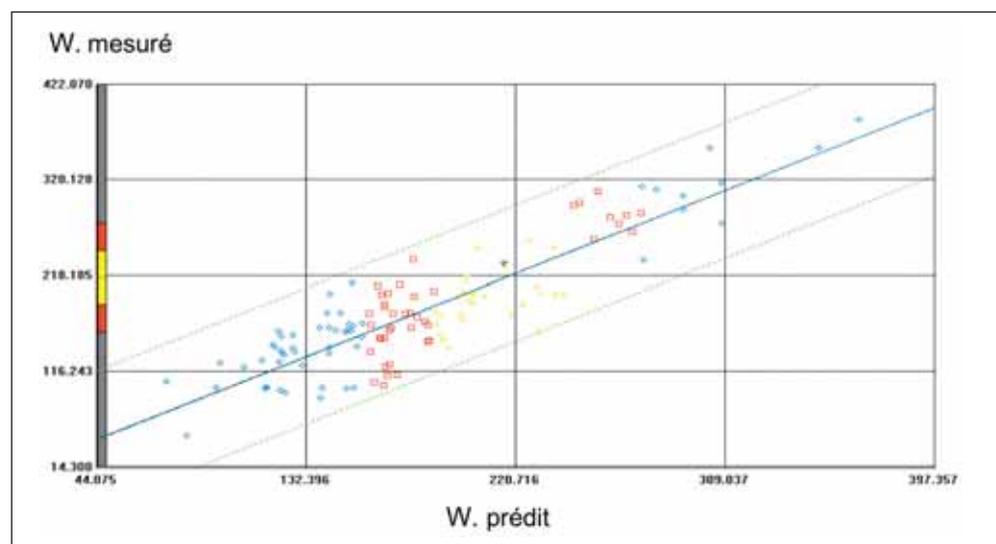


Figure 1 : Prédiction de la variable W par NIRS sur mouture complète

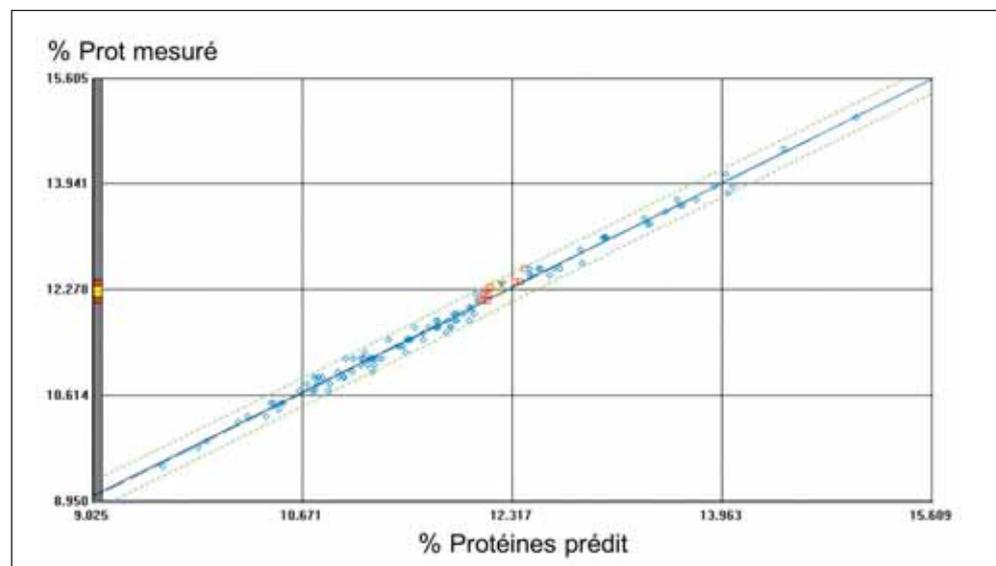


Figure 2 : Prédiction de la variable % protéines par NIRS sur mouture complète

A titre d'illustration, est présentée sur la figure 3 la variable poids spécifique (PS) prédite à partir de la mesure NIRS sur grain entier.

### ► Principaux résultats acquis dans le domaine de la modélisation des fractions prodéiques du grain

Mise en place de traitements spécifiques (nutrition azotée, stress thermique) sur quatre géotypes bien déterminés montrant des différences potentielles dans leur aptitude à accumuler les protéines de réserve. Dosage de ces fractions par HPLC et suivi des cinétiques d'accumulation des constituants protéiques par analyse protéomique des fractions protéines solubles et protéines de réserve.

Ce travail de recherche a plus particulièrement été développé par Pierre Martre (Equipe Agro-physiologie des Plantes Annuelles Cultivées, APAC, Inra Clermont-Ferrand). Sont présentés ci-dessous les principaux résultats acquis dans le domaine de la modélisation des fractions protéiques du grain au cours de la première année et le début de la seconde année.

Nous avons mis en évidence des relations allométriques entre la quantité des fractions protéiques (albumines-globulines, amphiphiles, gliadines et gluténines) et la quantité d'azote total par grain pour la variété Thésée. Les paramètres de ces relations sont stables et indépendants des conditions de l'environnement, ce qui nous a permis de développer des hypothèses simples d'allocation des protéines du grain au cours de sa formation. Ces relations ont été formulées sous la forme d'un modèle dynamique d'accumulation de l'azote total et des fractions protéiques du grain, *SiriusQuality*, dont les variables d'entrée sont la température, les précipitations et le rayonnement.

L'objectif était d'aborder la variabilité génétique des paramètres d'allométrie entre les quantités des fractions protéiques et la quantité d'azote total du grain, qui sont à la base du modèle *SiriusQuality*. Au cours de la première année, nous avons étudié quatre cultivars de blé tendre d'hiver (Arche, Réctal, Renan et Tamaro), contrastés pour leur rendement et leur teneur en protéines, et qui présentent une forte interaction entre ces deux variables. Ces quatre variétés ont été cultivées au champ avec des niveaux de fertilisation azotée pré et post-floraison contrastés. Pour le traitement non limitant en azote, deux rapports source-puits (charge en grain) ont été créés à la floraison en supprimant les grains de la moitié supérieure des épis. Les effets de températures de jour élevées (moyenne de

28 °C, comparée à 19 °C) et d'un déficit hydrique (15 % de l'évapotranspiration réelle, comparé à 100 %) au cours de la période post-floraison ont également été étudiés en conditions semi contrôlées sous éclairage naturel.

Les traitements appliqués ont induit de très fortes variations de la teneur en protéines et de la composition en protéines des grains. Environ 90 % des variations observées de composition en protéines sont expliquées par la quantité d'azote par grain, et le modèle *SiriusQuality* permet de rendre compte du comportement des quatre variétés dans l'ensemble des conditions environnementales testées. Afin de vérifier si toutes les sous-unités des gluténines et les fractions gliadines sont quantitativement régulées de la même manière par la quantité d'azote total par grain nous avons entrepris l'analyse de la composition de ces fractions par RP-HPLC. Ce travail nous a permis d'aborder la prédiction des cinétiques d'accumulation des différentes sous-unités et fractions des protéines de réserve.

### ► Analyse protéomique sur la variété Arche

Cette variété a été cultivée en conditions contrôlées et, après anthèse, un traitement thermique a été appliqué sur les plantes : 23 °C le jour / 11 °C la nuit pour les témoins T et 28 °C / 15 °C pour les stressés S. Au cours de l'accumulation des réserves et la maturation, les grains ont été récoltés à 7 stades différents pour les 2 traitements : de 163 °J jusqu'à maturité 778 °J. Les échantillons T1 à T7 et S1 à S7 ont donc été analysés (2 extractions x 3 répétitions x 7 stades x 2 modalités S ou T) par électrophorèse bidimensionnelle suivie d'une analyse d'image des 84 gels obtenus (Figure 4 page 72). Les protéines spécifiques à chacun des stades ont été caractérisées sur les différentes images. A chaque stade les images ont été comparées.

De même les images ont été comparées entre chacun des stades. Ainsi la comparaison entre les stades 6 et 7 montrent que 263 protéines avaient leur volume significativement différent entre ces deux stades pour le témoin contre 343 dans les grains d'Arche stressé. De grandes différences subsistaient à maturité entre les grains d'Arche témoin et stressé.

En plus des variations de volume des spots, qui ont été analysées, les principaux spots caractéristiques des protéines de réserves (Gliadines  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\omega$ ), SG-HPM et SG-FPM ont été identifiés sur ces gels d'électrophorèse. Leurs variations quantitatives au cours de la formation du grain et l'accumulation des réserves ont été suivies et

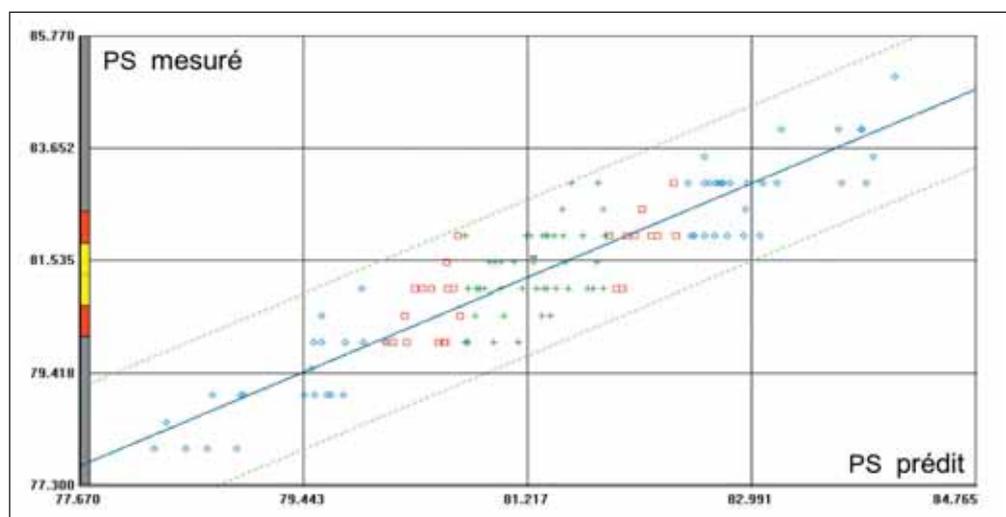


Figure 3 : Prédiction de la densité du grain par la mesure NIRS sur grain entier

l'influence de la différence de température appréciée. D'une manière générale, on constate que l'effet de la température (+5 °C diurne / +4 °C nocturne) se traduit par une diminution de la quantité de protéines de réserve par grain. Ce sont principalement les gliadines qui présentent une diminution par rapport au témoin. Les SG-HPM, bien que diminuées, continuent à s'accumuler encore à cette température de 28 °C. Notons enfin que de nombreuses protéines sont apparues induites à plusieurs stades chez le stressé.

L'identification de ces protéines par spectrométrie de masse nous permet (1) d'avancer des hypothèses sur les mécanismes impliqués dans l'accumulation des réserves dans des conditions de température plus élevées que la normale (2) de rechercher des variants génétiques pouvant répondre différemment à des températures élevées.

### ► Analyses sur les polymères des protéines et statut Redox

L'Institut LaSalle Beauvais a eu pour objectif (1) de caractériser les distributions moléculaires des protéines de réserve de la collection des 130 génotypes récoltés sur les 6 lieux au cours des deux années d'expérimentation et notamment d'examiner l'incidence de la distribution des allèles sur la taille des polymères (Figure 5) ; (2) d'analyser le statut Redox des protéines de réserve de cette même collection en relation avec les données de distribution moléculaire. Dans le cadre de ce programme de recherche, le travail de caractérisation des différentes formes de glutathion dans les farines a été

mené grâce à la mise au point d'une nouvelle méthodologie analytique fondée sur l'utilisation d'un couplage HPLC-Spectroscopie de fluorescence.

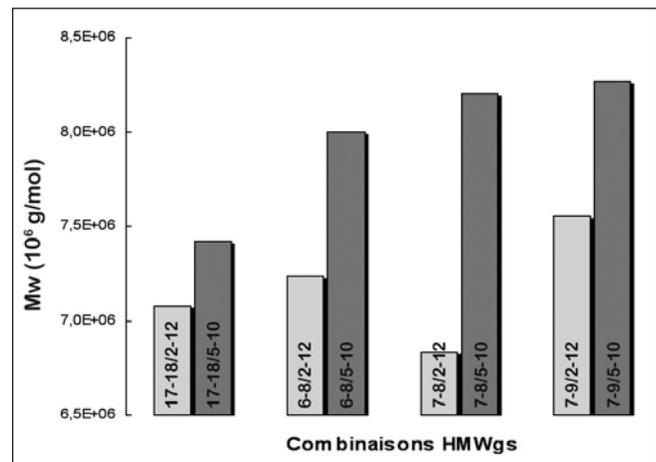


Figure 5 : Variation de la masse moléculaire moyenne en masse ( $M_w$ ) des polymères gluténiques en fonction de la nature des HMWgs présentes aux locus *GluB1* et *GluD1*.

Bien que l'influence du milieu soit importante sur la quantité de protéines et de polymères protéiques liés au glutathion, des différences génétiques ont cependant été observées.

Les résultats obtenus tendent à démontrer que les aptitudes technologiques des farines peuvent être reliées

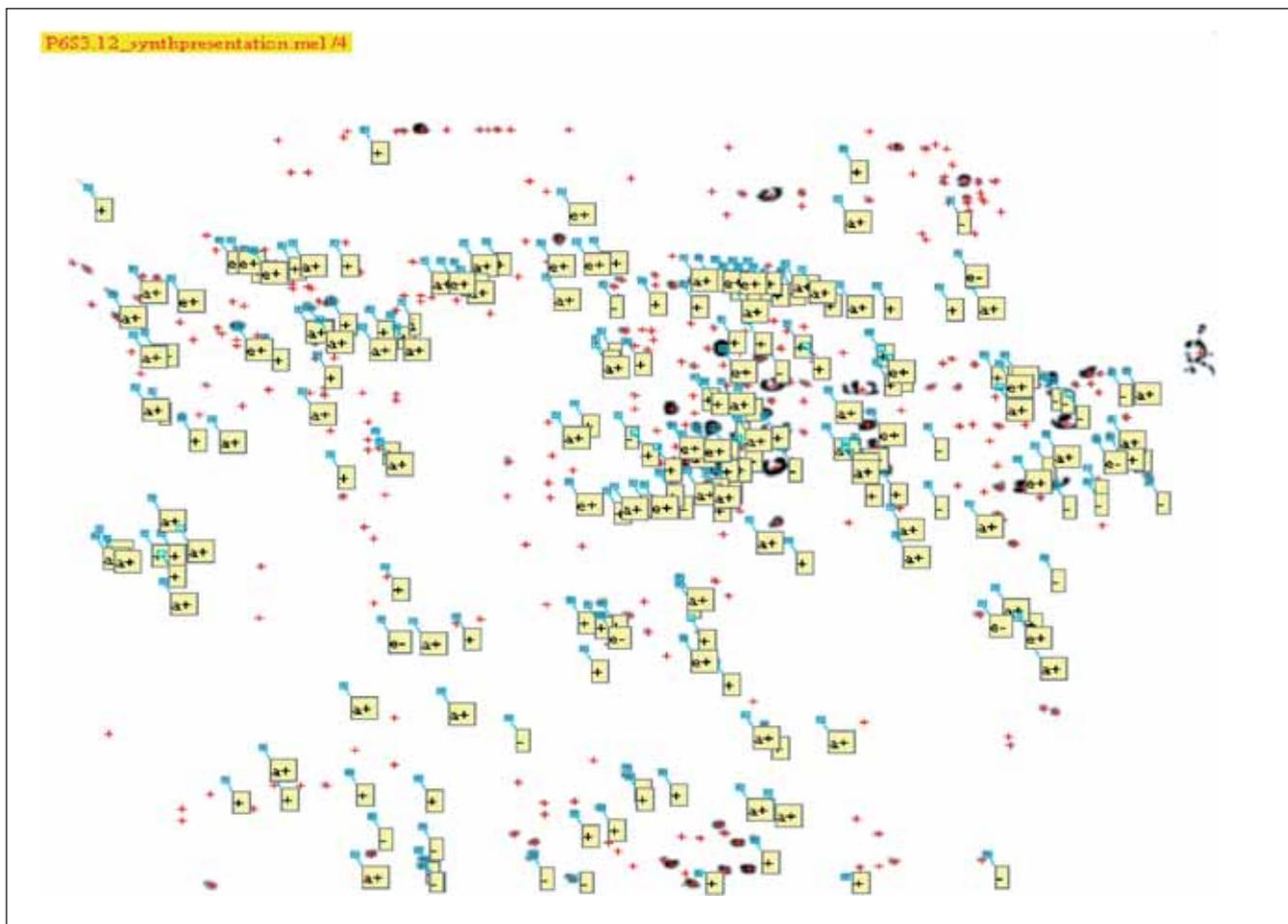


Figure 4 : Electrophorèse 2D des protéines de l'albumen du grain de blé de la variété Arche au stade 6 : 646°J pour le témoin T et 640°J pour le stressé S. Les spots ayant un volume significativement augmenté ou diminué entre S et T sont indiqués [+] ou [-].

à la distribution des masses moléculaires (DMM) des protéines de réserve. Des masses moléculaires critiques  $M_{wc}$  ont été mises en évidence et peuvent être associées à différentes propriétés rhéologiques de la pâte. Cette  $M_{wc}$  est la limite inférieure de DMM en deçà de laquelle la relation statistique avec la variable estimée décroît. Le glutathion limite la quantité de polymères protéiques et une relation caractéristique du génotype a été mise en évidence entre ces variables.

### ► Conclusion

Le programme FSOV s'est appuyé sur une expérimentation multi-locale qui s'est déroulée sur 2 années. Les six essais ont été réussis et ont fourni, grâce aux choix opérés par les sélectionneurs une variation de composition protéique et de qualité des grains tout à fait représentative des potentiels actuels. Les prédictions NIRS ont permis d'aboutir à douze équations de prédictions (7 sur mouture complète et 5 sur grain entier) qui ont été transmises aux sélectionneurs du GIE Club 5. La gamme de variation, de quelques autres équations, mérite d'être amplifiée. Un des objectifs majeurs de ce projet était d'aboutir à des indices de valeur d'utilisation basés sur la lecture génétique des SG-HPM et des SG-FPM. Cet objectif a été atteint et les

coefficients propres aux différents allèles ont été également transmis. Ces coefficients vont rendre possible des progrès en sélection pour la qualité rhéologique du blé. Rappelons que les indices à disposition des sélectionneurs dataient de 1991 et s'appuyaient sur la lecture seule des SG-HPM. Leur association avec quelques variables technologiques importantes permet d'aboutir pour la première fois à un niveau de prédiction remarquable de la force de la pâte. Les travaux sur la simulation des proportions des protéines de réserve, gliadines et gluténines ont aussi bien avancé. Les améliorations apportées au modèle *SiriusQualité* permettent d'approcher le comportement variétal dans différentes conditions environnementales afin de prédire les cinétiques d'accumulation des fractions des protéines de réserve. Enfin notons les avancées sur l'analyse des bases macromoléculaires des relations ci-dessus observées entre le gluten et les tests technologiques. La connaissance de la distribution des masses moléculaires des protéines de réserve apparaît indispensable pour comprendre le lien entre la diversité de celles-ci et les propriétés technologiques.

La qualité et l'originalité de ces résultats vont permettre aux chercheurs de préparer plusieurs publications.

## Références bibliographiques

Oury F.X., Chiron H., Faye A., Gardet O., Giraud A., Heumez E., Rolland B., Rousset M., Trottet M., Charmet G., Branlard G. The prediction of bread wheat quality: joint use of the

phenotypic information brought by technological tests and the genetic information brought by HMW and LMW glutenin subunits (soumis).

# Amélioration conjointe de l'efficacité d'absorption de l'azote et de la teneur en protéines chez le blé tendre

Jacques LE GOUIS\*<sup>1</sup>, Maryse BRANCOURT<sup>1</sup>, Daniel DORVILLEZ<sup>1</sup>, Marie-Chantal MANSARD<sup>1</sup>, Céline HERBAIN<sup>1</sup>, Jean-Marie MACHET<sup>2</sup>, Bertrand HIREL<sup>3</sup>, Marie-Hélène JEUFFROY<sup>4</sup>, Olivier GARDET<sup>5</sup>, Stéphane GILLES<sup>5</sup>, Laurent GUERREIRO<sup>6</sup>, Philippe GATE<sup>7</sup>, Régis DOUCET<sup>8</sup>, Michel BONNEFOY<sup>8</sup>, Volker LEIN<sup>9</sup>, Michel MADRE<sup>10</sup>, Pascal GIRAUDEAU<sup>10</sup>, Philippe MOMONT<sup>11</sup>, Stephen SUNDERWIRTH<sup>11</sup>, Jean-Michel MOREAU<sup>12</sup>, Jean-Michel DELHAYE<sup>13</sup>, Philippe LEREBOUR<sup>14</sup>

\* **Coordonateur** : Jacques LE GOUIS, jlegouis@clermont.inra.fr, Tél. : 04 73 62 43 11

- 1 - INRA USTL UMR 1281 Stress abiotiques et différenciation des végétaux cultivés Mons-Péronne - Domaine de Brunehaut, BP 50136 Estrées-Mons, 80203 Péronne
- 2 - INRA Unité d'Agronomie Laon-Reims-Mons - rue Fernand Christ, 02007 LAON Cedex
- 3 - INRA Unité de Nutrition azotée des plantes, R.D. 10 - 78026 Versailles Cedex
- 4 - UMR Agronomie INRA-AgroParisTech - 78850 Thiverval-Grignon
- 5 - UMEFV du Moulon - Expérimentation et Finition des Variétés, 91190 Gif sur Yvette
- 6 - ARVALIS - Institut du végétal - Direction scientifique, 3 rue Joseph et Marie Hackin, 75116 Paris
- 7 - ARVALIS - Institut du végétal - Domaine INRA-GEVES, La Minière, 78280 Guyancourt
- 8 - ARVALIS - Institut du végétal - 45 voie romaine, 41240 Ouzouer le marché
- 9 - Saaten-Union Recherche - 163 avenue de Flandre, 60190 Estrées-Saint-Denis
- 10 - SECOBRA Recherches - Centre de Bois Henry, 78580 Maule
- 11 - Momont - 154 route nationale, 28150 Allonnes
- 12 - GAE Recherche - 41 rue de rivière, 91720 Maise
- 13 - Lemaire-Deffontaines - 108 rue du Rossignol, 59310 Auchy-lez-Orchies
- 14 - UNISIGMA - 2 rue Petit-Sorri, 60480 Froissy

Le projet a pour objectif le développement de connaissances et d'outils pour la sélection de blés tendres capables de valoriser les milieux à faible disponibilité en azote (N). Le développement de telles variétés est nécessaire, notamment dans le cadre d'itinéraires techniques visant un meilleur respect de l'environnement et une baisse du coût de production, tout en assurant le maintien d'une qualité du grain adaptée aux différents débouchés. Les variables d'étude concernent principalement l'efficacité d'absorption de l'azote et la teneur en protéines du grain en situation de fertilisation azotée sous-optimale.

Le premier volet du projet comprend la caractérisation de la réponse de variétés de blé à une contrainte azotée à l'aide de mesures écophysiologicals et à l'aide du modèle Azodyn (Jeuffroy et Recous, 1999), un modèle dynamique de fonctionnement de la culture. Il permet de prédire la biomasse, la teneur en azote de la culture, ainsi que l'élaboration du rendement et de la teneur en protéines des grains en fonction des caractéristiques pédo-climatiques de la parcelle.

Le deuxième volet concerne la mesure dans la plante de l'activité des principales enzymes du métabolisme azoté dont on sait qu'elles sont impliquées dans l'absorption et la remobilisation de l'azote. Des corrélations seront effectuées avec les données agronomiques pour expliquer au niveau physiologique le comportement des plantes.

Le troisième volet vise à vérifier l'hypothèse que des blés valorisant bien l'azote dans des conditions de disponibilité limitante peuvent contribuer à limiter les reliquats en azote dans le sol au cours du temps et donc limiter les risques de pollution par les nitrates.

## 1. Protocole expérimental

### ► Expérimentations au champ

#### Matériel végétal

Trente variétés ont été choisies, soit parce qu'elles ont un comportement spécifique vis-à-vis de l'azote, en particulier en ce qui concerne leur teneur en protéines, soit parce qu'elles sont ou seront parentes de populations de lignées

recombinantes qui peuvent permettre de développer par la suite des études de génétique. Pour la plupart d'entre elles, ce sont des variétés récentes (Tableau 1), adaptées aux attentes de l'agriculteur et du secteur agro-alimentaire. Elles ont été choisies pour couvrir une large gamme de précocité (note de 4.5 à 8 pour la précocité à épiaison) afin d'évaluer l'impact du stress azoté selon le rythme de développement. Les variétés Bastide, Taldor et Tapidor n'étaient pas présentes dans certains lieux en 2004 et elles n'ont pas été prises en compte dans un certain nombre d'analyses.

| Variété   |     | Inscription | Obtenteur ou représentant |
|-----------|-----|-------------|---------------------------|
| Apache    | Apa | 1998        | Nickerson                 |
| Arche     | Arc | 1989        | Nickerson                 |
| Aztec     | Azt | 1994        | Nickerson                 |
| Bastide   | Bas | 2002        | Secobra                   |
| Caphorn   | Cap | 2000        | Desprez                   |
| Cézanne   | Cez | 1998        | Nickerson                 |
| CF 99102  | Cf9 | -           | INRA                      |
| Charger   | Cha | 1997        | Desprez                   |
| Courtôt   | Cou | 1974        | Agri-Obtentions           |
| Equilibre | Equ | 2002        | Lemaire                   |
| Esperia   | Esp | ce (2002)   | Momont                    |
| Eurêka    | Eur | 1991        | Agri-Obtentions           |
| Farandole | Far | ce (1999)   | Agri-Obtentions           |
| Grisby    | Gri | 2001        | Saaten Union              |
| Isengrain | Ise | 1997        | Desprez                   |
| Isidor    | Isi | 2002        | Unisigma                  |
| Nirvana   | Nir | 2001        | Desprez                   |
| Ornicar   | Orn | 1998        | Benoist                   |
| Orvantis  | Orv | 1999        | Benoist                   |
| Parador   | Par | 2000        | Secobra                   |
| Pernel    | Per | 1983        | Agri-Obtentions           |
| Québon    | Que | 2004        | Saaten Union              |
| Récital   | Rec | 1986        | Benoist                   |
| Renan     | Ren | 1989        | Agri-Obtentions           |
| Ritmo     | Rit | 1990        | Cebeco N.L.               |
| Soissons  | Soi | 1988        | Desprez                   |
| Taldor    | Tal | 1998        | GAE                       |
| Tapidor   | Tap | 2001        | GAE                       |
| Tilburi   | Til | 1994        | RAGT                      |
| Vivant    | Viv | 1991        | Momont                    |

Tableau 1: Liste des 30 géotypes expérimentés dans le cadre du projet; la plupart sont des variétés inscrites au Catalogue officiel (ce = catalogue européen).

### Traitements

Trois principaux traitements expérimentaux ont été choisis afin (1) de couvrir une gamme relativement large de nutrition azotée et (2) d'estimer les paramètres du modèle Azodyn pour l'ensemble des variétés testées :

- traitement "Potentiel" : pour estimer le rendement potentiel de la variété,
- traitement "faible densité" : pour permettre l'estimation du Poids de Mille Grains (PMG) maximum de la variété en créant *a priori* des conditions limitant le nombre de grains par m<sup>2</sup> mais pas le PMG,
- traitement "N limitant" : pour estimer la réaction de la variété à une carence en azote en choisissant une carence marquée.

### Dispositif expérimental

Sur deux années (2003-04 et 2004-05), sept lieux d'essais ont été choisis afin de tester les variétés dans différentes conditions pédo-climatiques : Allonnes (28), Auchy (59), Estrées-Mons (80), Estrées-Saint-Denis (60), Le Moulon (91), Maisse (91) et Ouzouer (41). Au total, les variétés ont été expérimentées dans 27 environnements (combinaisons lieu x année x traitement). Chaque essai a été conduit selon un dispositif en blocs complets avec deux ou trois répétitions.

### Mesures

Les principales mesures ont concerné :

- sur tous les sites, les quantités d'N minéral dans le sol, par horizon de 30 cm, sur la variété Soissons à 4 dates : semis, sortie hiver, floraison et maturité. A Mons, les reliquats à la floraison et à la maturité ont été réalisés sur 6 variétés : Apache, Arche, Charger, Récital, Ritmo et Soissons,
- sur tous les sites et tous les génotypes, la date d'épiaison, le rendement, le PMG et la teneur en protéines du grain par infra-analyseur (NIRS 6500, Foss NIRSystems, USA),
- à l'INRA de Mons et du Moulon et sur tous les génotypes, la date de floraison, la matière sèche et la teneur en N des parties aériennes à la floraison et à la maturité,
- à l'INRA de Mons et sur tous les génotypes, un échantillon aléatoire de 20 feuilles étendards a été prélevé à floraison + 14 jours et floraison + 28 jours sur le traitement "potentiel". Ces feuilles ont été congelées immédiatement dans l'azote liquide pour permettre les mesures de teneurs en protéines, activité de la glutamine synthétase, activité de la glutamate déshydrogénase et activités potentielle et réelle de la nitrate réductase.

## 2. Résultats

### ► Description de la variabilité génétique pour la réponse à une carence en azote

#### Objectif

L'objectif a été de décrire la variabilité des génotypes pour le rendement et la teneur en protéines en réponse à une carence en azote. Les analyses ont été conduites pour les 27 milieux expérimentés en 2004 et 2005 et sur 27 variétés présentes dans l'ensemble des milieux. Les analyses ont été basées sur :

- la régression conjointe, qui est la régression du rendement d'un génotype en fonction du rendement du milieu (estimé par la moyenne des rendements des variétés testées dans ce milieu),

- la relation entre le rendement obtenu à faible niveau d'azote et le rendement obtenu à fort niveau d'azote et les écarts à cette relation,
- la relation entre la teneur en protéines et le rendement et les écarts à cette relation (appelés GPD pour Grain Protein Deviation).

### Variabilité génétique

La régression conjointe permet de décrire de façon satisfaisante le comportement des variétés au vu des coefficients de détermination qui varient de 0.97 pour Quebon à 0.69 pour Récital. Les deux paramètres permettant de décrire les variétés sont ensuite le rendement moyen de la variété (ici selon les faibles niveaux d'azote) et la pente de la droite de régression. La pente indique la réponse de la variété à la fertilité du milieu et, dans notre cas où les milieux sont fortement contrastés pour le niveau d'azote, on peut estimer que cela équivaut à la réponse à l'offre en azote. Lorsque la pente est supérieure à 1, la variété répond très fortement à une variation de niveau d'azote. Lorsqu'elle est inférieure à 1, elle est beaucoup plus stable. Il existe, dans l'échantillon de variétés, une grande gamme de variations pour les deux paramètres de la régression conjointe. Des variétés comme Isengrain ou Arche présentent à la fois des rendements intéressants à faible niveau d'azote et une relative stabilité avec des pentes proches de 1. Des variétés comme Grisby et Isidor sont beaucoup plus réactives au milieu.

Il existe aussi une variabilité entre les génotypes en ce qui concerne la deuxième relation étudiée, celle reliant le rendement en conditions limitantes en azote au rendement en conditions potentielles. A partir de ces données, nous avons calculé un indice caractérisant la réponse à l'azote limitant : pour chaque variété, nous avons déterminé l'écart à la régression entre les moyennes obtenues à chacun des deux niveaux d'azote. Lorsque l'écart est positif, la variété est considérée comme tolérante, tandis que la variété est considérée comme sensible, lorsque l'écart est négatif. Par exemple, Ornicar, Parador et Renan sont considérées comme tolérantes, tandis que Grisby et Soissons sont considérées comme sensibles.

La troisième relation étudiée est celle reliant la teneur en protéines au rendement et permettant l'estimation du GPD (écart à la relation rendement-teneur en protéines). La teneur en protéines et le rendement sont, de façon générale, corrélés négativement. Le coefficient de corrélation est ainsi de  $r = -0.64$  pour le niveau potentiel et de  $r = -0.69$  pour le niveau N limitant. Il est toutefois possible d'identifier des variétés qui s'écartent de la relation négative. Les GPD obtenus pour les deux niveaux de fertilisation azotée sont assez fortement corrélés ( $r=0.75$ ) indiquant une bonne conservation des classements entre les deux niveaux de fertilisation azotée. Des variétés comme Parador et Arche montre un écart négatif et Quebon et Renan un écart positif quel que soit le niveau d'azote. Pour d'autres variétés, telles que Ornicar, Courtôt, Vivant ou Eureka, les classements peuvent varier, mais les écarts sont faibles entre les deux conditions (inférieurs à 0.5).

Dans une dernière étape, nous avons comparé les deux types d'écarts analysés précédemment, c'est-à-dire les GPD avec les écarts de réponse à l'azote limitant. Ces deux

variables étant faiblement corrélées (0.21), il existe une grande variabilité entre les génotypes (Figure 1).

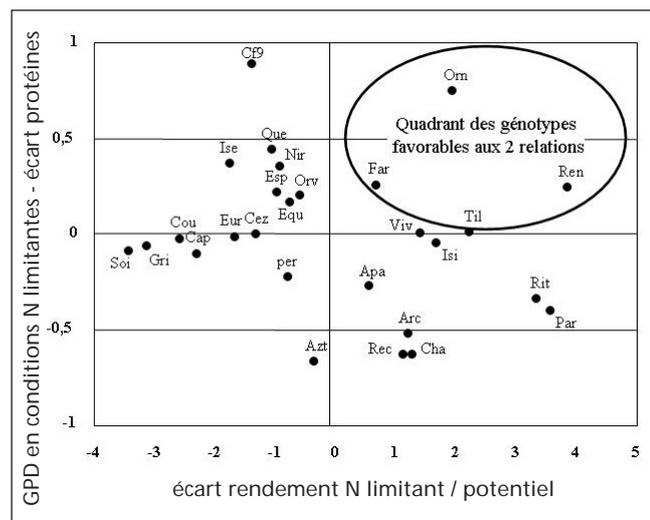


Figure 1 : Comparaison de l'écart à la relation rendement / teneur en protéines (GPD) et de la réponse à l'azote limitant mesuré par l'écart à la relation rendement N limitant / rendement conditions potentielles (les abréviations des noms des variétés sont données dans le Tableau 1).

### ► Paramétrage variétal du modèle Azodyn

#### Objectifs

Les trois objectifs sont :

- proposer une méthode de paramétrisation et d'utilisation du modèle Azodyn adaptée à une grande série variétale. L'identification des paramètres génotypiques importants a déjà fait l'objet d'un travail antérieur (Barbottin, 2004),
- évaluer la capacité prédictive du modèle pour le rendement en grain à faible et à fort niveau d'azote,
- identifier les paramètres génotypiques du modèle qui ont une influence sur la tolérance à une carence en azote.

#### Paramétrage génotypique du modèle

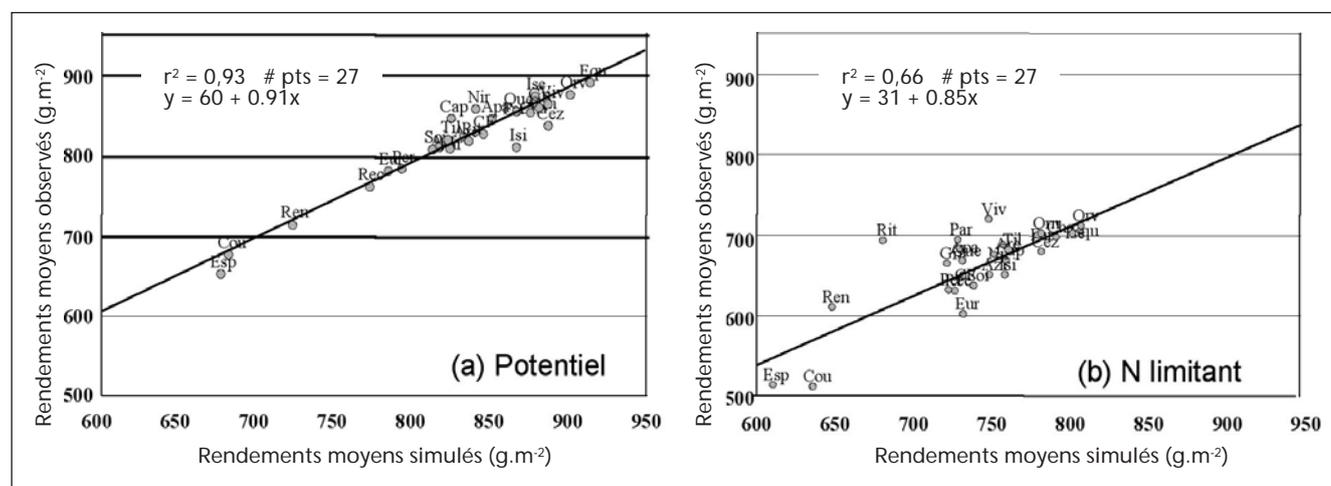
Pour générer des variables de sortie (rendement en grain, teneur en protéines), le modèle utilise des variables d'entrée (date de floraison, date du stade épi "1 cm") et des paramètres. Les trois paramètres génotypiques nécessaires à la prise en compte de l'effet variété par le modèle (Barbottin, 2004) sont le poids de mille grains maximal (PMG<sub>max</sub>), le rendement maximal (RDT<sub>max</sub>) et le

nombre de grains potentiel. Ce dernier est défini par le ratio du nombre de grains sur le rayonnement intercepté par le couvert (NG). Ces trois paramètres ne sont connus avec précision au début de l'étude que pour quelques variétés témoins.

Trois méthodes statistiques ont été utilisées pour déterminer le RDT<sub>max</sub> et PMG<sub>max</sub> (Herbain, 2006) : (1) le choix de la valeur maximum observée sur le réseau d'essais, (2) le calcul de différents quantiles, et (3) une méthode de ré-échantillonnage (bootstrap). Trois méthodes ont aussi été retenues pour la détermination de αNG, en ne considérant à chaque fois que les situations potentielles, c'est à dire permettant d'obtenir le nombre de grains maximum pour chaque variété : (1) rapport entre le nombre de grains.m<sup>-2</sup> de la variété étudiée sur celui de la variété Soissons, ce même rapport (2) pondéré par la somme de rayonnement incident entre le stade épi à 1cm et l'épiaison et (3) pondéré par la somme en degré.jour entre le stade épi à 1cm et l'épiaison.

Dix-huit paramétrages ont été testés, chacun étant une combinaison des différentes méthodes d'estimation du RDT<sub>max</sub>, PMG<sub>max</sub> et αNG. Le paramétrage qui a été retenu est celui conduisant à la plus faible erreur moyenne de prédiction (RMSEP ou Root Mean Square Error of Prediction). Cette erreur est obtenue en calculant la racine carrée de la somme des carrés des différences (valeur observée – valeur simulée). La valeur prédictive du modèle est beaucoup plus sensible aux méthodes d'estimation du RDT<sub>max</sub> et PMG<sub>max</sub> qu'aux méthodes d'estimation du αNG. Le paramétrage qui permet les meilleures prédictions par le modèle regroupe les méthodes suivantes : PMG<sub>max</sub> estimé par le quantile 75, RDT<sub>max</sub> estimé par le quantile 75 et αNG estimé en tenant compte de la somme en degré.jour entre le stade épi à 1cm et l'épiaison.

En moyenne, l'erreur de prédiction est de l'ordre de 10 q/ha<sup>-1</sup>, ce qui est courant pour les modèles dynamiques de culture. On peut remarquer qu'elle est plus forte en moyenne pour le traitement en azote limitant (11.1 q/ha<sup>-1</sup>) que pour le traitement potentiel (8.1 q/ha<sup>-1</sup>). Les Figures 2 présentent les rendements moyens observés et simulés pour les traitements potentiel et azote limitant. La plus forte erreur moyenne de prédiction en azote limitant est en partie due à une surestimation systématique du rendement. Une première analyse montre que cela pourrait être dû à une mauvaise estimation du nombre de grains par m<sup>2</sup> en situation de carence.



Figures 2 : Comparaison des rendements moyens simulés et observés pour (a) les traitements potentiels et (b) azote limitant (les abréviations des noms des variétés sont données dans le Tableau 1).

Une large gamme de variabilité est obtenue pour les valeurs des paramètres du modèle :

- le PMG<sub>max</sub> varie de 44.2 pour Parador à 57.1 g pour Euréka,
- le RDT<sub>max</sub> varie de 88.3 pour Espéria à 111.5 q/ha<sup>-1</sup> pour Bastide,
- le rapport du  $\alpha$ NG par rapport à celui de Soissons varie de 0.72 pour Renan à 1.10 pour Taldor.

#### **Analyse de sensibilité du modèle**

Le but de l'analyse de sensibilité est d'identifier les facteurs variétaux du modèle qui ont une influence significative sur les variables d'analyse du comportement variétal, c'est-à-dire les variables de sortie tel que le rendement. En plus des paramètres génotypiques exposés précédemment (PMG<sub>max</sub>, RDT<sub>max</sub> et  $\alpha$ NG), deux variables d'entrée dépendant de la variété ont été prises en compte dans cette analyse de sensibilité : la date des stades épi à 1 cm et floraison. L'objectif est donc de hiérarchiser et de quantifier les effets de ces cinq variables sur les variables de sortie du modèle. Cela permet d'identifier les variables qu'il est nécessaire d'estimer avec précision. Ainsi, une économie de moyen sur l'estimation des autres paramètres sera appréciée par les utilisateurs du modèle.

Pour déterminer la gamme de variation, nous nous sommes appuyés sur la gamme de valeurs observées au sein du réseau d'essais. Les valeurs retenues pour les variables d'entrée du modèle et les paramètres génotypiques représentent les valeurs maximales et minimales observées, ainsi que deux valeurs intermédiaires. L'analyse de sensibilité a été réalisée pour les deux pédoclimats de Mons (années d'essai 2004 et 2005). Trois niveaux de fertilisation azotée ont été considérés : carence précoce (apports 50 kg. ha<sup>-1</sup> épi à 1 cm et 60 kg. ha<sup>-1</sup> floraison), carence tardive (apports 50 kg. ha<sup>-1</sup> sortie hiver et 60 kg. ha<sup>-1</sup> épi à 1 cm) et niveau potentiel (apports 50 kg. ha<sup>-1</sup> sortie hiver, 100 kg. ha<sup>-1</sup> épi à 1 cm et 60 kg. ha<sup>-1</sup> floraison).

En moyenne, les rendements simulés sont de l'ordre de 60 q. ha<sup>-1</sup> pour la carence précoce et de l'ordre de 80 q. ha<sup>-1</sup> pour les deux autres traitements. Parmi les cinq facteurs génotypiques testés (RDT<sub>max</sub>, PMG<sub>max</sub>,  $\alpha$ NG, date de Floraison, date du stade épi 1 cm), quatre d'entre eux ont une influence significative sur le rendement. La date du stade épi 1 cm a beaucoup moins d'influence. Pour les deux traitements carencés en azote, on remarque globalement une forte influence du  $\alpha$ NG et donc de la capacité de la variété à produire un nombre de grains potentiel.

Dans une deuxième étape, l'analyse des simulations a porté sur l'interaction génotype x traitement azoté. L'interaction représente de l'ordre de 15 % de la variance totale ce qui est de l'ordre de grandeur de l'interaction obtenue dans le réseau d'essais du projet. En 2004, on constate que deux caractéristiques variétales expliquent majoritairement l'interaction génotype x traitement pour le rendement : la date de floraison et le RDT<sub>max</sub>. En 2005, l'interaction est principalement expliquée par le RDT<sub>max</sub>, puis de façon égale par la date de floraison, le PMG<sub>max</sub> et l' $\alpha$ NG. A nouveau, la date du stade épi 1 cm n'a qu'une influence très faible sur le résultat final, c'est-à-dire dans l'explication de l'interaction génotype x traitement.

Nous avons cherché à expliciter l'interaction date de floraison x traitement azoté en considérant uniquement les traitements extrêmes (carence précoce et potentiel). Cette analyse montre que les génotypes précoces sont moins sensibles à une carence en azote. En effet la

différence de rendement entre les deux traitements est de l'ordre de 15 q. ha<sup>-1</sup> pour une floraison du 21 mai et de l'ordre de 27 q. ha<sup>-1</sup> pour une floraison du 10 juin.

### **► Absorption et remobilisation de l'azote**

#### **Objectifs**

Les deux objectifs sont :

- quantifier, grâce aux mesures faites à floraison et maturité, les différences génotypiques pour la capacité à absorber l'azote avant et après floraison et la capacité à remobiliser l'azote des parties végétatives vers les grains durant la phase de remplissage. De façon générale, environ 70-80 % de l'azote total sont absorbés avant floraison et ils vont constituer de l'ordre de 65-75 % de l'azote du grain à maturité,
- déterminer la part de l'écart à la relation rendement - teneur en protéines expliquée par l'absorption post-floraison et la remobilisation de l'azote.

#### **Absorption et remobilisation post-floraison**

Des différences significatives sont montrées entre génotypes pour la quantité d'azote absorbé après la floraison dans 8 milieux sur 12 et l'interaction génotype x dose d'azote (N limitant, potentiel) est significative dans deux situations sur quatre (Mons 2004 et Moulon 2005). Des différences significatives sont observées pour la quantité d'azote remobilisé dans 6 milieux sur 12 et l'interaction génotype x dose d'azote (N limitant, potentiel) est significative dans une situation sur quatre (Mons 2004).

Les génotypes absorbant le plus d'azote après la floraison sont Récital, Espéria, Courtôt, Nirvana, CF99102. Les variétés remobilisant le plus d'azote sont Grisby, Apache et Vivant. Sur la moyenne des milieux, on observe une corrélation négative entre l'azote absorbé avant et après floraison ( $r = -0.54$ ). Pour une même quantité d'azote à la floraison, les quantités d'azote absorbé après floraison peuvent être toutefois relativement différentes : par exemple 3.2 g. m<sup>-2</sup> (soit 32 kg. ha<sup>-1</sup>) pour CF99102, contre seulement 1 g. m<sup>-2</sup> (soit 10 kg. ha<sup>-1</sup>) pour Ritmo.

Des différences significatives entre variétés sont observées pour l'efficacité de remobilisation de l'azote (Azote remobilisé/Azote floraison) pour 5 milieux sur 12. Sur l'ensemble des milieux, la gamme de variation s'étale de 0.756 (Ritmo) à 0.801 (Isidor). Comme montré précédemment par Barbottin *et al.* (2005), la quantité d'azote absorbé à la floraison est le déterminant principal de la quantité d'azote remobilisé : sur l'ensemble des milieux, la quantité d'azote des parties aériennes à la floraison explique 86 % de la variation de la quantité d'azote remobilisé.

#### **Relation avec l'écart à la relation rendement - teneur en protéines**

Les valeurs obtenues pour la quantité d'azote remobilisé et la quantité d'azote absorbé post-floraison ont été corrélées avec l'écart à la relation rendement teneur en protéines (GPD) calculé précédemment. La corrélation n'est pas significative avec la quantité d'azote remobilisé. Si on considère chaque milieu individuellement, la corrélation n'est significative dans aucun des 12 milieux testés.

La corrélation est par contre significative avec la quantité d'azote absorbé en post-floraison qui explique environ 50 % du GPD. La corrélation est significative dans 9 des 12 milieux testés. Elle est la plus forte pour Mons 2005 à faible densité ( $r = 0.69^{***}$ ) et la plus faible au Moulon en 2005 en

azote limitant ( $r = 0.22ns$ ). Les trois milieux dans lesquels la corrélation n'est pas significative sont les trois milieux présentant la plus faible absorption post-floraison (Mons 2004 N limitant, Moulon 2004 N limitant, Moulon 2004 N potentiel).

## ► Analyses physiologiques

### Objectifs

L'azote est principalement absorbé avant floraison sous forme de nitrate qui va, dans un premier temps, être réduit en nitrite par la Nitrate Réductase (NR), puis en ammonium par la Nitrite Réductase. L'ammonium est ensuite incorporé dans les acides aminés par le cycle de la Glutamine Synthétase (GS) et de la Glutamate Synthase (GOGAT). Après la floraison, les protéines sont dégradées pour produire de l'ammonium et des acides aminés. Le recyclage de l'ammonium libéré au cours de l'hydrolyse des protéines va être notamment assuré par une forme cytosolique de la GS induite au cours du vieillissement des feuilles mais également par deux autres formes de l'enzyme présentes dans le tissu vasculaire (phloème en particulier). Une autre enzyme, la glutamate déshydrogénase (GDH), dont le rôle n'est pas complètement élucidé, pourrait intervenir dans la régulation du transport de l'azote par le phloème où l'enzyme est localisée. Chez le maïs et le riz, il a été montré par des analyses QTL (Quantitative Trait Loci) qu'une partie des variations observées pour des caractères agronomiques pouvaient être expliquées par des différences d'activité de ces enzymes (Yamaya *et al.*, 2002; Hirel and Gallais, 2004).

Le premier objectif de cette partie est d'abord d'estimer la variabilité génotypique présente pour les niveaux d'activité des trois enzymes NR, GS et GDH et la teneur en protéines de la feuille étandard (F1). Le deuxième est de rechercher des corrélations entre les activités enzymatiques et les différences de gestion de l'azote par la plante observées après la floraison (absorption, remobilisation, sénescence) ou les autres caractères agronomiques mesurés.

### Variabilité génotypique

Les analyses montrent une variabilité génotypique pour les trois activités enzymatiques (NR, GS, GDH) et la teneur en protéines de la feuille étandard aux deux stades de prélèvement (Floraison +14 et Floraison +28) situés dans la phase de remplissage du grain :

- la teneur en protéines varie de 98,1 (CF99102) à 137,1  $mg \cdot g^{-1}$  (Equilibre) à floraison + 14j et de 66,1 (Quebon) à 108,0  $mg \cdot g^{-1}$  (Soissons) à floraison + 28j,
- l'activité de la glutamine synthétase varie de 11,5 (Soissons) à 18,8  $nmol \cdot g\text{-GHM} \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$  (Courtôt) à floraison + 14j et de 6,2 (Renan) à 13,3  $nmol \cdot g\text{-GHM} \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$  (Soissons) à floraison + 28j,
- l'activité de la glutamate déshydrogénase varie de 0,59 (Cézanne) à 1,24  $nmol \cdot NADH \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$  (Soissons) à floraison + 14j et de 0,89 (Récital) à 2,19  $nmol \cdot NADH \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$  (Espéria) à floraison + 28j,
- enfin l'activité réelle de la nitrate réductase varie de 79,6 (Charger) à 218,5  $nmol \cdot NO_2 \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$  (Pernel) à floraison + 14j et de 27,3 (Caphorm) à 138,5  $nmol \cdot NO_2 \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$  (Espéria) à floraison + 28j.

La précision des mesures est relativement faible comme l'attestent les coefficients de variation qui sont de l'ordre de 11 % pour les teneurs en protéines et de l'ordre de 20-25 % pour les activités enzymatiques. L'utilisation de ces caractères pour une comparaison variétale reste donc

fortement dépendante d'une amélioration des techniques de mesure. Malgré cela, des différences significatives ont pu être mises en évidence entre génotypes.

A floraison + 14j, aucune corrélation significative n'existe entre les activités des trois enzymes. Par contre à floraison + 28j, les activités sont corrélées entre elles (coefficient de corrélation de 0.41 à 0.62). On peut certainement voir dans ce phénomène une liaison avec la sénescence de la feuille. Une variété dont la feuille étandard serait fortement sénescence aura une faible activité enzymatique quelle que soit l'enzyme considérée. Ce résultat a déjà été observé par Kichey *et al.* (2006). Aucune corrélation significative n'existe aussi entre les activités mesurées pour la même enzyme aux deux dates de prélèvements. Le comportement des variétés va donc être très différent entre les deux dates de prélèvements. Enfin, il existe généralement une corrélation négative entre les activités et la date de floraison, les variétés tardives ayant des activités plus faibles.

### Corrélation avec les variables agronomiques

Des corrélations ont été recherchées entre les mesures physiologiques et plusieurs des caractères agronomiques mesurés dans les parties précédentes (GPD, absorption et remobilisation de l'azote). Les principaux résultats sont :

- pour les six caractères agronomiques considérés, le nombre de corrélations positives avec les mesures physiologiques va de 1 (GPD) à 10 (Absorption azote post-floraison). Elles sont positives (teneur en protéines, rendement en azote, GPD et absorption d'azote post-floraison) ou négatives (rendement en grain, remobilisation). La plus forte corrélation est de 0.56, ce qui fait une explication au maximum de 30 % de la variation du caractère,
- une corrélation positive ( $r=+0.56$ ) entre la quantité d'azote absorbé en post-floraison et l'activité potentielle de la nitrate réductase. Ce résultat confirme ceux déjà obtenus par Kichey *et al.* (2006, 2007). On trouve aussi des corrélations significatives mais plus faibles avec les activités de la GS et de la GDH et la teneur en protéines de la feuille étandard,
- une relation positive ( $r = +0.49$ ) entre l'activité de la GDH à floraison + 14 jours et l'écart à la relation rendement/teneur en protéines. C'est la seule corrélation positive significative observée pour cette variable. On retrouve cette corrélation en considérant cette fois la teneur en protéines du grain. Le rôle physiologique de cette enzyme reste hypothétique mais si elle intervient dans la régulation du transport de l'azote au niveau du phloème, on peut supposer qu'une plus forte activité de la GDH se traduirait par une plus grande quantité d'azote disponible pour le grain. Chez le maïs, il a été montré que des QTL de rendement en grain co-localisent avec des QTL d'activité GDH (Gallais *et al.*, 2004).

## ► Suivi des profils d'azote minéral dans le sol

### Objectifs

L'objectif de cette partie est le suivi du contenu en azote minéral du sol à différentes périodes clés du cycle de développement de six variétés témoins différenciées quant à leur aptitude à valoriser l'azote pour mesurer leur impact potentiel sur l'environnement. Les six variétés sont Apache, Arche, Charger, Récital, Ritmo et Soissons. Par ailleurs, pour la variété Soissons, des mesures ont été réalisées sur différentes modalités de disponibilité en azote du milieu.

### Évolution des profils d'azote minéral

La Figure 3a montre un exemple d'évolution au cours du temps des profils d'azote minéral pour la variété Apache et le traitement N potentiel de l'essai de Mons 2004. A l'implantation (20 Octobre 2003), la quantité d'azote minéral s'élève à 42 kg N.ha<sup>-1</sup>, localisée principalement en surface. Après l'hiver, on retrouve 44 kg N.ha<sup>-1</sup>, qui ont légèrement migré en profondeur sous l'effet de la pluviométrie automnale et hivernale. A la floraison, l'azote mesuré dans l'horizon de surface (65 kg N.ha<sup>-1</sup>) correspond à une partie du dernier apport d'engrais non encore absorbée par la culture ; il ne reste pratiquement plus d'azote minéral dans les horizons plus profonds. A la récolte, il ne reste que 30 kg N.ha<sup>-1</sup> sur l'ensemble du profil. Le même type d'évolution des profils d'azote minéral, au cours du temps, est observé pour l'ensemble des six variétés témoins et pour les deux campagnes d'expérimentation.

La Figure 3b présente les profils d'azote minéral mesurés à la récolte pour les six géotypes sur le traitement N potentiel de l'essai de Mons. Un reliquat minimal d'environ 20 kg N.ha<sup>-1</sup> est atteint sur la profondeur de sol 30-150 cm pour l'ensemble des géotypes qui présentent une forte aptitude à valoriser l'azote disponible du sol sur la profondeur exploitée par les racines ; ce constat est d'ailleurs observé pour l'ensemble des situations pédoclimatiques expérimentales et l'épuisement en azote minéral des horizons du sol sous-jacents à l'horizon de surface est souvent atteint dès le stade floraison (forte absorption au cours de la montaison). La quantité d'azote minéral en surface (0-30 cm) varie de 13 à 23 kg N.ha<sup>-1</sup> sur le traitement N potentiel de Mons selon les variétés et correspond à la minéralisation de l'azote organique du sol pendant la période date de fin d'absorption - date de mesure du reliquat. Il n'y a pas de différence importante entre les variétés. On a pu observer des quantités d'azote minéral en surface pouvant atteindre 45 kg N.ha<sup>-1</sup> ; celles-ci sont fonction de la durée de la période fin d'absorption - date de mesure du reliquat, du type de sol (teneur en matière organique) et des conditions climatiques (température et humidité du sol) durant la phase post-absorption.

Des mesures de profils d'azote ont été réalisées à maturité pour la variété Soissons sur différents traitements : N potentiel, N limitant et faible densité. Les résultats

montrent qu'en fonction de la disponibilité en azote, comprenant l'azote fourni par le sol et l'azote apporté par l'engrais, on observe une tendance à un épuisement du sol plus intense en situation limitante. Les mesures indiquent également une tendance à un reliquat récolte un peu plus élevé dans le traitement faible densité.

### Effet de la disponibilité en azote sur l'absorption

L'apport d'engrais azoté influence la quantité d'azote absorbé. Un troisième apport d'azote de 60 kg N.ha<sup>-1</sup> a été réalisé le 14 Mai 2004 sur le traitement N potentiel de l'essai de Mons. Les profils d'azote minéral ont été mesurés à la floraison le 27 Mai pour Soissons, Apache et Récital, et le 7 Juin pour Arche, Charger et Ritmo. Les profils mesurés le 27 Mai montrent des valeurs plus élevées d'environ 34 kg N.ha<sup>-1</sup> avec une localisation de l'azote en surface. Cet azote correspond à la partie du troisième apport d'engrais non encore absorbée par la culture. A la floraison, on observe un écart d'environ 30 kg N sur l'absorption entre les 2 groupes de variétés. La fertilisation azotée, en particulier la position de la date d'apport par rapport au stade de développement de la culture, peut influencer sur les quantités d'azote absorbé à la floraison. Plus généralement, l'absorption d'azote à la floraison, l'absorption post-floraison, la remobilisation,... doivent être interprétées au regard de la disponibilité en azote du sol et des apports d'engrais azotés (doses et particulièrement dates d'apport).

Sur les essais de Mons et du Moulon, l'azote disponible et l'absorption à la récolte ont été comparés pour les six géotypes (Apache, Arche, Charger, Récital, Ritmo et Soissons) et différents traitements. La quantité d'azote disponible est estimée par (reliquat initial - reliquat final) + N engrais, le reliquat initial correspondant à la quantité d'azote minéral du sol en sortie d'hiver et le reliquat final à l'azote minéral du sol à la récolte. On fait l'hypothèse dans cette estimation que la minéralisation nette de l'azote du sol, l'organisation microbienne et les pertes par voie gazeuse aux dépens de l'engrais sont identiques pour les six géotypes. Les valeurs d'azote disponible et d'azote absorbé à la récolte sont relativement proches pour les divers traitements (N potentiel, N limitant et faible densité), indiquant une bonne valorisation de l'azote par les différents géotypes.

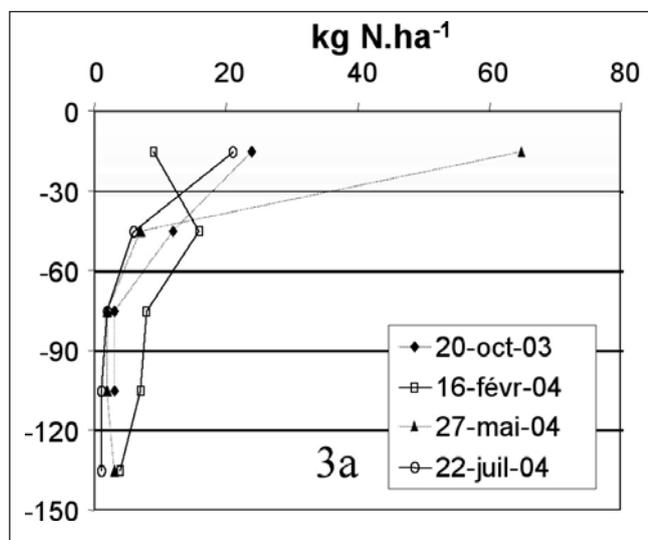


Figure 3a : Évolution des profils d'azote minéral pour la variété Apache mesurés à quatre dates (implantation, sortie hiver, floraison, maturité) sur le traitement N potentiel de Mons 2004.

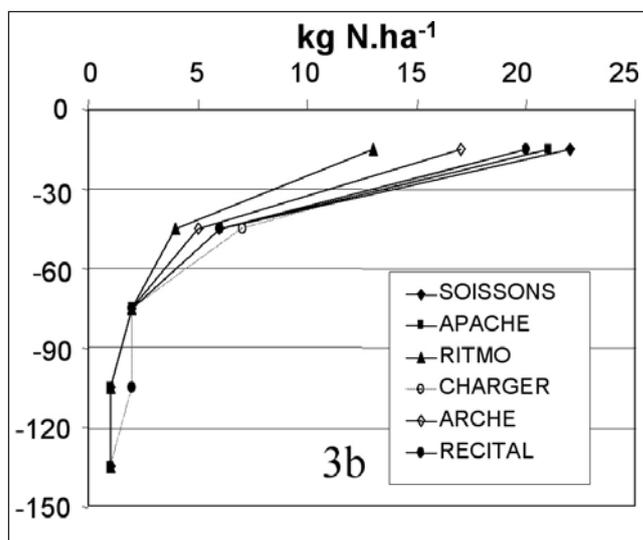


Figure 3b : Profils d'azote minéral à maturité pour les six géotypes sur le traitement N potentiel de l'essai de Mons.

### 3. Conclusions générales et perspectives

En conclusion, des différences significatives entre génotypes ont été observées pour l'ensemble des caractères agronomiques ou physiologiques mesurés au champ et en conditions contrôlées. Nous avons confirmé l'existence d'une variabilité génotypique pour la tolérance à une carence en azote et pour un écart positif à la relation rendement-teneur en protéines. De plus, des génotypes peuvent être favorables à la fois pour le GPD et leur réponse à l'azote limitant. Nous avons aussi montré l'existence de différences pour les valeurs des paramètres génotypiques du modèle de fonctionnement Azodyn, pour les quantités d'azote absorbé ou remobilisé après floraison et pour les activités de trois enzymes du métabolisme de l'azote.

Nous avons avancé dans la connaissance du déterminisme du GPD en montrant l'importance de la quantité d'azote absorbé après la floraison. Dans nos conditions, la quantité d'azote remobilisé après la floraison ne s'est pas révélée explicative des différences variétales. Le suivi des profils d'azote minéral dans le sol a toutefois montré que la disponibilité en azote aux stades clés de développement des variétés va dépendre de leur rythme de développement en interaction avec les dates d'apports d'azote et les conditions climatiques. Dans des essais comportant de nombreuses variétés, où il serait difficile d'individualiser les dates d'apports d'azote, une partie des différences observées entre variétés pourrait provenir de cette interaction avec la gestion de l'azote.

Nous avons enfin apporté des pistes de recherche pour le développement d'outils d'aide à la sélection. Nous avons pu proposer une méthode simplifiée de paramétrage génotypique pour le modèle de fonctionnement Azodyn qui peut être adaptée à une série relativement large de variétés. Cette étape est une première base pour permettre l'utilisation de ce type de modèle, au moins dans les étapes finales d'un programme de sélection sur une série limitée de lignées avancées. Nous avons pu montrer l'intérêt de deux enzymes dans la caractérisation de métabolisme de l'azote après la floraison. Leur utilisation passe toutefois par des phases de validation et de mise au point de méthodologie de mesures pour en améliorer la répétabilité.

Plusieurs perspectives peuvent être envisagées sur la base de ces résultats. Tout d'abord, la bonne relation entre quantité d'azote absorbé et GPD demande à être vérifiée dans des

conditions plus variées de disponibilités en azote. Le réseau expérimental que nous avons utilisé est principalement situé dans le nord de la France et nous avons, sauf une fois (Mons 2005), favorisé les apports d'azote plutôt précoces. Des situations expérimentales plus défavorables pour le remplissage du grain (plus fortes températures, sécheresse) pourraient révéler l'importance d'autres processus que l'absorption post-floraison. De même, des fractionnements différents, en particulier des apports d'azote tardifs, pourraient modifier le comportement des variétés. Comme nous l'avons vu, une bonne caractérisation des disponibilités en azote, si possible pour chaque génotype, devrait être réalisée aux stades clés de développement. On peut penser pour cet aspect à l'utilisation de modèles qui permettrait de déterminer les indicateurs du milieu (azote, eau) les plus pertinents. L'ensemble des résultats générés, complété éventuellement par de la simulation, permettrait aussi d'aborder la question du choix du milieu permettant de révéler avec la plus grande probabilité les génotypes favorables. L'identification du milieu et de la conduite culturale permettant de mettre en évidence des variétés GPD+ engendrerait des économies de moyens lors de mise en place des expérimentations.

Une des limites de cette étude réside dans la difficulté de déterminer facilement et précisément la gestion de l'azote après la floraison. L'estimation de la quantité d'azote absorbé et remobilisé durant le remplissage du grain est coûteuse en temps et en moyen car il faut prélever la biomasse aérienne à la floraison et à la maturité puis réaliser des analyses d'azote. Il serait nécessaire pour avancer sur des séries variétales importantes de recenser et de tester des méthodes rapides permettant d'estimer les quantités d'azote absorbées par la culture à la floraison et à la maturité.

Grâce à un important réseau expérimental, cette étude a permis d'identifier des génotypes montrant des écarts à la relation rendement-teneur en protéines que l'on peut qualifier de robustes. Quelques génotypes s'écartant positivement et négativement de cette relation pourraient être choisis et serviraient à valider l'intérêt des mesures d'activités enzymatiques. Parce qu'elles sont longues à réaliser, les activités enzymatiques n'ont été mesurées que dans un lieu et à un niveau d'azote. Une série de génotypes plus restreinte permettrait de regarder les corrélations entre ces activités et les caractères agronomiques d'intérêt dans des situations plus variées.

### Références bibliographiques

**Barbottin A.**, (2004) Utilisation d'un modèle de culture pour évaluer le comportement des génotypes : pertinence de l'utilisation d'Azodyn pour analyser la variabilité du rendement et de la teneur en protéines du blé tendre. Thèse pour l'obtention du titre de Docteur de l'INA-PG, 178 pp.

**Barbottin A.**, Lecomte C., Bouchard C., Jeuffroy M.-H., (2005) Nitrogen Remobilization during Grain Filling in Wheat: Genotypic and Environmental Effects. *Crop Science* 45 : 1141-1150

**Gallais A.**, Hirel B., (2004) An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. *Journal of Experimental Botany* 55 : 295-306

**Herbain C.**, (2006) Utilisation du modèle AZODYN pour prévoir le comportement des variétés de blé tendre d'hiver vis-à-vis de nutriments azotés sub-optimales. Rapport de Master 2 de l'IUP-PVIA de l'université Picardie Jules Verne d'Amiens.

**Hirel B.**, Andrieu B., Valadier M.-H., Renard S., Quilleré I., Chelle M., Pommel B., Fournier C., Drouet J.-L., (2005) Physiology of maize II: Identification of physiological markers representative of the nitrogen status of maize (*Zea mays* L.) leaves, during grain filling. *Physiol Plant* 124 : 178-188.

**Jeuffroy M.-H.**, Recous S., (1999) Azodyn: a simple model simulating the date of nitrogen deficiency for decision support in wheat fertilization. *European Journal of Agronomy* 10 : 129-144

**Kichey T.**, Heumez E., Pocholle P., Pageau K., Vanacker H., Dubois F., Le Gouis J., Hirel B., (2006) Combined agronomic and physiological aspects of nitrogen management in wheat (*Triticum aestivum* L.). Dynamic and integrated views highlighting the central role of the enzyme glutamine synthetase. *New Phytol* 169 : 265-278.

**Kichey T.**, Hirel B., Heumez E., Dubois F., Le Gouis J., (2007) Wheat genetic variability for post-anthesis nitrogen absorption and remobilisation revealed by <sup>15</sup>N labelling and correlations with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crop Res* 102 : 22-32.

**Yamaya T.**, Obara M., Nakajima H., Sasaki S., Hayakawa T., Sato T., (2002) Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. *Journal of Experimental Botany* 53 : 917-925



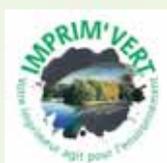
# Synthèse des programmes de recherche 2003 et 2004



## Les principaux partenaires des programmes FSOV



**Section Céréales et Protéagineux**  
44 rue du Louvre - 75001 Paris  
Tél.: 01 42 33 86 79 - E-mail : fsov@gnis.fr



ISBN - 978 - 2 - 9529 - 6440 - 1



Mars 2009 - D0680