

Avancées sur la génétique de la résistance de la luzerne au *Verticillium* et à l'antracnose

Bernadette Julier

Unité de Recherche Pluridisciplinaire
Prairies et Plantes Fourragères, Lusignan



Recherche de marqueurs moléculaires de la résistance aux bio-agresseurs (anthracnose et verticilliose) chez la luzerne pérenne

- Contrat de Branches C2008-16 (2008-2011)
- Partenariat:
 - INRA Lusignan
 - ENSAT – INP Toulouse
 - ACVF luzerne
 - INRA Montpellier



Problématique

- Peut-on envisager la sélection assistée par marqueurs chez la luzerne ?
 - En prenant le cas de maladies à hérédité forte
 - En s'appuyant sur des connaissances acquises ou à acquérir sur la légumineuse modèle *Medicago truncatula*

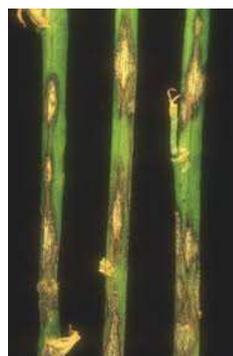


Contexte

- La luzerne, légumineuse fourragère
 - espèce autotétraploïde:
 $2n = 4x = 32$ chromosomes
 - variétés synthétiques
 - individus hétérozygotes
 - 2 maladies majeures:



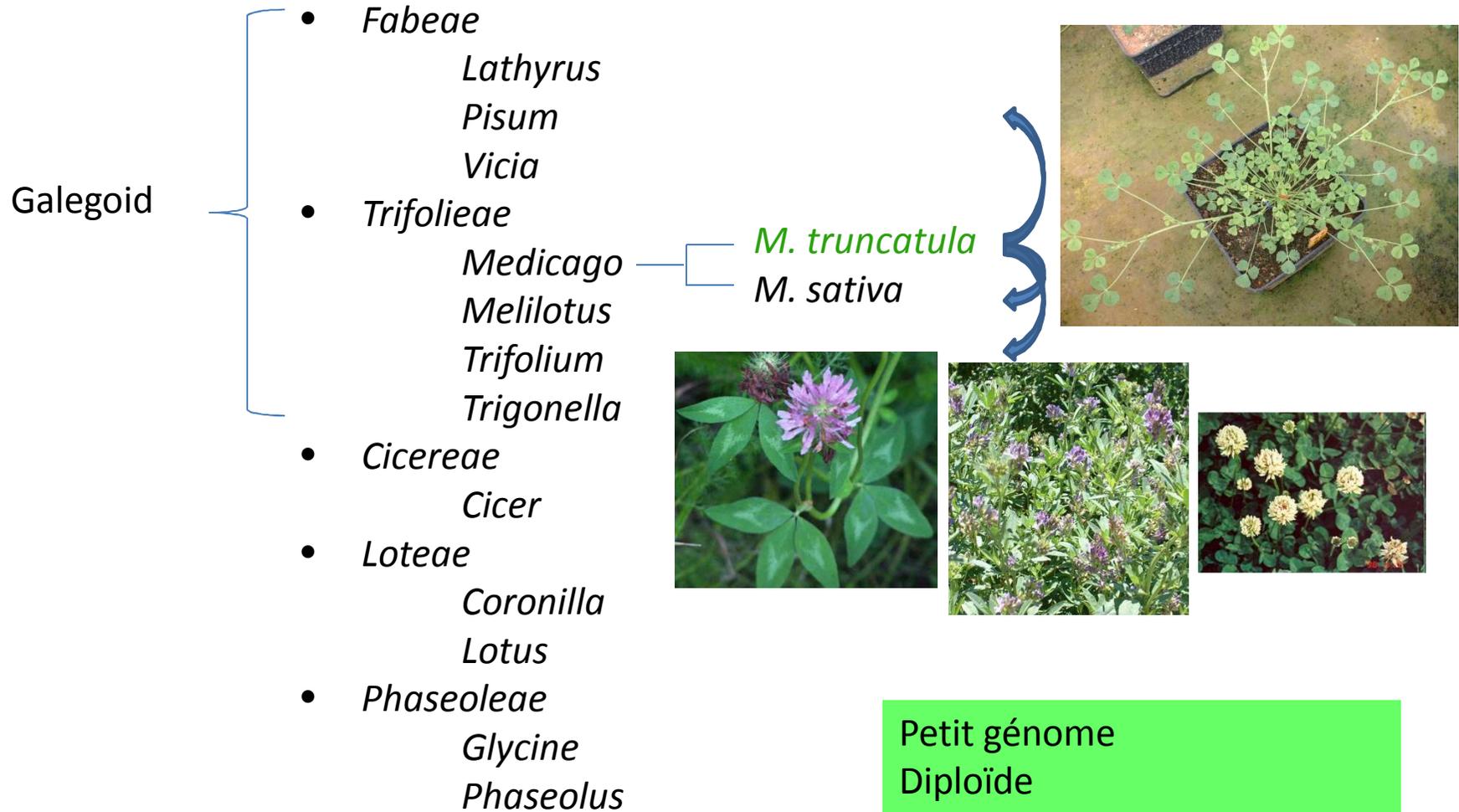
anthracnose (*Colletotrichum trifolii*)



verticilliose
(*Verticillium alboatrum*)



Contexte



Petit génome
Diploïde
Autogame → homozygote
Cycle de vie rapide

Contexte

- Beaucoup de données et d'outils disponibles sur *M. truncatula*
 - Séquences EST, génome
 - Marqueurs
 - Ressources génétiques, populations de cartographie
- En 2008, peu de données sur la luzerne

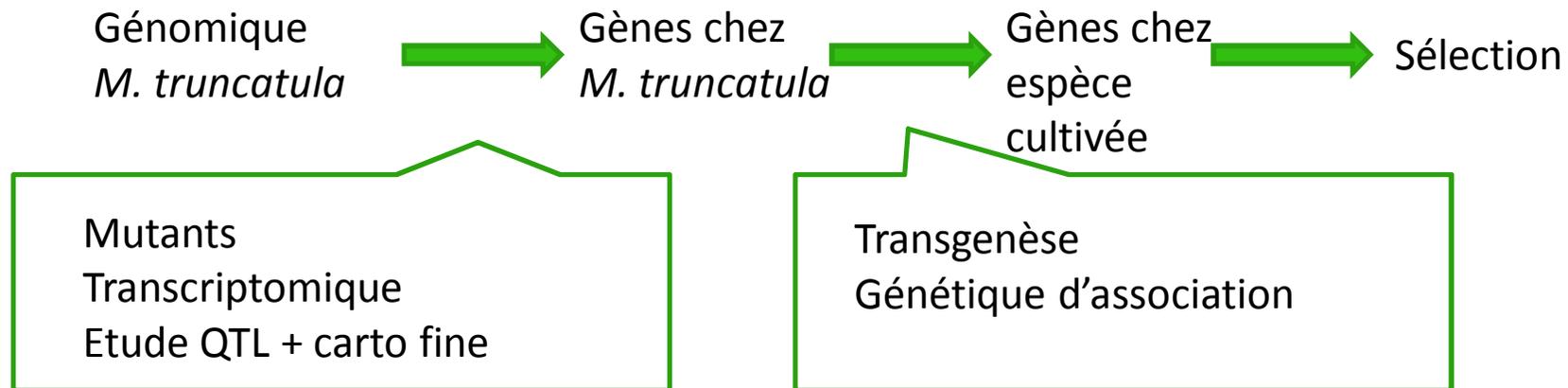


Contexte: éléments disponibles en 2008

- Identification d'un gène de *M. truncatula* qui induit la résistance à l'anthraxnose chez la luzerne
 - QTL dans une population de cartographie : 1 QTL majeur sur chrom 4
 - Gène de résistance : RCT1
 - Luzerne transformée avec RCT1 devient résistante H. Zhu and coll.
- Il existe de la variabilité pour la résistance au *Verticillium* chez *M. truncatula*

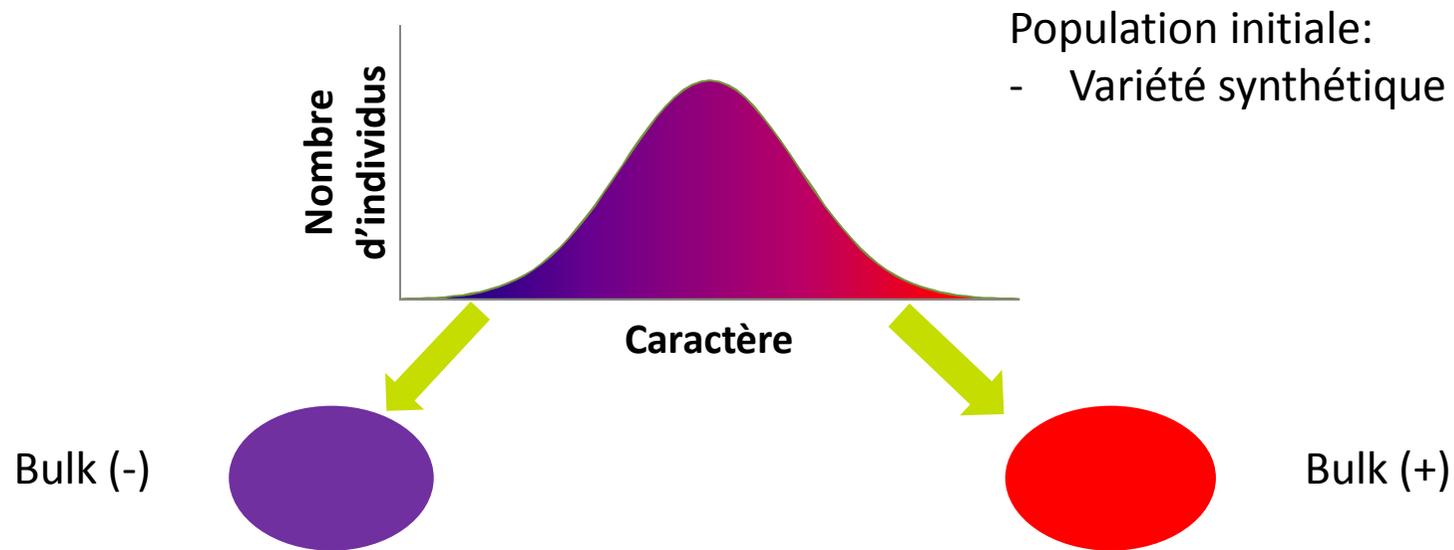
Objectifs du projet

- Le gène RCT1 explique-t-il les variations pour la résistance à l'anthraxose chez la luzerne ?
- Peut-on trouver un ou quelques QTL majeurs de la résistance au *Verticillium* chez *M. truncatula* ?



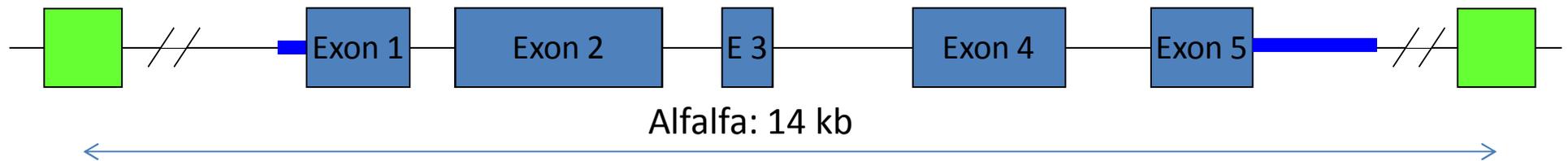
Anthracnose

- Stratégie Bulk Segregant Analysis



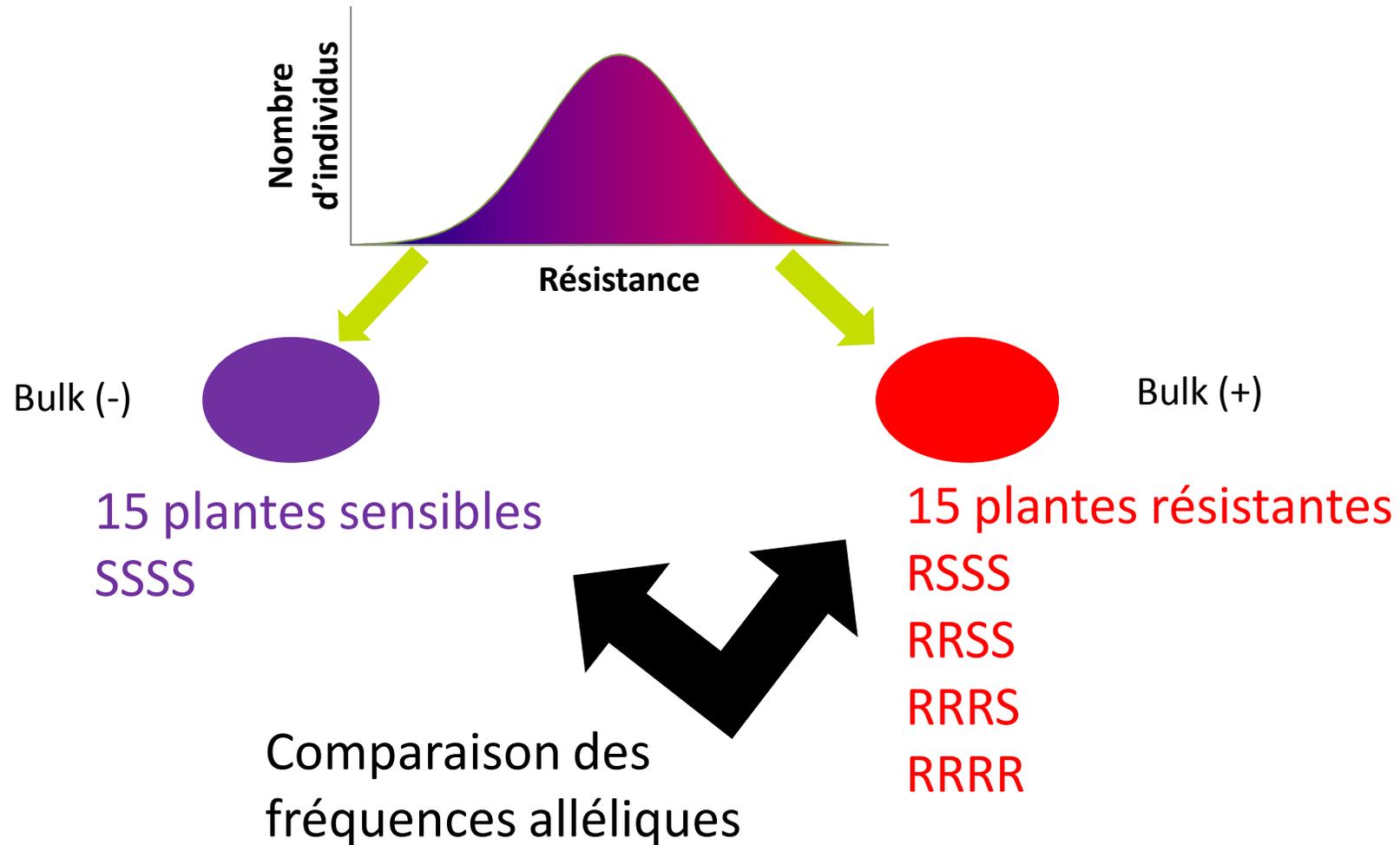
Anthracnose

- Séquençage de RCT1 de la luzerne
- 8 variétés avec différents niveaux de résistance (= différentes proportions de plantes résistantes)
- Phénotypage de 100 plantes / variété
- Choix de 15 plantes résistantes (R), 15 sensibles (S) / variété
- Amplification du gène de chaque génotype
- Séquenceur 454 : séquençage des 4 allèles de chaque individu, en bulks
- Y a-t-il une différence de fréquence d'allèles entre les bulks R et S ?



Anthracnose

RCT1 : allèle de résistance est dominant sur allèle de sensibilité



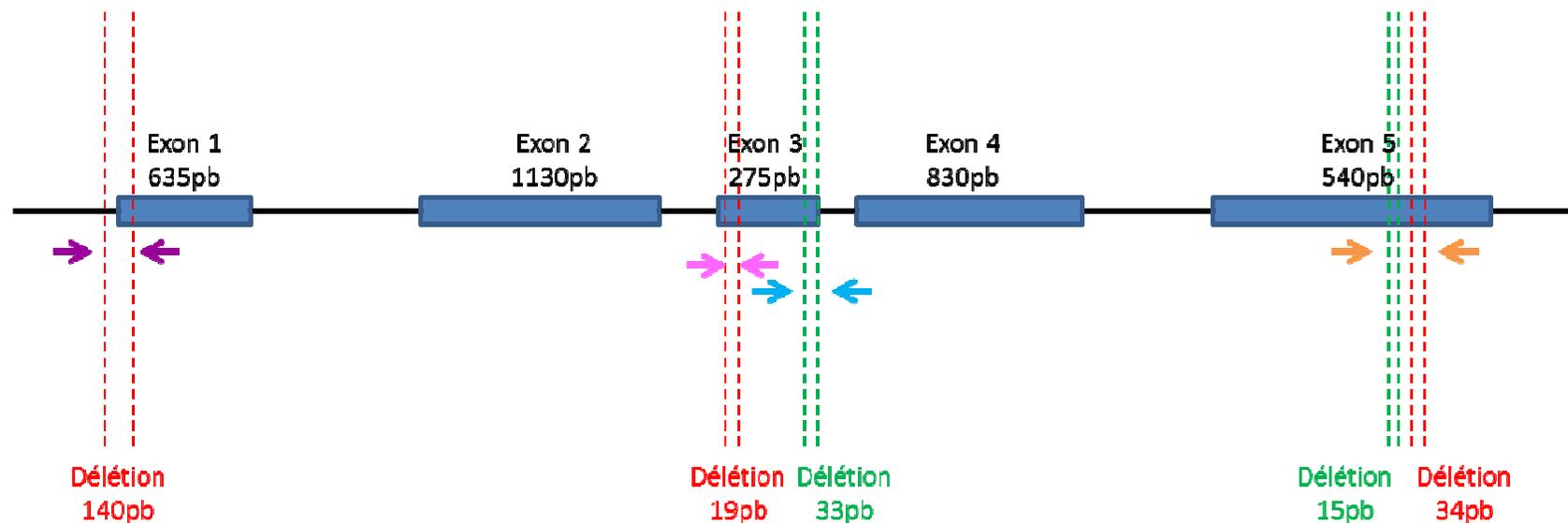
Anthracnose: séquençage 454

Bulk	No sequences	Median length (pb)
B1r	27 675	304
B2r	24 878	303
Cr	26 445	265
Gr	33 520	296
B1s	28 871	299
B2s	31 776	298
Cs	22 229	266
Gs	39 598	298
Kr	32 869	286
Mr	16 596	272
Pr	31 353	262
Sr	33 631	277
Ks	101 727	320
Ms	38 895	406
Ps	28 147	401
Ss	52 609	408



Anthracnose: séquençage 454

- Assemblage du gène (CAP2 sous Unix) dans chaque bulk
- Alignements
 - Trop de polymorphisme dans les introns
 - Focus sur les exons
- Identification de 5 régions polymorphes dans les exons



Anthracnose

- Amplification de chaque région des individus R et S de chaque variété

Exemple: exon 3

Résistance	Nb Individus	Allèle 262	Allèle 294	Allèle 295	Allèle 297	Allèle 298	Missing data
R	130	3	4	413	3	5	23
S	126	0	4	405	1	5	22

Aucun polymorphisme n'explique les variations de résistance

Anthracnose

- Mais allèle 102 de l'exon 1 est plus fréquent dans les individus R (délétion ATG)

Phenotype	Nombre d'individus	Allèle 102	Allèle 241	Allèle 244	Missing data
R	130	28	405	61	6
S	126	13	409	54	7

- Perte de fonction qui pourrait induire la résistance
- Des sélections divergentes en cours de création pour phénotypage

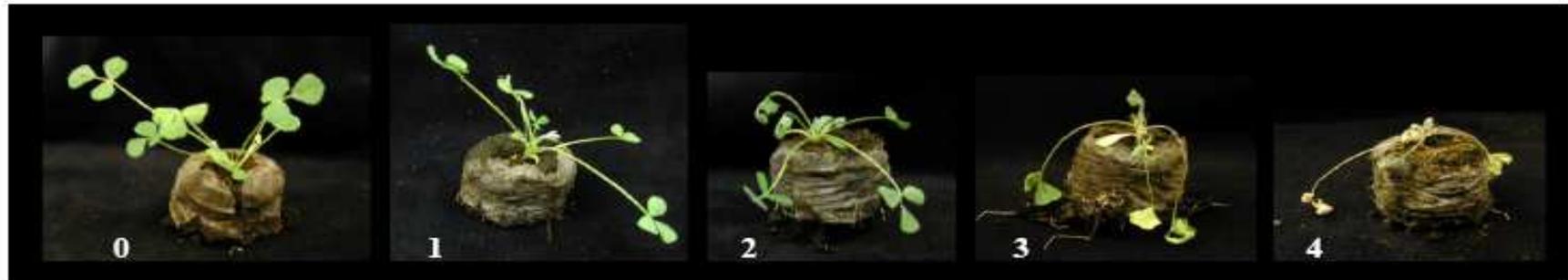
102/102/102/102 \leftrightarrow 241/241/241/241

Anthracnose

- Le polymorphisme mis en évidence n'explique pas la variabilité phénotypique pour la résistance
 - Introns? Séquences régulatrices ?
 - Autre gène?
 - Trop de polymorphisme dans les bulks pour réaliser les assemblages ?
- La délétion dans exon 1 en cours de test par création de matériel divergent

Verticillium sur *M. truncatula*

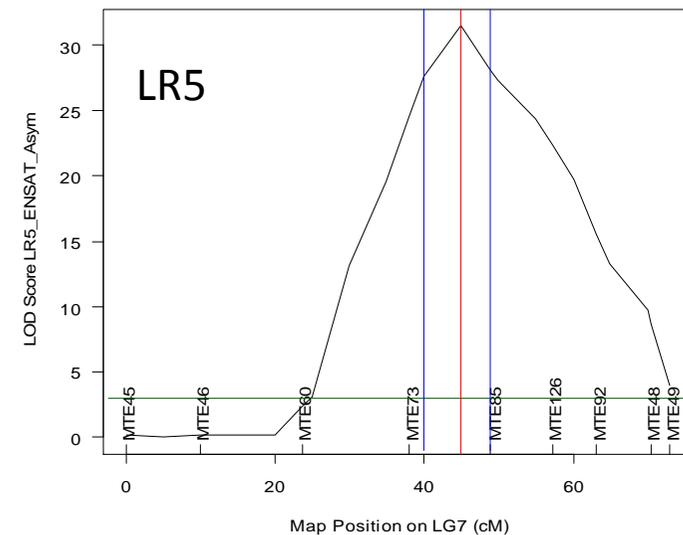
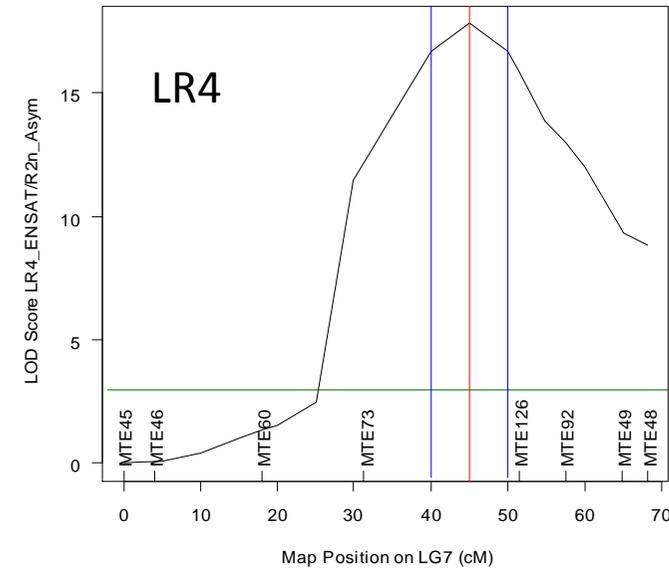
- Test de résistance plus efficace : blessure racinaire au lieu de fauchage



- Etude de plusieurs populations de cartographie pour des paramètres de développement de l'infection
- Analyse de la résistance d'une collection de lignées dont le séquençage est en cours (perspective: étude d'association sur l'ensemble du génome)

Verticillium sur *M. truncatula*

- 1 QTL majeur sur le chromosome 7, dans 2 populations de cartographie
- Ce n'est pas une zone riche en gènes de résistance
- Réduction de l'intervalle de confiance, analyse *in silico* des gènes candidats
- 2 autres QTL (chrom 2 et 6) dans une autre population



Conclusion

- Utilisation de *M. truncatula* pour analyser le déterminisme de caractères agronomiques
 - Variabilité génétique
 - Détection de QTL → gènes candidats
- Validation sur espèces cultivées
 - Difficulté d'obtenir la séquence des allèles sur une espèce tétraploïde; GBS à tester ?
 - Succès mitigé pour RCT1, mais net pour Constans
- D'autres gènes à étudier

Conclusion

Valorisations

- Ben C. et al 2013. Natural diversity in the model legume *Medicago truncatula* allows identifying distinct genetic mechanisms conferring partial resistance to Verticillium wilt. *Journal of Experimental Botany*, 64, 317-332
- Julier B. 2012. Alfalfa breeding benefits from genetic analyses on *Medicago truncatula*. *7th International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf*, p. 17-19
- Julier B. et al. (2012). Role of the RCT1 gene in anthracnose resistance in alfalfa. In: *Breeding strategies for sustainable forage and turf grass improvement*. 29th Meeting of the Eucarpia Fodder Crops and Amenity Grasses Section, Dublin, Ireland, New York, USA, Springer, p. 203-208

Merci à ...

INRA Lusignan

- Isabelle Meusnier
- Ludovic Alaux
- Philippe Barre

INRA Montpellier

- Jean-Marie Prospero

ENSAT – INP Toulouse

- Laurent Gentzbittel
- Cécile Ben
- Martina Rickauer

BioGeves Surgères

INRA Toulouse

- Jérôme Gouzy

ACVF Luzerne

- Barenbrug: Dominique Noël
- Desprez: P. Lonnet, P. Devaux
- Jouffray-Drillaud: Vincent Béguier, Sandrine Flajoulot
- R2N: Marie-Christine Gras, Michel Romestant

Génopole Toulouse

Sicasov

- Marc Lécrivain, Antoine de la Soujeole

Soutien financier du Ministère de l'Agriculture, CTPS