Introduction de gènes de résistance à la rouille couronnée dans la sélection française d'avoine (*Avena sativa L.*)

Forgeois P.[1], Picot M.[1], Bertin A.[4], Delhaye J.M.[2], Louchart A.[3], Herbommez F.[3], Poncet C.[4], Sourdille P.[4]

[1] Institut de Genech, rue de la libération, F-59242 Genech

[2] Lemaire-Deffontaines, 180 rue rossignol, F-59310 Auchy-Les-Orchies

[3] SARL Adrien Momont, 7 rue Martinval, F-59246 Mons en Pevele

[4] INRAE, UMR GDEC, 5 Chemin de Beaulieu, F-63000 Clermont-Ferrand

Correspondance : p.forgeois@institutdegenech.fr

Résumé

Ce programme porte sur la caractérisation de variétés d'avoine (*Avena sativa* L.) provenant de diverses origines et notamment de la collection INRAE de Clermont-Ferrand mais également de variétés provenant des principaux pays producteurs. Ces différentes variétés collectées, ainsi que certains de leurs croisements (F6), ont été caractérisés aux champs pour leur tolérance à la rouille par les partenaires privés. Parallèlement, ces lignées ont été évaluées au laboratoire pour leur composition allélique au niveau des principaux gènes de résistance connus et marqués. Une carte génétique consensus a été établie, elle comporte 178 marqueurs SNP répartis en 26 groupes de liaison. Au final, une étude d'association entre phénotypes résistants ou sensibles et diversité allélique aux gènes a permis d'identifier des marqueurs pertinents utilisables en sélection assistée. Dans le même temps, un ensemble d'expérimentations a été mené pour mettre au point une méthode de production de plantes haploïdes doublées (HD). La technique la plus prometteuse est la culture d'anthères.

Mots-clés : *Avena sativa,* Rouille couronnée*,* Haploïde Doublé (HD), SNP (Single Nucleotide Polymorphims), SSD (Single Seed Descent)

Abstract: Introduction of resistance genes to crown rust in the French breeding programs of oat (*Avena sativa* L.)

This program aimed at characterizing oat varieties (*Avena sativa* L.) originating from INRAE Clermont-Ferrand collection as well as from main oat-producing countries. These varieties and some of their progenies (F6) were evaluated for their crown rust tolerance. Simultaneously, these lines were molecularly assessed for their allelic composition for known resistance genes. A consensus map of 178 SNP markers covering 26 linkage groups was established. An association study between rust-resistance phenotype and molecular markers will be conducted which should result in the identification of linkage between some SNPs and resistance loci. The most relevant markers will further be used in marker-assisted selection programs. Moreover, several experimentations were conducted to develop a protocol for doubled-haploid (DH) line production. The most promising technique was the one involving anther culture.

Keywords: *Avena sativa*, Crown rust, Doubled Haploid, SNP (Single Nucleotide Polymorphism), SSD (Single Seed Descent)

1. Historique, contexte et objectifs du programme

L'avoine cultivée (*Avena sativa* L.) est une espèce annuelle de la famille des Poacées (graminées) appartenant au genre *Avena*, et cultivée comme céréale ou comme fourrage. Elle fait partie des céréales à paille et est utilisée principalement dans l'alimentation animale (notamment des équidés).

La production d'avoine en France diminue depuis 50 ans, pour atteindre aujourd'hui 85 000 hectares cultivés pour une production de 345 000 tonnes (chiffres 2019/2020). A titre de comparaison, la production de blé tendre a atteint 29,7 millions de tonnes en 2020 pour une surface de 4,9 millions d'hectares. L'avoine représente 1% des céréales cultivées en France, ce qui en fait une céréale secondaire.

La principale maladie qui attaque l'avoine est la rouille couronnée. Elle peut engendrer une perte de rendement de 10 à 20%. Cette maladie est provoquée par un champignon, *Puccinia coronata*, qui n'affecte que l'avoine.

Le plan « Ecophyto 2020 » prévoit que les traitements phytosanitaires devront considérablement diminuer. C'est pourquoi de nombreux semenciers recherchent actuellement à développer rapidement des variétés d'avoine résistantes à la rouille couronnée conciliant économie d'intrants et environnement, afin de limiter les interventions phytosanitaires sur les parcelles.

Le projet s'est donc articulé sur trois objectifs de 2012 à 2014 :

- Mise au point d'une méthode de production de plantes HD (Haploïde Doublé) ;
- Caractérisation aux champs des populations F6 des plantes issues de croisements entre variétés sensibles et résistantes ;
- Caractérisation moléculaire des gènes de tolérance ou de résistance à la Rouille sur population ; analyse d'association et cartographie de gènes pour une co-localisation avec des régions impliquées dans la résistance.

2. Mise au point de la méthode Haploïde Doublé (HD)

Disposer d'une méthode de production de plantes HD sur l'avoine permettrait l'inscription rapide de nouvelles variétés résistantes à la rouille. Cependant, l'avoine est considérée comme une céréale récalcitrante à cette méthode. Un ensemble d'expérimentations a été mené au laboratoire de l'Institut de Genech pour mettre au point une méthode de production de plantes HD et ainsi permettre de mettre à disposition une méthode rapide de production de lignées pures.

Deux grandes techniques sont utilisées : la première est la culture d'anthères (De Cesaro et al., 2009 ; Kiviharju et al., 2009 ; Ponitka et Slusarkiewicz-Jarzina, 2009) et la deuxième le croisement interspécifique (Sidhu et al., 2006 ; Rines et Daheen, 1990).

Les croisements interspécifiques entre l'avoine et le maïs n'ont pas donné de résultats concluants. Pour la culture d'anthères, les panicules sont récoltées lorsque les microspores sont au stade uni-nucléé tardif (Dunwell 1985). Ce stade cellulaire est difficile à appréhender, il correspond à un stade phénologique qui est la distance séparant l'avant dernière feuille de la dernière, celle-ci est en générale comprise entre 5 et 10 cm (Rines, 1982). Après la récolte, les épis subissent un pré-traitement au froid à 4°C (Kiviharju et Pehu, 1998). Leurs travaux démontrent que la période optimale à 4°C est de 7 jours. Lors de nos expérimentations, la durée était de 7, 15 ou 20 jours (Figure 1), le nombre d'anthères embryogènes (AE) est respectivement de 2.03, 1.55, et 4.68%. D'après les analyses statistiques la durée du pré-traitement optimale est de 20 jours.

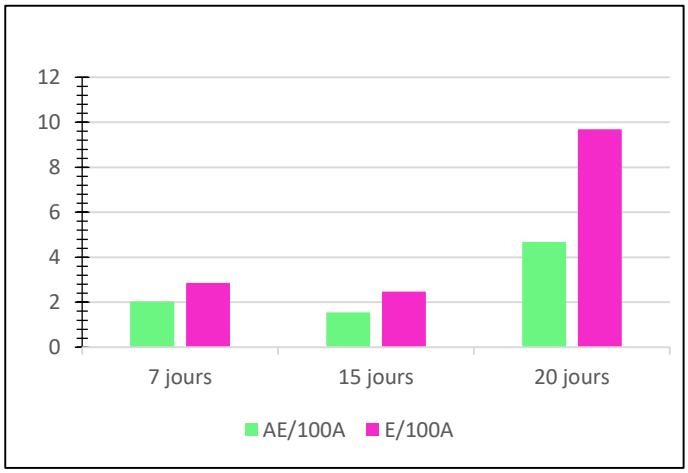


Figure 1 : Nombre d'anthères embryogènes (AE) et d'embryon (E) pour 100 anthères (100A) en fonction du nombre de jours de pré-traitement au froid.

Après le pré-traitement, les panicules sont placées sur un milieu d'induction, en boîte de 55 mm, puis mises à l'étuve à 32°C pendant 5 jours puis à 25°C.

Suite aux travaux de Ponitka et al. (2009), les milieux d'induction W14 et C17 ont été testés. De plus pour le milieu W14, deux modalités ont été ajoutées, à savoir l'apport d'étéphon et un changement de pH à 8. D'après les résultats ci-dessous (Tableau 1), le milieu W14 pH5.8 sans étéphon est le plus favorable.

Tableau 1 : Pourcentage d'anthères embryogènes en fonction du milieu d'induction

Milieu	Nombre anthères	% anthères embryogènes
W14 pH5.8 étéphon	489	2,25
W14 pH5.8	264	2,65
W14 pH8	291	0,00
C17	285	0,00

Le milieu W14 a également été testé sous forme liquide. Le milieu liquide contient 10% de ficoll 400 et est stérilisé par filtration et le milieu solide contient du phytagel 2.5g/L. Les analyses statistiques montrent que le milieu W14 avec phytagel est significativement différent du milieu liquide (Tableau 2). Les embryons obtenus sont placés sur un milieu W14 de régénération, puis les plantules obtenues sont acclimatées en serre avant traitement à la colchicine.

Tableau 2 : Nombre d'anthères embryogènes (AE), nombre d'embryons (E), et nombre de plantules (P) pour 100 anthères (100A)

Milieu	Nombre anthères	AE/100A	E/100A	P/100A
W14 phytagel	1577	4.09	8.43	3.68
W14 ficoll	1569	1.16	1.21	0.05

Sur les deux premières années du projet, 66 panicules ont été mises en culture pour obtenir seulement 3 plantules. En revanche, en 2014 pour 93 panicules travaillées, 60 plantules ont été régénérées *in vitro*, dont 46 ont survécu au traitement à la colchicine. Ces résultats sont prometteurs, mais les effectifs de plantes insuffisants n'ont pas permis de faire du marquage sur ces plantes HD.

3. Mise en place de populations de plantes issues de croisement sensible x résistant

Un ensemble de croisements entre des variétés sensibles et résistantes ou tolérantes à la rouille couronnée a été réalisé. Le choix s'est porté sur des avoines de printemps pour lesquelles il y a une plus grande collection et plus de variabilité. De plus, ces avoines permettent de réaliser trois générations par an en SSD. Nous avons choisi six variétés considérées comme tolérantes voire résistantes à la rouille couronnée d'après leur notation CTPS (Tenebra, Triple Crown, Major, Caravelle, Melys et Tropicale) et sept bonnes variétés commerciales mais sensibles (Duffy, Zorro, Husky, Corneil, Jag de Bellouet, Persic et Albatros).

A partir des croisements, des populations « nichées » (NAM, Nested Associated Mapping Population) de lignées F5 et F6 de petite taille ont été réalisées par la méthode SSD (Single Seed Descent) en utilisant comme parent récurrent un parent sensible à la rouille couronnée et comme parents donneurs les parents résistants d'origine différente pour maximiser la diversité. Sur tous ces croisements nous n'avons gardé que ceux avec les lignées sensibles Albatros et Husky, car ce sont les seules pour lesquelles les 6 croisements ont été réussis (Tableau 3B). Nous avons donc conduit en SDD 12 croisements dont l'historique est présenté dans le Tableau 3A.

Tableau 3 : Liste des 12 croisements conduits en SSD (B) et leur historique (A)

A

Dates	générations
Janvier 2012	Semis des parents
Mars 2012	Croisements des parents
Septembre 2012	Semis des F1
Février 2013	Semis de la F2
Juin 2013	Semis de la F3
Septembre 2013	Semis de la F4
Février 2014	Semis de la F5 et des parents
Février 2014	Re-semis de la F4
Juin 2014	Récolte des F5b et F6
Septembre 2014	Semis au champ de la F6

B

Codes	Croisements
A1	Albatros x Major
A2	Albatros x Tenebra
A3	Albatros x Triple Crown
A4	Albatros x Tropical
A5	Albatros x Caravelle
A25	Husky x Tropicale
A26	Husky x Caravelle
A27	Husky x Major
A28	Husky x Triple Crown
A29	Husky x Tenebra
A32	Melys x Husky
A33	Albatros x Melys

Parallèlement des inter-croisements entre parents sensibles et tolérants ont été conduits de façon à développer des descendants améliorés pour ce caractère. Au final, une métapopulation d'environ 600 plantes (200/croisement) a été produite pour un phénotypage et le développement d'une carte génétique pour la détection de régions du génome impliquées dans la résistance et la cartographie des marqueurs liés aux gènes connus. Ces plantes ont été caractérisées ultérieurement au champ pour leur comportement vis-à-vis de la rouille par les partenaires privés.

Dans le même temps, le génotypage des lignées parentales a été effectué à l'aide de la technologie KASPar (Kompetitive Allele Specific PCR genotyping system) à partir de 672 marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphims ; Oliver *et al*., 2013 ; Figure 2) sélectionnés en fonction de leur position génétique afin de couvrir l'ensemble du génome.

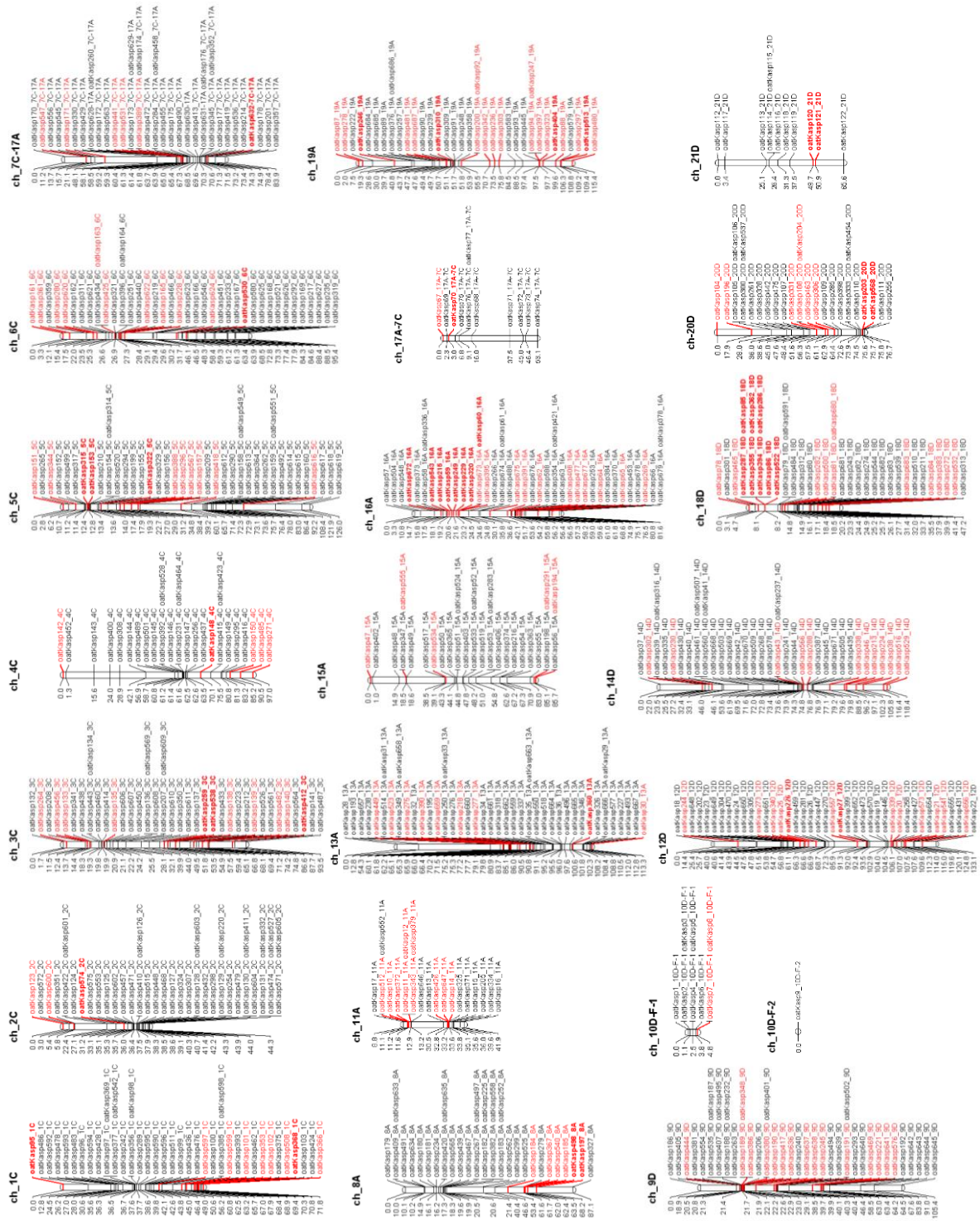


Figure 2 : Représentation schématique de la carte génétique des 672 marqueurs sélectionnés à partir de la carte génétique de référence d'Oliver *et al.* (2013). Les marqueurs colorés en rouge correspondent aux marqueurs ayant démontrés du polymorphisme pour au moins un des trois croisements (A2, A3 et A29). Les marqueurs colorés en rouge et mis en gras correspondent aux marqueurs ayant démontrés du polymorphisme pour les trois croisements (A2, A3 et A29).

Une étude bibliographique a permis de trouver trois SNP liés au gène de résistance *Pc91* (Gnanesh *et al*., 2013). Parmi les 672 SNP, 288 ont montré du polymorphisme pour au moins une des 11 lignées parentales permettant ainsi de déterminer la variabilité entre chaque parent (Tableau 4). Le croisement ayant le taux de polymorphisme le plus élevé est Caravelle x Tropicale avec un taux de 28% suivi par le croisement Triple Crown x Tropicale (27%). Le croisement le moins polymorphe est celui dérivé des lignées Tenebra et Jag de Bellouet (7%) suggérant une origine commune entre les deux variétés. Les critères de sélection des croisements pour l'analyse phénotypique ultérieure étaient (1) une population F5 ayant un minimum de 200 individus, (2) un taux de polymorphisme élevé et (3) un phénotypage polymorphe.

Tableau 4 : Taux de polymorphisme entre les lignées parentales (580 marqueurs testés)

	Albatros	Caravelle	Husky	Jag de Bellouet	Major	Melys	Persik	Tenebra	Triple Crown	Tropicale	Zorro
Albatros		26%	15%	19%	17%	22%	19%	23%	21%	21%	19%
Caravelle			22%	20%	20%	22%	25%	22%	21%	28%	23%
Husky				16%	15%	21%	18%	18%	16%	25%	16%
Jag de Bellouet					16%	20%	14%	7%	18%	20%	15%
Major						15%	15%	18%	14%	23%	13%
Melys							17%	21%	19%	21%	19%
Persik								13%	19%	20%	14%
Tenebra									17%	19%	15%
Triple Crown										27%	14%
Tropicale											24%
Zorro											

Les valeurs inscrites en rouge correspondent à nos croisements sélectionnés (A2, A3 et A29).

Les trois croisements qui réunissaient tous ces critères (Tableau 5) sont : Tenebra × Albatros (A2), Albatros × Tropicale (A3) et Tenebra × Husky (A29).

Tableau 5 : Résultats obtenus pour chaque critère de sélection pour les croisements A2, A3 et A29.

Croisement	Nombre d'individus en F5	Taux de polymorphisme	Phénotype : Note de résistance à la rouille couronnée	
Albatros × Tenebra (A2)	255	23%	Albatros	2
			Tenebra	5
Albatros × Tropicale (A3)	203	21%	Albatros	2
			Tropicale	1,5
Tenebra × Husky (A29)	164	18%	Tenebra	5
			Husky	3

4. Génotypages des descendants A2, A3, et A29

Parmi les 672 marqueurs, 200 ont montré du polymorphisme pour au moins un de nos trois croisements (Figure 3) avec respectivement 127, 114 et 103 marqueurs pour A2, A3 et A29. Les trois marqueurs SNP liés à *Pc91* (Gnanesh *et al*., 2013) ne présentaient pas de polymorphisme entre les 11 lignées parentales. La répartition des marqueurs SNP communs aux trois croisements est schématisée sur un diagramme de Venn (Figure 3).

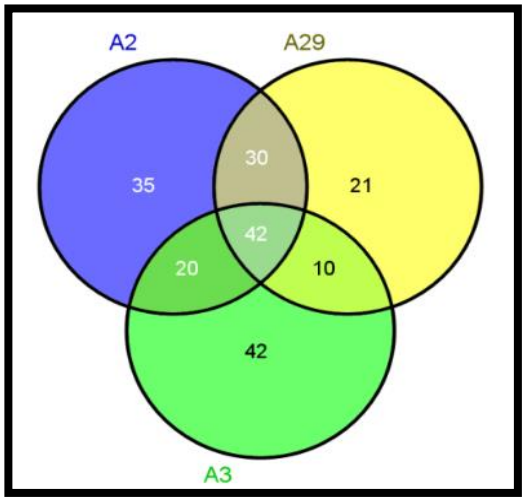


Figure 3 : Diagramme de Venn de la répartition des marqueurs SNP polymorphes sur les croisements A2, A3 et A29.

Des marqueurs communs aux différents croisements sont nécessaires pour la réalisation de la carte génétique consensus. Au total, 42 marqueurs SNP présentent du polymorphisme pour les trois croisements et respectivement 20, 30 et 10 marqueurs sont partagés entre les croisements A2 et A3, A2 et A29, et A3 et A29. Le croisement A3 est celui qui présente le plus de marqueurs spécifiques (42) suivi par les croisements A2 (35) et A29 (21). Les marqueurs polymorphes sont répartis régulièrement sur les chromosomes 3C, 16A, 19A, 9D, 12D, 18D, et 20D alors que les autres chromosomes ne présentent pas d'homogénéité dans leur répartition. Par exemple, le chromosome 1C ne possède pas de marqueurs polymorphes entre les positions 12.8 et 46.4 cM de la carte de référence ce qui indique que les trois variétés sont semblables génétiquement dans cette zone du génome. Les chromosomes 16A et 18D possèdent le plus de marqueurs en commun mais ceux-ci sont concentrés dans les mêmes régions.

5. Cartographie génétique

La cartographie des marqueurs moléculaires est réalisée à l'aide du logiciel MapMaker/EXP 3.0 (Lander *et al*., 1987). Les marqueurs SNP non biaisés ($\chi 2 > 0{,}01$) ont été sélectionnés et une première carte a pu être construite. Les données de génotypage sans les marqueurs biaisés comportaient 110 locus pour la population A2 de 188 individus, 102 locus pour la population A3 de 188 individus et 91 locus pour la population A29 de 158 individus. Ainsi, 21 groupes de liaison ont pu être détectés pour la population A2, 20 groupes de liaison pour la population A3 et 22 groupes de liaison pour la population A29. Respectivement 11, 6 et 4 marqueurs sont restés indépendants aux seuils fixés (LOD 3 et θ 0.35).

Une seconde carte génétique incluant les marqueurs biaisés (Figure 4) a été construite pour chaque population et comportait 112 marqueurs SNP répartis sur 22 groupes de liaisons avec une distance totale de 484.7 cM pour la population A2, 102 marqueurs (22 groupes et 466.9 cM) pour la population A3 et 95 marqueurs (24 groupes et 476.8 cM) pour la population A29.

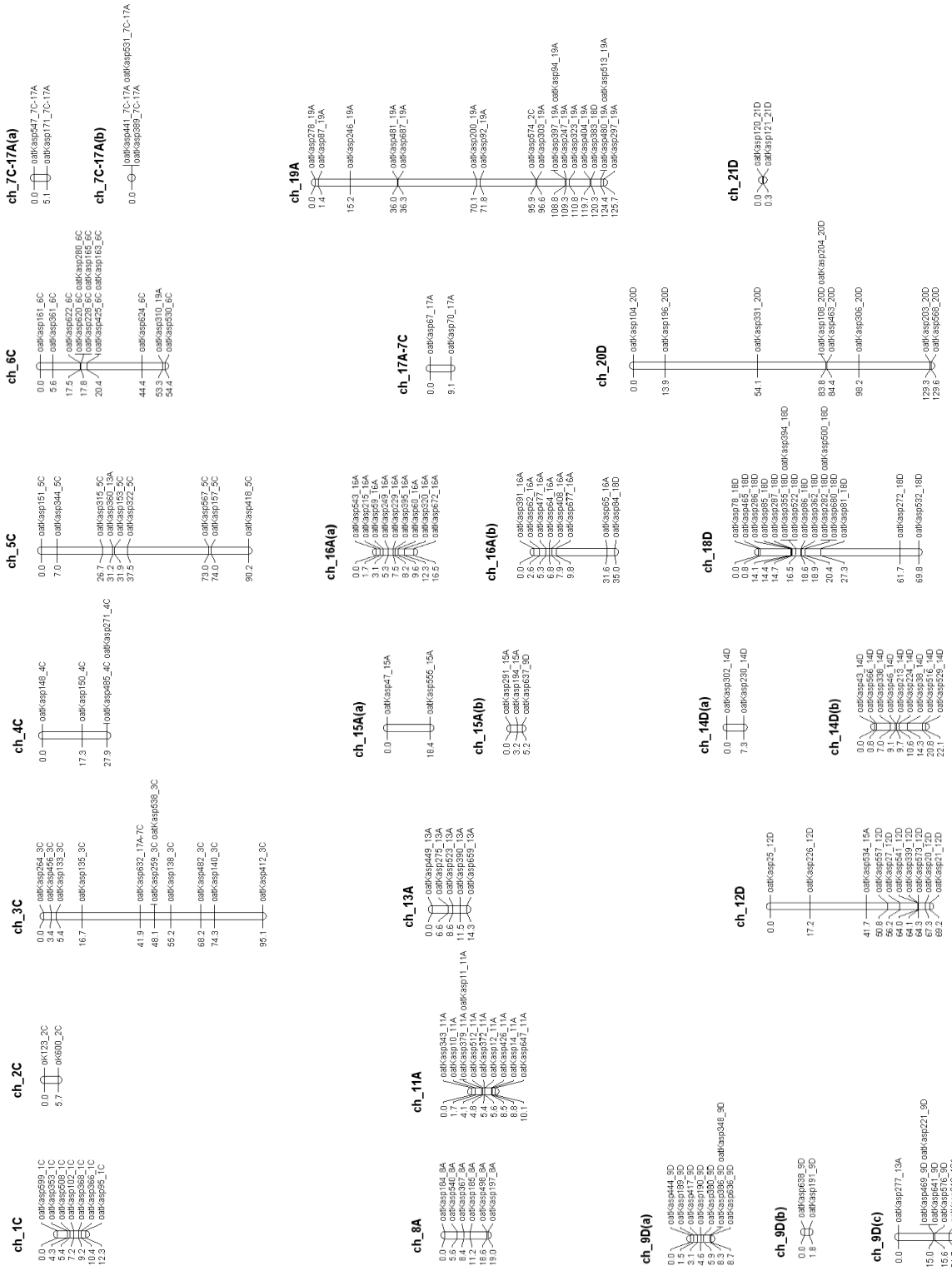


Figure 4 : Représentation schématique de la carte génétique consensus construite à partir des cartes génétiques des populations A2, A3 et A29.

L'analyse comparative des marqueurs avec la carte de référence (Oliver *et al.,* 2013) montre que les locus proches génétiquement sont placés dans un même groupe de liaison et que l'ordre des locus est généralement conservé.

Suite à l'établissement des cartes génétiques de chaque population, une carte consensus comportant 11 chromosomes avec une densité de marqueurs communs suffisante (1C, 3C, 4C, 5C, 6C, 11A, 12D, 13A, 16A, 18D, 20D) a été réalisée grâce au logiciel Biomercator V4.2. Le reste de la carte consensus (Figure 4) a été développé manuellement. Cette carte comporte 178 marqueurs répartis sur 26 groupes de liaisons pour une distance totale de 879.4 cM soit 47.8 % de la carte de référence (Oliver *et al.,* 2013). Le chromosome 9D comporte 3 groupes de liaison puisqu'aucun marqueur SNP n'est commun entre les trois cartes génétiques A2, A3 et A29. De plus, ces 3 groupes de liaisons sont situés sur trois régions différentes selon la carte génétique de référence ce qui explique qu'ils ne sont pas liés. Certains groupes de liaison comme ch_2C, ch_17A-7C, ch_21D et le chromosome 10D-F-1 sont peu couverts ce qui est dû à un faible taux de marqueurs polymorphes sur ces chromosomes. Cependant, cette carte nous donne un premier outil pour effectuer une recherche de QTL.

Le phénotypage réalisé en novembre 2015, montre que pour le croisement A2 (Tableau 6), deux marqueurs sont significativement liés à la résistance ($p<0.01$) et se trouvent sur le groupe de liaison ch_16A. Pour le croisement A3, un seul marqueur est hautement significatif mais il se situe sur le même groupe de liaison que ceux du croisement A2. Quant au croisement A29, trois marqueurs sont significatifs dont un hautement significatif sur le Ch-1C puisqu'à lui seul il explique 10% de la variabilité.

Tableau 6 : Différents marqueurs significatifs trouvés lors du phénotypage pour les 3 croisements

croisements	marqueurs	locus	site	p-value
A2	oatKasp677_16A	Ch_16A	14	0,0026
	oatKasp62_16A	Ch_16A	11	0,00824
A3	oatKasp675_16A	Ch_16A	11	5,53E-06
A29	oatKasp368_1C	Ch_1C	4	6,18E-04
	oatKasp513_19A	Ch_19A	7	0,00195
	oatKasp480_19A	Ch_19A	8	0,00205

Les allèles positifs sont apportés par les lignées Tenebra (A2 et A29) et Tropicale (A3) ce qui confirme leur résistance observée phénotypiquement.

Conclusion

Face au problème de la rouille couronnée et à la demande de diminuer les produits phytosanitaires, ce programme a permis de nombreuses avancées et ouvert de nouvelles pistes de recherches. En effet, à partir de trois croisements sur 11, nous avons réussi à élaborer une carte génétique consensus. Grâce au couplage avec le phénotypage, nous avons pu révéler que six marqueurs dont deux hautement significatifs sont liés à la résistance à la rouille couronnée. Ces marqueurs sont localisés sur trois chromosomes différents (Ch_1C, Ch_16A et Ch_19A) ce qui suggère la présence d'au moins trois gènes améliorant la résistance dans notre matériel. Il reste néanmoins de nombreux travaux à approfondir comme par exemple développer le nombre de populations ou introgresser les fragments apportant la résistance dans d'autres variétés d'intérêt.

En parallèle, le développement de la méthode HD est prometteur. Le milieu W14 phytagel est le plus performant. Des nouvelles recherches sont en cours pour affiner le stade de prélèvement et des essais sur la culture de microspores vont débuter.

Remerciements

Ces travaux ont bénéficié du soutien financier du Ministère en charge de l'Agriculture, grâce au fond CASDAR semences.

Références bibliographiques

De Cesaro T., Baggio M.I., Zanetti S.A., Suzin M., Augustin L., Brammer S.P., Lorczeski E.J., Milach S.C.K., 2009. Haplodiploid androgenetic breeding in oat: genotypic variation in anther size and microspore development stage, Sci Agri (Piracicaba, Braz) 66, 118-122.

Gnanesh B.N., Mitchell Fetch J., Menzies J.G., Beattie A.D., Eckstein P.E., McCartney C.A., 2013. Chromosome location and allele-specific PCR markers for marker-assisted selection of the oat crown rust resistance gene Pc91. Molecular Breeding 32, 679-686.

Kiviharju E.M., 2009. Anther Culture Derived Doubled Haploids in Oat, Advances in Haploid Production in Higher Plants, pp 171-178

Kiviharju E.M., Pehu E., 1998. The effect of cold and heat pretreatments on anther culture response of *Avena sativa* and *A. sterilis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 54, 2, 97-104

Kiviharju E.M, Puolimatka M., Pehu E., 1997. Regeneration of anther-derived plants of *Avena sterilis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 48, 2, 147-152

Kiviharju E., Moisander S., Laurila J., 2005. Improved green plant regeneration rates from oat anther culture and the agronomic performance of some DH lines. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81,1, 1-9

Kiviharju E.M., Puolimatka M., Saastamoinen M., Pehu E., 1999. Extension of anther culture to several genotypes of cultivated oats. Plant Cell Reports 19, 7, 674-679

Lander E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J., Lincoln S.E., Newburg L., 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1, 174-181.

Oliver R.E., Tinker N.A., Lazo G.R., Chao S., Jellen E.N., Carson M.L., Rines H.W., Obert D.E., Lutz J.D., Shackelford I., Korol A.B., Wight C.P., Gardner K.M., Hattori J., Beattie A.D., Bjørnstad Å., Bonman J.M., Jannink J.-L., Sorrells M.E., Brown-Guedira G.L., Mitchell Fetch J.W., Harrison S.A., Howarth C.J., Ibrahim A., Kolb F.L., McMullen M.S., Murphy J.P., Ohm H.W., Rossnagel B.G., Yan W., Miclaus K.J., Hiller J., Maughan P.J., Redman Hulse R.R., Anderson J.M., Islamovic E., Jackson E.W., 2013. SNP Discovery and Chromosome Anchoring Provide the First Physically-Anchored Hexaploid Oat Map and Reveal Synteny with Model Species. PLoS ONE 8:e58068.

Ponitka A., Slusarkiewicz-Jarzina A., 2009. Regeneration of oat androgenetic plants in relation to induction media and culture conditions of embryo-like structures. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 78, 3, 209-213.

Rines H.W, Daheen L.S., 1990. Haploid oat plants produced by application of maize pollen to emasculated oat florets. Crop Sci 30, 1073-1078.

Sidhu P.K., Howes N.K, Aung T., Zwer P.K., Davies P.A., 2006. Factors affecting oat haploid production following oat×maize hybridation, Plant Breeding 125, 243-247.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0).



https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL).