

---

**PROJET INTITULE : Caractérisation d'une nouvelle source de résistance à la fusariose au sein de *Triticum turgidum ssp.* Développement d'outils d'aide à la sélection.**

En réponse à l'appel à proposition 2011 du CTPS : **Conception et construction d'idéotypes pour apporter une réponse durable aux contraintes biotiques et abiotiques, et pour assurer des produits de qualité.**

---

**COÛT TOTAL DU PROJET :** 266 700 € TTC (Hors Salaires Publics)

---

**MONTANT DE LA SUBVENTION :** 160 000 € TTC (ce montant doit être égal ou inférieur à **60% du coût total du projet HSP**)

---

**MOTS CLES** (5 au maximum) : *Triticum durum*, *Fusarium graminearum*, toxinogénèse, QTL, sélection assistée par marqueurs

## **1. IDENTIFICATION DE L'ORGANISME CHEF DE FILE ET DU CHEF DE PROJET**

### ORGANISME CHEF DE FILE :

Nom : GIE BLE DUR (Président Philippe Lonnet)  
Adresse : 7 rue Coq-Héron – 75030 PARIS CEDEX 01  
TEL : 01 44 76 88 20  
FAX : 01 42 36 57 34  
Mail : [marc.lecrivain@sicasov.com](mailto:marc.lecrivain@sicasov.com)  
Responsable administratif : M. Marc Lécrivain

### CHEF DE PROJET : Pierre Roumet

Organisme employeur : INRA  
Nom : UMR AGAP Equipe DAVEM  
Adresse : 2 pl. Viala, Bat 33, 34060 Montpellier Cedex 2  
TEL : 04 99 61 24 27  
FAX : 04 99. 61. 20. 64  
Mail : [Pierre.Roumet@supagro.inra.fr](mailto:Pierre.Roumet@supagro.inra.fr)

## 2. PRESENTATION GENERALE DU PROJET

### 2.1. Situation du problème au niveau technique et économique, intérêt pour la création variétale et la qualité des semences.

La fusariose de l'épi est une maladie causée par un complexe d'espèces fongiques des genres *Fusarium* et *Microdochium* (avec comme espèce majoritaire *F. graminearum*) qui constitue l'un des ensembles pathogènes les plus dangereux pour les céréales ; la quasi-totalité des graminées de grande culture sont affectées par ces champignons (Blés, Avoine, Orge, Seigle, Maïs..). La prévalence de cette maladie s'étend à l'ensemble des régions tempérées du globe.

L'attaque fongique par *F. graminearum* peut être localisée sur différents organes (racines, bas de tige, nœuds, épis) ; dans nos conditions de culture l'attaque sur épi est sans doute la plus préjudiciable. L'infection de la plante peut se faire à différents stades au cours d'une séquence relativement longue qui se situe entre la floraison et la phase de remplissage du grain. Plus la contamination survient tôt au cours de cette période, plus les dégâts sont préjudiciables. Le développement du champignon sur l'épi va affecter de façon conséquente non seulement le rendement, mais également la qualité technologique et sanitaire des récoltes des céréales.

Sur le plan quantitatif, l'importance de la perte de rendement dépend du stade de contamination :

- Une attaque précoce par *F. graminearum* permet au champignon de pénétrer le rachis de l'épi, de nécroser ce dernier et de causer ainsi un échaudage quasiment total de l'épi. Les grains récoltés dans ce cas sont très petits et une partie est éliminée directement lors de la phase de battage. Dans le cas de fortes attaques, les pertes de rendement peuvent représenter jusqu'à 20 q/ha.
- Une attaque plus tardive limite le développement du champignon, ainsi que sa production de toxines, mais provoque tout de même un échaudage d'une portion plus ou moins importante de l'épi et donc une réduction du poids de mille grains.

Sur le plan qualitatif, l'échaudage modifie le ratio « amande sur enveloppes », altérant les propriétés technologiques des grains issus des plantes contaminées et notamment les rendements en farine et en semoule pour les blés.

Enfin, sur le plan sanitaire, les champignons du genre *Fusarium* produisent de nombreuses mycotoxines qui vont contaminer les tissus périphériques du grain et qui, dans le cas de concentrations conséquentes, seront à l'origine de vomissements, d'inflammations de la peau et de troubles nerveux. La nature biochimique de ces toxines varie selon l'espèce ; *Fusarium graminearum*, qui est l'espèce la plus fréquemment retrouvée sur céréales à paille, est responsable de la contamination par des trichothécènes de type B (TCT B) et notamment le déoxynivalénol (DON) et une de ses formes hydroxylées, le nivalénol (NIV).

La réglementation européenne (Règlement CE N° 856/2005 de la Commission du 6 juin, 2005) impose maintenant des seuils de contamination pour les différents produits céréaliers. Pour le DON, principale fusariotoxine suivie sur les céréales, les seuils réglementaires ont été fixés à 1250 ppb sur le blé tendre et 1750 ppb pour le blé dur dans le cas de lots à destination de l'alimentation humaine, et à 8000 ppb pour les céréales destinées à l'alimentation animale. Des teneurs supérieures à ces seuils conduisent à l'interdiction de l'utilisation des lots de grains en alimentation humaine et animale.

Le contrôle des épidémies de fusariose par lutte chimique est coûteux et d'une efficacité limitée qui ne peut garantir des teneurs en toxines inférieures aux seuils réglementaires. Dans ces conditions, la limitation de la production de fusariotoxines impose de mettre en place des actions pour prévenir la contamination de la plante par le champignon. Des règles de bonne conduite basées sur la rotation culturale, les techniques de travail du sol (labour, broyage des résidus de culture...), la date de semis ou encore le choix variétal sont les principaux leviers de lutte contre la fusariose des épis. Le développement de variétés résistantes est donc un enjeu majeur pour limiter les dégâts générés par ces attaques.

Parmi les céréales à paille, le blé dur est l'espèce pour laquelle la fusariose pose le plus de problèmes : son niveau de sensibilité à cette maladie, en moyenne plus élevé que celui des autres espèces, et son utilisation, essentiellement destinée à l'alimentation humaine, rendent sensibles les aspects contamination par les fusariotoxines. Par ailleurs, le dispositif de recherche sur cette espèce est beaucoup moins développé que sur le blé tendre ; ainsi le nombre de publications consacrées à l'étude de la résistance à la fusariose est

beaucoup plus faible pour le blé dur (7 / 48 publications –données Février 2012 pour le blé dur/ blé tendre depuis 1999).

## **2.2. Programme envisagé précisant les moyens d'approche mis en œuvre, les espèces végétales étudiées, et les articles déjà produits par les équipes sur le thème.**

L'objectif de ce projet est de mettre en place des outils d'aide à la sélection pour construire des génotypes de blé dur résistants à la fusariose causée par *F. graminearum*, et à l'accumulation de mycotoxines correspondantes tout en conservant les caractéristiques nécessaires à une production de bonne qualité technologique. Sur le plan opérationnel, les actions proposées pour atteindre cet objectif se déclinent de la façon suivante :

- i) L'étude génétique de la résistance à la fusariose chez le blé dur : localisation des fragments chromosomiques impliqués dans l'expression de la résistance (QTL).
- ii) L'étude des bases biochimique et génétique de la résistance à l'accumulation de trichothécènes (DON/ NIV) et notamment du rôle des flavones dans ce mécanisme de résistance ainsi que la recherche des QTL impliqués.
- iii) L'identification de marqueurs pour le développement une stratégie sélection assistée par marqueurs.

Ce projet mobilise le Gie blé dur qui regroupe tous les sélectionneurs de blé dur travaillant en France (Syngenta, Florimond Desprez, Eurodur, R2N), les équipes d'ARVALIS Institut du végétal (Laboratoire de Pathologie Végétale, Pôle Variété et la responsable de la Filière Blé dur) ainsi que 2 équipes INRA. L'une (MycSA UR 1264) est basée à Bordeaux ; elle est spécialisée dans l'étude des interactions « plantes champignons » et impliquée dans de nombreux programmes sur les fusariotoxines ; la seconde, (UMR AGAP) à Montpellier met en œuvre des programmes liés à la connaissance et la valorisation de la diversité de l'espèce *T. turgidum* ainsi que l'introgression de caractères d'intérêts.

Les moyens (homme/mois, techniques) mis en œuvre pour réaliser ces différentes actions sont cohérents avec l'ensemble des compétences du consortium proposé : connaissance de l'espèce, mise à disposition d'un réseau expérimental, maîtrise du protocole d'inoculation et d'observation des symptômes, analyse d'image et calibrations Nirs sur le grain entier. Les ressources génétiques nécessaires à ce projet (population de Rils cartographiée issue d'un croisement entre 2 lignées très contrastées pour la résistance et l'accumulation de toxines, maîtrise du dosage des composés flavones cibles (cf point 2.3) sont disponibles. La résistance est apportée par un géniteur de la sous espèce *Triticum turgidum dicoccum* qui est une forme ancestrale du blé dur actuel (*Triticum turgidum durum*), partageant le même génome (AABB). Ce géniteur apporte un niveau de résistance très supérieur à ceux observés au sein de la forme cultivée; il a été identifié dès 2002 et l'ensemble des expérimentations mises en place (conditions de plein champ ou de tunnel) n'ont jamais démenti ce comportement. Une synthèse de ces essais est en cours (Trottet et al., in prep). Une étude comparative de la composition en composés phénoliques de différentes ressources génétiques de blé dur a mis en évidence l'existence spécifique de molécules de type flavone (vitexin, orientin et isoscoparin) dans les épis de ce géniteur et a soulevé l'hypothèse du rôle de ces flavones dans la résistance à l'accumulation de fusariotoxines. Enfin, en matière de génotypage, un des scénarios proposé (RNASeq) est basé sur les développements en cours réalisés au sein de l'équipe AGAP.

Ces acquis et leur mise à disposition dans le projet permettent, d'une part, de faire une proposition réaliste et, d'autre part, de proposer des axes de recherche novateurs correspondant au cœur des préoccupations de la sélection du blé dur. Ce domaine se doit en effet d'être en capacité de développer des variétés résistantes à la fusariose au cours des prochaines années du fait de la prévalence de cette maladie, de l'importance des implications sanitaires pour une espèce utilisée exclusivement en alimentation humaine, de la limite d'efficacité des traitements phytosanitaires (70%) et des contraintes actuelles portant sur ce moyen de lutte (plan EcoPhyto 2018).

### Publications des équipes impliquées ayant un lien avec le projet

Boutigny A.L., Richard-Forget F., Barreau C., 2008. Natural mechanisms for cereal resistance to *Fusarium* mycotoxins accumulation. Review. European Journal of Plant Pathology, 121:411-423.

- Boutigny A.L., Barreau C., Atanasova-Penichon V., Verdal-Bonnin MN, Pibnson –Gallais L., Richard-Forget F. 2009. Ferulic acid, an efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and tri gene expression in *Fusarium* liquid cultures, *Mycological Research*, 113:746-753.
- Boutigny A.L., Barreau C., Atanasova-Penichon V., Verdal-Bonnin MN, Pibnson –Gallais L., Richard-Forget F. 2010. Natural phenolic acids from wheat bran inhibit *Fusarium culmorum* trichothecene biosynthesis *in vitro* by repressing *Tri* gene expression". *European Journal of Plant Pathology*, **127** (2): 275-286
- HAUDRY A., CENCI, A., RAVEL C., BATAILLON, T., BRUNEL, D., PONCET, C., HOCHU, I., POIRIER, S., SANTONI, S., Glemin, S., David, J. 2007. Grinding up wheat: A massive loss of nucleotide diversity since domestication. *Mol.Biol. Evol.*, 24 : 1506-1517
- Lacaze X., Roumet P. 2012. Stage specific climatic characterization for studying QTL by Environment Interactions. *Heredity*. (under revision).
- Merhej J., Richard-Forget F., Barreau C. 2011. The pH regulatory factor Pac1 regulates *Tri* gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*. *Fungal genetics and Biology*, **48**:275-284.
- Ponts N., Pinson-Gallais L., Boutigny A., Barreau C., Richard-Forget F., 2011. Cinnamic-derived acids significantly affect *Fusarium graminearum* growth and *in vitro* synthesis of type B trichothecenes. *Phytopathology*, **101** (8):929-934.
- Trottet et al. Identification of source to the *Fusarium* Head Blight Resistance inside a *T. turgidum* ssp core collection. in prep.
- Vaissayre L., Ardisson M., Borries C., Santoni S., David J., Roumet P. 2012. Elite durum wheat genetic map and recombination rate variation in a multiparental connected design. *Euphytica* (in press).
- Thuillet AC, T Bataillon, T, S Poirier, S. Santoni, David J., 2005. Estimation of Long-Term Effective Population Sizes Through the History of Durum Wheat Using Microsatellite Data. *Genetics* 169: 1589–1599
- Toussaint-Ferreyrolle J, Beauvallet G, Maumene C., 2010. Symptoms and trichothecenes produced by different *Fusarium* species after micro-contamination of malting barley. *Plant breeding and seed science* (in press).

## 2.3 Bibliographie et acquis des équipes proposant

### 2.3.1 Bases génétiques de la résistance.

Classiquement on peut distinguer deux types de mécanismes de résistance à la fusariose :

- la résistance passive : La précocité, la hauteur, l'architecture et la biologie florale... peuvent affecter l'expression de la résistance au cours de l'épidémie naturelle (Buerstmayr *et al*, 2000)
  - la résistance active : cette dernière fait intervenir les mécanismes physiologiques de la résistance.
- Classiquement, cinq composantes de la résistance du blé à la fusariose ont été identifiées :
- Type I ; la résistance à l'infection primaire (Schroeder et Christensen, 1963).
  - Type II ; La résistance à la progression du champignon dans l'épi (Schroeder et Christensen, 1963)
  - Type III ; la résistance à l'infection des grains par le champignon, (Mesterhazy, 1995)
  - Type IV ; Tolérance à la baisse de rendement (Mesterhazy, 1995).
  - Type V ; résistance à l'accumulation des mycotoxines dans le grain (Mesterhazy, 1995).

Sur le plan génétique, la résistance « active » à la fusariose est classiquement décrite comme un caractère quantitatif affecté par de nombreux gènes ayant des effets additifs (Liu *et al* 2005, 2009 ; Kolb *et al.* 2001). L'interaction forte entre certains de ces loci et l'environnement complique la mise en place de programmes de sélection pour améliorer ce trait (Schmolke *et al.* 2005). De ce fait, de nombreux programmes, ciblés essentiellement sur le blé tendre, ont été développés pour rechercher des QTL liés à l'expression de cette résistance et/ou de l'accumulation de mycotoxines. De nombreux QTL ont été identifiés ; leur nombre, leur localisation et leur effets variant en fonction du background génétique utilisé (origines américaine/asiatique/ européenne). Les méta-analyses réalisées par Liu *et al.* 2009, Löffler *et al.* 2009, ont permis d'identifier 19 MetaQTL (essentiellement localisés sur les génomes A et B) impliquées dans l'expression de la résistance à la fusariose ; des propositions de stratégies de sélection assistée par marqueur pour améliorer la résistance des variétés de blé ont été faites (Buerstmayr *et al.* 2009). Des régions QTL correspondant à des combinaisons variées de types de résistance ont été identifiées comme celles situées sur les chromosomes 3BS, 6BS, et 5A apportées par les géniteurs asiatiques et notamment Sumai3. Sur le plan biochimique, la résistance de type V peut être liée à l'existence dans les grains de composés capables d'interférer avec la production de mycotoxines par *Fusarium*. Cette production se produisant très rapidement après l'infection, dans les 15 premiers jours suivant la floraison (Yoshida et Nakajima, 2010), la recherche de ces composés potentiellement inhibiteurs doit être réalisée dans les premiers stades de

remplissage du grain. Plusieurs arguments suggèrent que les composés phénoliques pourraient être d'excellents candidats (pour revue, Boutigny *et al.*, 2008) : ils sont présents en concentration élevée dans les premiers stades de remplissage du grain, plus abondants dans les tissus des variétés les plus résistantes et sont, de par leur potentiel antioxydant, de très bons inhibiteurs de la production de toxines *in vitro*.

Les études réalisées sur le blé dur sont beaucoup moins documentées. La faiblesse de la résistance à la fusariose au sein des lignées élites a incité la communauté internationale à rechercher des sources de résistance dans du matériel plus exotique. Des accessions exprimant des niveaux de résistance conséquents ont été identifiées au sein de la forme sauvage (*T. turgidum dicoccoides*), primitive à grains vêtus (*T turgidum dicoccum*) ou à grains nus (*T turgidum carthlicum*) (Gilbert, 1998 ; Buerstmayr *et al.* 2003 ; Kumar *et al.* 2007 ; Oliver *et al.* 2007). Des niveaux de résistance modérée ont également été récemment observés au sein de populations locales traditionnelles syrienne (Talas *et al.*, 2011) ou tunisienne (Fakhfakh, *et al.* 2011).

La localisation des QTL de résistance identifiés au sein de ces formes *T turgidum ssp* ainsi que la comparaison d'haplotypes aux QTL de résistance avec ceux obtenus pour le blé tendre suggère que cette variabilité génétique apporte de nouvelles sources de résistances. Les régions chromosomiques identifiées ne se regroupent que partiellement avec celles du blé tendre (variétés locales tunisiennes Huhn *et al.* 2012; 7AL et 2AL (*T. dicoccoides*, Kumar *et al.* 2007, Garvin *et al.* 2009); 2BL et 6BS (*T. carthlicum*, Somers *et al.* 2006).

### 2.3.2 Acquis et compétences des équipes proposant

En France, l'évaluation d'une core collection de *T turgidum ssp* comprenant des formes sauvage, primitive et moderne a mis en évidence le potentiel de résistance important d'accessions appartenant aux sous espèces *T. diccocom* et *T. carthlicum*. Cette résistance à l'infection par *F. graminearum* et à son développement au sein de l'épi s'accompagne également d'une faible accumulation de fusariotoxines et notamment des TCTb (DON) sur les grains matures (Trottet *et al.*, in prep). Depuis 2009, l'étude de cette résistance s'est prolongée dans le cadre d'une collaboration entre le Gie blé dur, Arvalis, et l'Inra (équipe Davem Montpellier et MycSa Bordeaux) (contrat Branche MAPA 2008-2011). Les sorties de ce programme nous permettent de disposer aujourd'hui d'outils pour étudier les bases génétiques de cette résistance et l'identification de potentiels marqueurs biochimiques liés à une moindre accumulation de DON.

En matière de mode opératoire, la contamination artificielle par brumisation d'une suspension de spores permet de contrôler l'inoculum, de faire coïncider infection et pic de sensibilité de la plante (floraison), et de s'affranchir d'effets indésirables tels que la variation de la hauteur de la plante dans l'expression de la résistance. La brumisation -ou l'irrigation- permet ensuite d'entretenir des niveaux d'hygrométrie favorables au développement du champignon. Compte tenu de la difficulté de réussir les expérimentations, ces précautions sont indispensables. Les notations sont recalées sur la précocité des génotypes pour réaliser des observations à durée constante après la floraison. Afin d'assurer la contamination des essais quelles que soient les conditions naturelles (climat défavorable, absence d'inoculum naturel) et parfaitement reproductibles entre lieux et/ou années, des protocoles ont été mis en place et validés par les équipes d'ARVALIS pour les étapes suivantes :

- la production d'un inoculum artificiel viable et agressif à partir de souches de *F. graminearum* actuelles et représentatives des infections naturelles survenant en France.
- La conservation de cet inoculum par congélation, afin de faciliter le transport de ce dernier sur les sites d'expérimentation et d'offrir une flexibilité d'application selon les stades des céréales à pailles.
- la réalisation sur le terrain (en champ, sous serre et sous tunnel) de la contamination artificielle par *F. graminearum*, comprenant la gestion de l'essai de sa mise en place à sa récolte.

Au cours de ce projet, l'inoculum de *F. graminearum* employé sur l'ensemble des essais sera produit à partir de la même souche (code ARVALIS FU10008), isolée à partir de céréales à paille en 2010 et parfaitement caractérisée pour son agressivité ainsi que sa production de toxines *in planta*. Ces travaux étaient des pré-requis indispensables à la réalisation d'expérimentations de qualité et comparables entre sites.

Les aspects de préparation de l'inoculum artificiel et de gestion des essais ont été complétés par la mise en place d'un cahier des charges relatif à la notation des symptômes, afin d'uniformiser les méthodes de phénotypage au champ. Outre les notations visuelles, deux autres paramètres seront mesurés pour

caractériser l'intensité d'attaque de la fusariose : la quantité d'ADN de *F. graminearum* sera mesurée par PCR en temps réel selon un protocole mis en œuvre par ARVALIS et le DON sera également dosé par ELISA. Ces 3 paramètres permettront de caractériser l'intensité des attaques fongiques sur chaque expérimentation et de les comparer afin de mieux appréhender les mécanismes de résistance des accessions de blé dur. Un cahier des charges relatif aux notations a été réalisé.

Sur le plan génétique, une accession résistante de la forme ancestrale *T dicoccum* (Dic2) a été identifiée. Les résultats des expérimentations réalisées entre 2003-2011 montrent que celle-ci a des niveaux de résistance très stables et très supérieurs à ceux observés au sein du groupe élite, et correspondant aux types I, II, III et V. Une population de Rils (n=184) issue du croisement entre cette accession, Dic2 et la variété Silur (sensible) a été créée par l'Inra. En collaboration avec le GIE blé dur, cette population a été cartographiée fin 2011 à l'aide de 819 marqueurs (essentiellement de type DArT) regroupés en 28 groupes de liaison et délimitant une carte génétique d'une longueur de 2660 cM (Fig. 1). Les caractéristiques de cette carte sont très correctes au regard de celles des 12 autres cartes *durum* publiées à ce jour (Vaissayre et al., 2012). Une évaluation agronomique préliminaire de ce matériel (2011), a montré clairement que cette résistance était transmissible à la descendance (Fig. 2); ces 1<sup>ères</sup> données permettant d'identifier 6 zones QTL situés sur les chromosomes 1B, 2A, 4B, 5A et 5B (lod Score > 3).

La résistance de type V conduit à une accumulation moindre de mycotoxines. Deux mécanismes peuvent être impliqués : (1) modulation de la toxinogénèse par l'existence de composés biochimiques inhibiteurs, (2) métabolisation des toxines produites par des réactions enzymatiques et en particulier glycosylation. Les premiers travaux menés en collaboration avec les partenaires du GIE blé dur ont permis de montrer que les mécanismes de glycosylation ne pouvaient expliquer la résistance des accessions appartenant aux sous espèces *T. dicoccum* et *T. carthlicum*. Cette résistance est liée à l'existence de composés biochimiques inhibiteurs des voies de biosynthèse des toxines. Au regard des premières données obtenues au sein du laboratoire INRA MycSA, il apparaît que les accessions les plus résistantes se caractérisent par la présence de composés phénoliques de type flavones dans les grains immatures. Ces composés ne sont pas détectés dans les accessions sensibles. L'étape suivante consiste en la validation de ce trait de caractère par l'analyse de la descendance entre Dic2 et la variété Silur (sensible).

La mise en place d'approches de type sélection assistée par marqueurs, nous impose, d'une part, de préciser la position de ces QTL et de disposer de marqueurs utilisables par les partenaires du GIE ce qui n'est pas le cas des DArT pour lesquels les obtenteurs ne disposent pas de la technologie correspondante. Il est donc nécessaire de redévelopper une cartographie à partir d'une autre source de marqueurs. Une première stratégie est de profiter des travaux sur la recherche de polymorphisme chez le blé tendre (*Triticum aestivum*). Pour cette espèce, de nombreux marqueurs SNP ont été développés et mis à disposition pour être utilisés en masse selon la technologie des puces (Illumina 384 ou 1536 SNP) (Akhunov et al, 2009). Des puces plus performantes (jusqu'à 90K) sont en cours de développement et devraient être disponibles en 2012-2013 (initiatives de l'Université du Kansas –E. Akhunov-, de l'Université de Bristol –K.J. Edwards- et de l'Inra Clermont Ferrand –P. Sourdille, E. Paux-). Cependant, ces puces ne sont pas forcément les plus adaptées à l'étude du polymorphisme de matériel tel que le nôtre car 1) les fréquences des SNP peuvent fortement différer entre le blé dur et le blé tendre, 2) le fond génétique de Dic2 est très exotique comme l'attestent les études de diversité (Thuillet et al., 2005, Haudry et al., 2007) générant un risque de polymorphisme non représenté dans les puces définies à partir de panels de blés élites, et 3) la polyploidie empêche de définir de manière non ambiguë à l'aide d'une puce SNP, les individus hétérozygotes.

Une stratégie alternative est de séquencer le transcriptome en mettant en œuvre des techniques génériques et universelles de RNASeq (Schneeberger and Weigel, 2011). Les techniques de préparation des banques d'ADNc, les étapes d'adressage (tagging) des génotypes pour travailler en mélange de plantes ainsi que le développement d'outils bioinformatiques adaptés à la recherche et la validation des polymorphismes font l'objet de travaux sur le blé dur (Projet ARCAD <http://www.arcad-project.org/>, et EPO durum) dans lesquels l'équipe Inra AGAP est très impliquée.

Les services de la plateforme technologique Montpellier Genomix (<http://www.mgx.cnrs.fr>) permettent l'accès à un séquenceur NGS de type Illumina HiSeq2000 et de profiter de sa très grande productivité. Cette approche couple cartographie et analyse du transcriptome. Dans le cas d'une analyse sur des grains

immatures, cette approche permettrait de relier les travaux sur les flavones aux résultats obtenus sur le transcriptome (*cf supra*). Le choix entre ces 2 stratégies sera fait au cours de l'année 1 du projet.

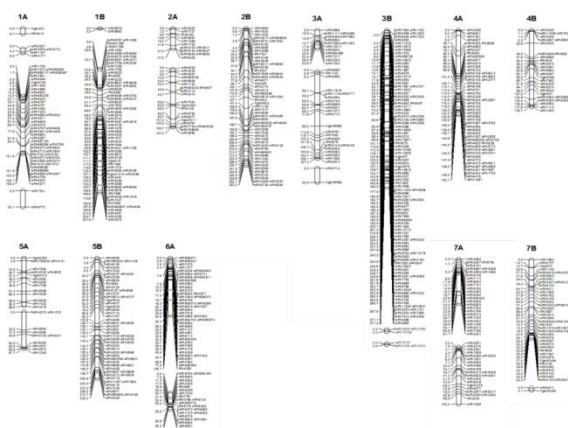


Fig 1 : Carte génétique de la population Dic2\*Silur mise à disposition du projet.

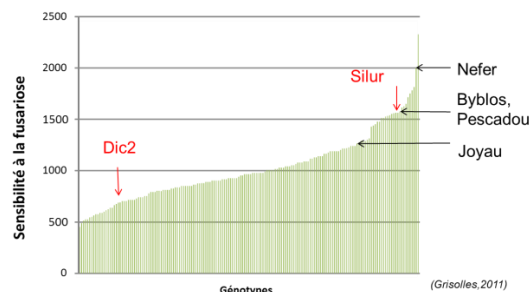


Fig. 2 : Distribution de la sensibilité à la fusariose au sein de la descendance Dic2 \* Silur (site Grisolles 2011). La sensibilité est mesurée par le nombre d'épillet contaminés.

La mise en relation des données génotypiques et phénotypiques génèrent des QTL généralistes (identifiés dans tous les sites) et d'autres spécifiques de sites, sujets aux interactions avec les facteurs environnementaux. Afin de mettre en place une approche explicative de ce terme d'interaction, nous utiliserons la modélisation proposée par Lacaze et Roumet (under revision, Heredity) dans laquelle l'interaction « QTL environnement » est découlée entre une interaction entre un QTL et chaque covariable environnementale mesurée au cours d'une phase phénologique donnée et un effet d'interaction non expliqué par ce couple QTL\*covariable. Cette opération est réitérée pour chaque phase phénologique afin de couvrir l'ensemble du cycle de la plante. L'interprétation d'interaction significative est facilitée par la représentation des effets alléliques associés aux valeurs prises par la covariable.

#### 2.4. Caractère innovant du projet

Pour la filière, la perspective de mise à disposition des sélectionneurs de blé dur d'une source de résistance dépassant en valeur le niveau connu au sein du pool élite et couplée à des outils d'aide à la sélection pour introgresser le matériel cultivé est un enjeu fort. Le fait qu'elle combine les aspects de résistance fongique (Types I et II) avec les aspects de réduction des risques de contamination (Type V) la rend indispensable pour relever les défis de la sélection de cette espèce.

Sur le plan international, ce travail contribue à la connaissance globale des bases génétiques et biochimiques de l'interaction « *Fusarium/ T turgidum ssp* ». Il complète les approches sur les populations locales de *T. durum* et sur les introgressions à partir d'un pool plus exotique (*T carthlicum*) développées par les équipes Européennes ou d'Amérique du Nord.

L'implication des flavones dans le contrôle de la toxinogénèse est très original et n'a pas été décrite par ailleurs ; si elle était validée, elle constituerait un élément de compréhension important sur la nature des composés biochimiques impliqués dans le processus de modulation de la toxinogénèse.

En matière de développement de marqueurs associés à la résistance, ce projet s'appuiera sur les outils de la génomique et sur les concepts statistiques les plus performants disponibles au moment de la mise en place du projet. Ceci guidera le choix entre les 2 stratégies (partie 2.3.2).

#### 2.5. Présentation des actions

##### 2.5.0 Mise à disposition des ressources : multiplication de semences (années 1 et 2)

Afin de pouvoir en semences l'ensemble des partenaires au cours du projet, des multiplications sont nécessaires. Les expérimentations de la 1ere année seront mises en place sur les stocks disponibles. Les 2 autres années, les multiplications seront mises en place par Eurodur (année 1 et 2) et les semences distribuées à l'ensemble des partenaires du projet. Outre la fourniture en semences des essais, ces

multiplications permettront de pourvoir en matériel végétal les analyses flavones réalisés par l'INRA MycSA (années 1 et 2). Les semences de l'année 1 seront fournies par l'INRA AGAP.

#### 2.5.1 Phénotypage de la descendance Dic2 \* Silur (années 1 et 2)

*Résistance à la fusariose (Gie Blé dur année 1 et 2)*: La population de 184 Rils issues du croisement entre Dic2 et Silur sera expérimentée dans 3 sites au cours des années 1 et 2 du projet (soit 6 sites au total). En fonction des disponibilités, les expérimentations seront implantées sur l'un des 3 sites proposés par les obtenteurs du Gie Blé dur : Louville Chenard (Eure et Loir, R2N), Grisolles (Haute Garonne, Syngenta) et Cappelle en Pévèle (Nord, Florimond Desprez) ou sur la plateforme IPM (Clermont Ferrand, INRA GDEC). Pour chaque expérimentation, les lignées seront répétées 2 fois dans des parcelles de 1 m<sup>2</sup>. Les parents du croisement (Dic2 et Silur) ainsi que des variétés de blé dur couvrant la gamme de réponse à la fusariose seront incluses dans cette expérimentation (Joyau, Néodur, Pescadou, Byblos, Nefer). Cinq autres géniteurs appartenant notamment à la forme *T. carthlicum*, et potentiellement résistants, seront testés.

Les lignées seront classées par groupe de précocité afin de faciliter l'inoculation à la floraison. Celle-ci se fera par pulvérisation d'une suspension de spores de *F. graminearum* à la floraison selon les protocoles définis par ARVALIS. Pour chaque parcelle, 10 épis seront identifiés à floraison et feront l'objet de notations à 350°C et 450°C après la floraison (nombre d'épis et d'épillets contaminés, i.e. résistance de type I et II). La hauteur des plantes, la date de floraison, l'extrusion des anthères seront également observées. Pour chaque site, les données météorologiques de base (température, hygrométrie) seront collectées.

*Production Inoculum et analyse a posteriori de la pression de la maladie sur chaque essai (Arvalis années 1 et 2)* : Afin de s'assurer de la contamination par *F. graminearum* dans les différents essais et de l'obtention de résultats comparables entre les sites d'expérimentation, l'ensemble des essais sera réalisé sous inoculation artificielle par pulvérisation d'une suspension de spores de *F. graminearum*. ARVALIS transfèrera aux membres du Gie Blé dur en charge des essais les protocoles d'application de l'inoculum artificiel, s'assurera du bon déroulement de cette inoculation et fournira également la souche de *F. graminearum* de référence FU10008, connue pour son bon comportement en contamination artificielle, sa capacité à infecter les céréales à paille et à produire des TCT B. La notation des symptômes au champ sera également standardisée selon une procédure déjà employée en routine chez ARVALIS.

Plusieurs paramètres de caractérisation de la fusariose seront mesurés à la récolte pour chaque site sur l'ensemble des répétitions d'un set de génotypes témoins (Dic2 et Silur, Joyau, Byblos, Nefer, Pescadou et Néodur), soit sur 42 échantillons par an, en années 1 et 2 du projet. La quantité d'ADN de *F. graminearum* sera appréhendée par PCR en temps réel et le DON sera dosé par ELISA (sous-traitance, cf infra § toxinogénèse). Ces paramètres seront ensuite croisés entre eux et avec les résultats des notations pour deux objectifs : fournir un phénotypage fin de la résistance des plantes à ce champignon (en abordant les différents types de résistance) et valider l'efficacité de la contamination artificielle.

*Battage et analyses post récolte (INRA AGAP années 1 et 2)*: Tous les épis produits au cours des expérimentations en condition inoculée seront rassemblés sur un même site (Montpellier). Ceux de toutes les variétés parentales et témoins seront battus en veillant à ne pas perdre les grains échaudés et envoyés pour une analyse DON. Au regard de ces résultats (cf § suivant) les épis des 3 essais retenus pour une analyses DON seront battus. Une analyse morphométrique de ces grains sera faite par analyse d'images (Opto-Agrimetric, Optomachines) pour quantifier l'impact de la maladie sur les paramètres de taille des grains. Afin de qualifier la qualité de ce matériel, une collecte spectrale (Nirs, Foss 6500, FOSS) se fera sur les grains produits en pépinière non inoculée (2 sites en année 1 -Inra et Eurodur-). Elle permettra d'évaluer les principaux paramètres impliqués dans les valeurs semoulière et pastière (teneur en protéines, taux de mitadin, poids spécifique et poids d'un grain, indice de Jaune)<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Les calibrations correspondantes ont été développées par le laboratoire Inra AGAP sur grain entier depuis 10 ans à partir de référence réalisées par le laboratoire Laboval (Valence, France). Pour les paramètres cités, le coefficient de détermination des prédictions varie entre 0.88 et 0.97 avec des erreurs de prédictions représentant entre 1 et 5% de la valeur moyenne de l'échantillon. Synthèse en cours de publication.



*Contamination en trichothécènes (Sous-traitance année 1 et 2)* : les grains issus du battage précédent seront analysés pour quantifier la quantité de DON présente et ainsi caractériser la résistance de type V. Le choix des essais analysés (3 sur les 6 réalisés cf partie 2.5.1) se fera sur la base du degré de contamination des variétés témoins et des lignées parentales, pour lesquelles l'ensemble des essais et des répétitions sera analysé. Si les niveaux de contamination sont suffisants et cohérents avec un attendu basé sur la connaissance de ce matériel, la série génotypique de l'essai correspondant sera analysée (par test Elisa). L'opérateur sera un sous traiteur du projet et sera choisi sur la base de devis. En raison du coût de ces analyses, les 2 répétitions seront mélangées avant envoi sauf pour 50 numéros pris au hasard afin d'obtenir une répétabilité intra site. Cette analyse sera sous traitée au cours des années 1 et 2 du projet.

*Caractères de domestication & Architecture de la plante (INRA AGAP année 1)*: Si la lignée Dic2 apporte des caractéristiques recherchées de résistance à la fusariose et accumulation de mycotoxines, elle n'en reste pas moins une lignée correspondant à la première forme domestiquée de l'espèce *T. turgidum*. La plante est de haute taille (> 1.40m), possède des grains vêtus de petite taille avec un indice de jaune faible, et son rachis est plus fragile que celui de la forme cultivée *T. durum*. Ces caractéristiques sont défavorables pour la sélection. De plus, certains traits, comme le caractère vêtu des grains, peuvent interférer avec l'expression de la résistance aux maladies de l'épi. Afin de tester les possibles interactions entre ces caractéristiques et la résistance active, il est nécessaire de décrire les caractéristiques de chaque lignée pour ces critères. Compte tenu de leur héritabilité très forte (IPBGR, 1996), une expérimentation unique sera mise en place (année1) en condition non inoculée (INRA AGAP Montpellier). Les observations seront basées sur 10 épis par lignée. Un prélèvement d'épi immatures permettra sera également envoyé à l'INRA MycSA pour analyse Flavones.

#### 2.5.2 Bases biochimiques de la toxino-génèse (INRA MycSA années 1 et 2).

Les grains immatures (5 j après floraison) des 200 descendants du croisement Dic2 par Silur seront analysés (prélèvement des épis sur les pépinières non inoculées réalisées par Eurodur années 1 et 2 et INRA AGAP année 1) pour leur composition en composés phénoliques libres. Un accent particulier sera mis sur la composition en flavones et, en particulier, vitexin, orientin et isoscoparin. Cette analyse sera conduite en année 1 et répétée en année 2. Après réception des grains, ces derniers seront broyés et lyophilisés. Une extraction méthanolique permettra d'isoler les composés phénoliques solubles qui seront ensuite analysés par HPLC/DAD et HPLC/MS<sup>n</sup> pour confirmer les structures des molécules quantifiées. Les concentrations en flavones seront ensuite comparées aux teneurs en DON.

#### 2.5.3 Aide à la sélection : Génotypage à l'aide de marqueurs utilisables en sélection (INRA AGAP année 2).

La cartographie de la population est basée à ce jour principalement sur des marqueurs de type DArT (795 marqueurs sur un total de 819). Ce choix, fondé sur des aspects économiques, ne permet pas aux sélectionneurs de disposer de marqueurs directement utilisables dans leur programme. L'objet de cette action est de redévelopper une cartographie à l'aide de marqueurs pouvant être intégrés dans les programmes de sélection afin de faciliter l'identification des plantes recherchées au cours des différentes générations de croisements et, à terme, de ne mettre en expérimentation que celles ayant la garniture allélique la plus favorable. Pour cela, nous redévelopperons une carte sur la base d'informations issues de l'utilisation de puces SNP publiques soit sur la base de technique de type RNAseq (cf partie 2.3.2)<sup>2</sup>. Les critères retenus pour choisir entre les 2 stratégies seront les suivants : disponibilité des technologies à la fin de l'année du projet, condition d'accès (droit d'entrée éventuel pour rentrer dans le consortium), nombre de marqueurs annoncés -facteur a priori non limitant pour une telle population-, efficacité de la technologie (portabilité vers le blé dur, assignation aux 2 génomes, stabilité des résultats, coût, accessibilité, profondeur pour la technique GBS (nombre de copies du génome), adéquation avec la diversité traitée. Le génotypage sera sous-traité avec le laboratoire maîtrisant le mieux la technologie retenue (a priori MGX Montpellier pour les techniques GBS ou un laboratoire public -INRA Clermont Fd si possible- pour les puces SNP).

---

<sup>2</sup> Le fait de densifier en marqueurs microsatellites les régions QTL identifiées à l'aide de la cartographie disponible n'a pas été retenu car ces marqueurs ne seront plus utilisés à court terme dans les programmes de sélection mis en place par les obtenteurs.

#### 2.5.4 Bases génétiques des traits mesurés : détection de QTL (INRA AGAP, année 3)

Les stratégies multi caractères et multiQTL permettent de prendre en compte plusieurs QTL à différentes positions sur le génome dans une même analyse (Gilbert et LeRoy, 2003) ou plusieurs caractères dans une même analyse. L'intégration aux analyses de corrélations résiduelles et dues au(x) QTL entre les caractères (Korol et al., 1995) constitue ainsi un surcroît d'information quant aux modalités de transmission des performances. Potentiellement, elles permettent d'être plus efficace dans la détection de QTL dans le cas de QTL à effet pléiotropies ou de corrélation entre les caractères pris en compte. Ces méthodes dites multiQTL et multicaractères ont été implémentées dans des logiciels comme par ex multiQTL (Korol, 2009) qui sera utilisé dans ce projet (année 3 Inra AGAP). Les haplotypes aux QTL des lignées *T carthlicum* expérimentées seront comparées avec ceux des génotypes résistants afin de savoir si ce matériel pourrait constituer une autre source originale de résistance. Nous proposons une procédure d'analyse des interactions QTL\*environnement basée sur l'approche suivante. La période correspondant à la phase floraison - maturité physiologique du grain sera divisée en x séquences de durée équivalente ( $1 < x < 5$ ). Pour chacune de ces phases, recalées pour chaque génotype, nous collecterons les sommes de température et les taux d'hygrométrie correspondant. Nous utiliserons ces données pour explorer les interactions QTL\*covariables environnementales au cours de ces x phases temporelles. La détection d'un QTL interactif sera reliée à la réalisation de conditions environnementales particulières. L'attendu de cette analyse serait de pouvoir traduire ces QTL interactifs en terme de réponse adaptative à un scénario climatique particulier.

### 3. PARTENARIATS

#### 3.1 Partenaires du projet

Partenaire 1 : **GIE BLE DUR**

Adresse : 7 rue Coq-Héron – 75030 PARIS CEDEX 01

TEL : 01 44 76 88 20 / 01 42 36 57 34

FAX : 01 42 36 57 34

Mail : [philippe.lonnet@florimond-desprez.fr](mailto:philippe.lonnet@florimond-desprez.fr)

Correspondant : M. Philippe Lonnet

Partenaire 3 : **UR1264 Mycologie et Sécurité des Aliments (MycSA) – QUALIS**

Adresse : INRA, Centre Bordeaux - Aquitaine

B.P. 81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex

TEL : +33 (0)5 57 12 24 97

FAX : +33 (0)5 57 12 25 00

Mail : [Florence.Forget@bordeaux.inra.fr](mailto:Florence.Forget@bordeaux.inra.fr)

Correspondant : Mme Florence Forget

Partenaire 2 : **ARVALIS – Institut du végétal**

Adresse : 3, rue Joseph et Marie Hackin, 75116 PARIS

TEL : 01-64-99-22-00

FAX : 01-64-99-30-39

Mail : [s.vallade@arvalisinstitutduvegetal.fr](mailto:s.vallade@arvalisinstitutduvegetal.fr)

Correspondant : Mme Sophie Vallade

Partenaire 4 : **UMR AGAP Equipe DAVEM**

Adresse : 2 pl. Viala, Bat 33, 34060 Montpellier Cedex 2

TEL : 04 99 61 24 27

FAX : 04 99 61 20 64

Mail : [Pierre.Roumet@supagro.inra.fr](mailto:Pierre.Roumet@supagro.inra.fr)

Correspondant : M. Pierre Roumet

#### 3.2 Partenaires associés au comité de pilotage du projet

**Comité Français de la Semoulerie Industrielle et Syndicat des industriels Fabricants de Pâtes Alimentaires de France (CFSI & SIFPAF)**

15, place de la Nation - 75011 PARIS

TEL : 33 (0)1 45 63 72 40 –

FAX : 33 (0)1 45 63 43 35

MAIL : [cfsi@cfsi-sifpaf.org](mailto:cfsi@cfsi-sifpaf.org) [sifpaf@cfsi-sifpaf.org](mailto:sifpaf@cfsi-sifpaf.org)

#### 3.3. Titres des contrats en cours

**GIE Blé Dur** : CTPS – MAAPRAT 2011-2013 : Caractérisation de génotypes de blé dur maintenant une haute qualité technologique sous fertilisation réduite

**INRA UMR AGAP** : Fondation Agropolis : Projet ARCAD (2010-2013) (Agropolis Resource Center for Crop Conservation, Adaptation and Diversity)

ANR Génomique & Biotechnologie Végétale (Phenoblé, 2010-2013 « Analyse des déterminismes génétiques impliqués dans l'efficacité d'utilisation des engrais azotés chez le blé tendre : Mise au point et valorisation d'outils de phénotypage nouvelle génération »).

FP7 Projet CE : European Plant Phenotyping Network (EPPN) : 2012-2015

**ARVALIS :FSOV MYCOTEK** « Constitution d'une mycothèque des champignons pathogènes du blé tendre et mise au point d'outils permettant la caractérisation et la quantification de ces espèces ». ARVALIS - UFS – INRA Bioger – INRA MycSA – INRA GDEC – Biogemma – GEVES, 2010-2013.

**CTPS-MAAPRAT** « Renforcer les résistances du triticale à l'Oïdium et à la Fusariose par l'intégration de leviers génétiques et agronomiques ». INRA GDEC – ARVALIS – GIE Triticale, 2011-2014.

**Casdar RFI EcoFusa** « Lutte contre les fusarioses des épis de blés : de l'utilisation raisonnée des fongicides aux méthodes de luttés alternatives ». ARVALIS – INRA Bioger – INRA MycSA, 2011-2014.

**Casdar RFI DYNASPORE** « Mise au point et faisabilité de méthodes de surveillance épidémiologique des pathogènes aériens des principales espèces de grandes cultures ». CETIOM – ARVALIS – INRA Bioger, 2011-2014.

**INRA UR MycSA** : ANR CES DON&Co, Mycotoxinogénèse chez le blé : de la diversité de la microflore fusarienne à la Toxicologie.2011-2014

**CASDAR EcoFUSa**, Lutte contre les fusarioses des épis de blés : de l'utilisation raisonnée des fongicides aux méthodes de luttés alternatives. 2010-2013

**FP7 Projet CE : PURE**. Pesticide Use-and-risk Reduction in European farming systems with Integrated Pest Management 2010-2014

#### 4. PROGRAMME DE TRAVAIL ET ORGANISATION

##### 4.1. Equipes techniques mobilisées / contribution

**Partenaire1** : Gie blé dur (Florimond Desprez, Eurodur, Syngenta, R2N)

Phénotypage de la résistance (population Dic2 \* Silur): Plateformes de plein champ sites Gie Blé dur (Louville, Grisolles, Cappelle) et un site Inra (GDEC Clermont Ferrand). Multiplication des semences ; plateforme plein champ GIE Blé dur (Castelnaudary)

**Partenaire 2** : Arvalis

Mise à disposition d'une souche de *F. graminearum* caractérisée ; Production de l'inoculum de *F. graminearum* ; partage des protocoles d'application dans les essais puis de notation des symptômes. Réalisation des analyses de quantification de l'ADN de *F. graminearum*, Analyse des données.

**Partenaire 3** INRA MycSA

Biochimie (plateforme HPLC, INRA Bordeaux) dosage des flavones et analyse de données

**Partenaire 4** INRA AGAP

Traitements post récolte : battage ; Nirs ; analyse d'image (Inra Montpellier) ; Laboratoire de marquage moléculaire (extraction Adn, Pcr, RT-Pcr +sous traitance )

##### Personnel permanent impliqué

	Année 1	Année 2	Année 3
GIE Blé dur	<b>Ingénieurs</b> : 4* 0.3 mois P. Blanc (F-Desprez), F Lacoudre (Eurodur), C André (Syngenta), T Lefevre (R2n) <b>Technicien</b> : 4* 0.5 mois CDD*0.5mois	<b>Ingénieurs</b> : 4* 0.3 mois P. Blanc (F-Desprez), F Lacoudre (Eurodur), C André (Syngenta), T Lefevre (R2n) <b>Technicien</b> : 4* 0.5 mois CDD*0.5mois	<b>Ingénieurs</b> : 4* 0.2 mois P. Blanc (F-Desprez), F Lacoudre (Eurodur), C André (Syngenta), T Lefevre (R2n)
Arvalis	<b>Ingénieurs</b> : S. Vallade (1j) J. Toussaint-Ferreyrolle (6j) JB. Pierre (1j) <b>Technicien</b> : 1 mois	<b>Ingénieurs</b> : S. Vallade (1j) J. Toussaint-Ferreyrolle (3j)JB. Pierre (1j) <b>Technicien</b> : 1 mois	<b>Ingénieurs</b> : S. Vallade (1j) J. Toussaint-Ferreyrolle (1j) JB. Pierre (1j)
INRA MycSA	<b>Scientifiques</b> : 2 mois F Forget, V Atanossova <b>Technicien</b> : M.N. Verdal 1 mois + CDD à recruter dans le projet 5 mois	<b>Scientifiques</b> : 2 mois F Forget L Pinson V Atanossova <b>Technicien</b> : M.N. Verdal 1 mois + CDD à recruter dans le projet 5 mois	<b>Scientifiques</b> : 1 mois F Forget L Pinson V Atanossova <b>Technicien</b> : 0
INRA AGAP	<b>Scientifiques</b> : 2 mois P Roumet S Santoni J David M Ecarnot V Ranwez <b>Technicien</b> : G Poux F Compan 1 mois	<b>Scientifiques</b> : 2 mois P Roumet S Santoni J David M Ecarnot V Ranwez <b>Technicien</b> : G Poux F Compan 1 mois	<b>Scientifiques</b> : 4 mois P Roumet S Santoni J David M Ecarnot V Ranwez <b>Technicien</b> : 0

##### 4.2 Compétences des partenaires

**Partenaire 1** : GIE Blé dur : Expérimentations, connaissance de la plante, sélection, génétique

**Partenaire 2 :** ARVALIS Institut du Végétal (S. Vallade, J. Toussaint-Ferreyrolle, JB. Pierre): Expérimentations, Maitrise de la production, de la conservation et de l'application d'inocula de différents champignons pathogènes des grandes cultures, Expérience forte en notation de symptômes des maladies des céréales à paille (particulièrement de la fusariose) dans des essais en champ, Détection / quantification moléculaires de champignons pathogènes, Connaissance de la biologie et de l'épidémiologie des *Fusarium* spp.

**Partenaire 3 :** Inra MycSA Bordeaux (resp.F Forget); Analyse de la régulation de la production de mycotoxines par *Fusarium spp.*, identification de composés biochimiques endogènes des grains inhibiteurs des voies de toxogénèse, analyse des métabolites secondaires (phénols, caroténoïdes).

**Partenaire 4 :** Inra AGAP Montpellier (resp. P Roumet); génétique quantitative, analyse de l'interaction génotype milieu, diversité génétique du blé dur. Bioinformatique

**Sous-traitance:** Les analyses DON seront sous traitées auprès d'un laboratoire externe. Ce choix a été fait en raison du *i)* savoir-faire de laboratoires nationaux qui rend non contestable la qualité des mesures effectuées *ii)* des délais qu'ils proposent pour de tels volumes d'échantillons non broyés. Certains de ces laboratoires ont l'habitude de réaliser ces analyses pour certains partenaires du projet (obtenteurs, Arvalis, Inra). Le prestataire sera choisi par appel d'offre.

Le génotypage sera également sous traité. Les technologies pressenties (puces SNP et GBS-RNaseq) requièrent un savoir-faire et une infra structure qui ne sont pas disponibles dans les laboratoires publics partenaires. La sous traitance est donc obligatoire. De plus elle garantit le maximum de fiabilité et des débits hors de portée de nos laboratoires. Dans le cas du choix de la technologie GBS-RNaseq, l'atelier de marquage du partenaire INRA Agap interviendra dans les étapes de préparation de l'ADN et le « tagging » des individus, tâche qu'il maîtrise parfaitement. Ce type de sous-traitance est déjà mise en œuvre dans d'autres projets et n'a posé à ce jour aucun problème.

#### 4.3 Organisation / implication des partenaires / Calendrier

Tâches	Année1	Année 2	Année 3	Coordinateur / Partenaire impliqué
2.5.0 : <u>Multiplication &amp; Production de semences</u> Pop dic2*silur+ parents+ témoins 1 site	←————→			<b>GIE / (Eurodur)</b>
2.5.1 : <u>Phénotypage de la descendance Dic2 * Silur :</u> Résistance fusariose 3 sites /an	←————→			<b>GIE / (F.Desprez, R2N, Syngenta, Inra GDEC)</b>
Inoculum & Quantification de l'ADN de <i>F. graminearum</i>	←————→			Arvalis
Post récolte (battage, Morphométrie & Qualité des grains (Nirs)	←————→			Inra AGAP
Contamination (Teneur en DON 3 Sites)	←————→			Sous traitance
Caract. Domestication et architecture plante 1 site	←————→			Inra AGAP
2.5.2 <u>Bases Biochimiques de la toxogénèse</u> (3 sites/an)	←————→			<b>Inra MYCSA/Inra MYCSA</b>
2.5.3 <u>Aide à la sélection :</u> Génotypage	←————→			<b>Inra AGAP + sous traitant</b>
2.5.4 <u>Détection de QTL</u> Résistance à la fusariose, toxogénèse, traits de domestication, qualité des grains	←————→			<b>Inra AGAP/ Inra AGAP</b>

#### 4.4. Nature, composition et modalités de fonctionnement de(s) l'instance(s) de pilotage

L'instance de pilotage se réunira 3 fois par an pendant la durée du projet. Elle réunira le président du GIE blé dur, le secrétaire et le président du comité scientifique, les membres du GIE Blé dur (représentants des 4 établissements membres Eurodur, Syngenta, Florimond Desprez R2N), les représentants de l'industrie (SIFPAF CFSI), les représentants d'Arvalis, les responsables des laboratoires INRA impliqués dans le

programme. Cette instance se réserve la possibilité d'inviter d'autres personnes, qui du fait de leur compétences seraient susceptibles d'apporter un éclairage lors de choix stratégique tel que le choix de la technologie de génotypage.

## 5. COMPTE PREVISIONNEL DE REALISATION DU PROJET

Cf document annexé.

## 6. RESULTATS ATTENDUS ET SUITES DU PROJET

### 6.1 Indicateurs de suivi

Le suivi du projet se fera au cours de 3 réunions annuelles « physiques » réunissant l'ensemble des partenaires impliqués dans ce projet ainsi que le comité de pilotage. L'une se tiendra en début de campagne (Septembre). Elle sera destinée à faire le bilan de la campagne écoulée (degré de réalisation des tâches prévues (expérimentations champ et travaux de laboratoire) et à la planification les expérimentations de la campagne (listes, implantations, protocoles, gestion des semences). La seconde (décembre) permettra de faire le point sur la qualité des implantations et de réajuster tant qu'il est encore possible les dispositifs en fonction des éventuelles difficultés rencontrées notamment sur le plan météorologique ou de levée des essais. La dernière en mai sera une réunion de coordination pour les notations et les envois des échantillons pour le traitement post récolte.

### 6.2 Indicateurs d'évaluation

Tache	Nature de l'opération	Indicateur d'évaluation	Périodicité / Date
2.5.0	Multiplication	Taux de couverture des besoins en semences	Annuelle/ Septembre années 1 et 2
2.5.1	Expérimentation champ Quantification de l'ADN de <i>F. graminearum</i> Opérations post récolte (Battage, Nirs, morphométrie) Teneur en DON	Qualité des essais	Annuelle/ Aout années 1 et 2
		Qualité / reproductibilité	Annuelle/ Octobre années 1 et 2
		Qualité / reproductibilité	Annuelle/ Janvier années 2 et 3
2.5.2	Analyse des Flavones	Qualité / répétabilité	Annuelle / mars années 2 et 3
2.5.3	Génotypage	Qualité de la carte génétique	Annuelle Décembre année 2
2.5.4	Détection QTL	Qualité des résultats (Intervalle de confiance ; degré d'explication de la variance des caractères)	Annuelle / Septembre année 3

### 6.3. Résultats attendus

1. Caractérisation de la variabilité génétique pour la résistance à la fusariose.
2. Evaluation de la variabilité des Rils pour les autres caractères : domestication, architecture, qualité du grain
3. Relation entre résistance à la fusariose et les autres caractéristiques de la plante architecture, caractères de domestication).
4. Validation de l'implication des flavones dans la toxigénèse
5. Carte génétique basée sur du polymorphisme de séquence
6. Détection de QTL de résistance et QTL liés à des taux de contamination réduits
7. Interprétation des interactions QTL \* covariable environnementale : implication pour le développement de résistances spécifiques à certaines conditions environnementales
8. Haplotypes des plantes résistantes aux QTL de résistance et de faible taux de contamination
9. Proposition de schéma de sélection assistée par marqueur
10. Développement de variétés résistantes (échéances avant 1ers dépôt CTPS 5-6 ans)

### 6.4. Valorisation et communication prévues (sur le projet, sur les résultats) :

### Publications Scientifiques (rang A)

1. Etude génétique de la résistance à la fusariose : détection de QTL associés à la résistance aux attaques fongiques et à l'inhibition de la production des toxines
2. Rôle inhibiteur des flavones dans la toxinogénèse

### Communications

1. Restitution à un colloque national
2. Communication colloques internationaux

### Pratique de la sélection

1. Essais fusariose : Disponibilité d'un mode opératoire validé
2. Utilisation des sources de résistance par la sélection : Mise en œuvre de backcross pour introgresser cette source de résistance au pool cultivé

### **6.5. Suites attendues du projet :**

1. Stratégies de « Fine mapping » (QTL résistance) & Approche gènes candidats (toxinogénèse) (ces aspects seront dépendants des résultats obtenus) en utilisant des populations intégrant plus de recombinaison génétique
2. Confrontation des résultats obtenus sur les déterminants génétiques de la résistance avec ceux obtenus avec les autres équipes internationales ; synthèse
3. Mise en place d'aide à la sélection pour réaliser des back cross ou des Advanced back cross
4. Recherche de résistance via le crible de lignées sur la base de leur haplotype aux QTL de résistances
5. Si 'utilisation de la technique GBS (RNA seq) =Réalisation d'une puce thématique 'fusariose'.
6. Création de variétés résistantes

### **7. RESUME DESTINE A UNE EVENTUELLE PUBLICATION**

L'utilisation exclusive du blé dur en alimentation humaine nécessite de proposer à l'industrie des lots de grains répondant à un cahier des charges strict tant sur le plan de leurs caractéristiques physiques et biochimiques ainsi que sur le plan sanitaire. Dans ce contexte, les *Fusarium sp.* et notamment *Fusarium graminearum* qui altère productivité, qualité des récoltes et génère des risques sanitaires, sont à considérer avec attention. Compte tenu des questions posées par l'utilisation de fongicides (efficacité partielle, mais aussi des contraintes actuelles portant sur ce moyen de lutte (plan EcoPhyto 2018), le développement de variétés de blé dur résistantes à la fusariose est un enjeu majeur pour la création variétale. Une source de résistance au champignon et au développement des mycotoxines a été identifiée, au sein d'une forme ancestrale du blé dur et une population d'étude (Rils) a été créée. L'objet de ce projet est i) d'identifier les bases génétiques (QTL) de cette résistance, ii) de préciser le rôle inhibiteur de certains composés de type flavones dans le développement des mycotoxines (TCTb) et iii) de proposer une aide à la sélection sous forme de marqueurs liés à cette résistance afin de faciliter son transfert aux variétés cultivées.

Ce projet est une collaboration entre l'ensemble des acteurs de la filière blé dur française. Il réunit la totalité des obtenteurs réunis au sein du Gie blé dur, les laboratoires Arvalis et Inra dont les compétences en matière d'interaction « plante champignon » et de génétique permettront de réaliser les travaux proposés. Les représentants des syndicats de l'industrie pastière et semoulière (CFSI et SIFPAF) participeront au comité de pilotage de ce projet.

### **8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES (HORS REFERENCES DES EQUIPES IMPLIQUEES)**

- Akhunov E., Nicolet C., Dvorak J. 2009. A single nucleotide polymorphism genotyping in polyploid wheat with the Illumina GoldenGate assay. *Theor. Appl. Genet.* 119 : 507-517
- Buerstmayr H., Steiner B., Lemmens M., Ruckenbauer P. (2000). Resistance to *Fusarium* head blight in winter wheat : heritability and trait associations. *Crop science* 40: 1012-1018.
- Buerstmayr H., Stierschneider M., Steiner B., Lemmens M., Griesser M., Nevo E., Fahima T. (2003). Variation for resistance to head blight caused by *Fusarium graminearum* in wild emmer (*Triticum dicoccoides*) originating from Israel. *Euphytica* 130: 17-23.
- Buerstmayr H.; Ban T.; Anderson J. A. 2009. QTL mapping and marker-assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat: a review . *Plant breeding* Vol. 128: 1-26

Fakhfakh M M , Yahyaoui A, Rezugui M, Elias E M, Daaloul EM 2011 Inheritances of Fusarium Head Blight Resistance in a Cross Involving Local and Exotic Durum Wheat Cultivars. *Crop Sci. Vol. 51: 2517-2524*

Garvin D. F. Stack R W., Hansen J M 2009. Quantitative Trait Locus Mapping of Increased Fusarium Head Blight Susceptibility Associated with a Wild Emmer Wheat Chromosome . *Phytopathology*, Vol 99 : 447-452

Gilbert, J. 1998. Comparison of inoculation methods for screening tetraploid wheat lines for reaction to Fusarium head blight. p. 71–72. *In P. Hart et al. (ed.) Proc. 1998 National FHB Forum*. University Printing, East Lansing, MI

Gilbert H., Le Roy P., 2003. Comparison of three multitrait methods. *Genet. Sel. Evol.*, 35, 281-304.

Huhn M R., Elias Elias M. Ghavami F et al. 2012. Tetraploid Tunisian Wheat Germplasm as a New Source of Fusarium Head Blight Resistance. *Crop Sci. Vol 52 : 136-145*

IPGRI. 1996. Hulled Wheat , Padulosi S., Hammer K., Heller J ed. 258 p.

Kolb FL; Bai GH; Muehlbauer GJ; et al.. 2001. Host plant resistance genes for fusarium head blight: Mapping and manipulation with molecular markers. *Crop Sci. Vol. 41 : 611-619*

Korol AB; Ronin YI; Kirzhner VM., 1995. Interval mapping of quantitative trait loci employing correlated trait complexes. *Genetics Vol. 140 : 1137-1147*

Korol A. 2009. Methods for Genetic Analysis in the Triticeae. *In Genetics and Genomics of the triticeae*. p 163-199. C Feuillet & GJ Muehlbauer eds. Springer

Kumar, S., Stack R. W., Friesen, T. L., Faris, J. D. (2007. Identification of a novel fusarium head blight resistance quantitative trait locus on chromosome 7A in tetraploid wheat. *Phytopathology* 97: 592-597.

Liu, S., Z.A. Abate, and A.L. McKendry. 2005. Inheritance of Fusarium head blight resistance in the soft red winter wheat Ernie. *Theor. Appl. Genet.* 110:454–461.

Liu S., Hall M. D., Griffey C. A. et al., 2009. Meta-Analysis of QTL Associated with Fusarium Head Blight Resistance in Wheat. *Crop Sci.*, Vol. 49 : 1955-1968

Loeffler M., Schoen C.-C., Miedaner T. et al. 2009. Revealing the genetic architecture of FHB resistance in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) by QTL meta-analysis. *Molecular Breeding*. Vol.23 : 473-488

Mesterhazy A. (1995). Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat. *Plant breeding* 114(5): 377-386

Oliver, R. E., Stack R. W., Miller, J. D., Cai, X. (2007). Reaction of wild emmer wheat accessions to *Fusarium* head blight. *Crop Science* 47: 893-899.

Schmolke M., Zimmermann G., Buerstmayr H., et al. 2005. Molecular mapping of Fusarium head blight resistance in the winter wheat population Dream/Lynx. *Theor. Appl. Genet.* 111: 747-756

Schroeder H.W., Christensen J.J. (1963). Factors affecting resistance to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 53: 831-838

Somers, D.L., Fedak G., J. Clarke J., Cao W. 2006. Mapping of FHB resistant in tetraploid wheat. *Genome* 49:1586–1593.

Schneeberger K., Weigel D., 2011. Fast-forward genetics enabled by new sequencing technologies. *Trends in Plant Science* May 2011, Vol. 16, No. 5

Talas F., Longin F., Miedaner T. 2011. Sources of resistance to Fusarium head blight within Syrian durum wheat landraces *Plant Breeding* 130, 398–400.

Yoshida M., Nakajima T., 2010. Deoxynivalenol and nivalenol accumulation in wheat infected with *Fusarium graminearum* during grain development. *Phytopathology*, 100(8): 763-773.