



Diversité et combinaison des modes d'actions des QTL de résistance à *Aphanomyces euteiches* chez le pois

Clément Lavaud

► To cite this version:

Clément Lavaud. Diversité et combinaison des modes d'actions des QTL de résistance à *Aphanomyces euteiches* chez le pois. Biologie végétale. Agrocampus Ouest, 2015. Français. <NNT : 2015NSARC121>. <tel-01493826>

HAL Id: tel-01493826

<https://theses.hal.science/tel-01493826v1>

Submitted on 22 Mar 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

THESE / AGROCAMPUS OUEST

Sous le label de l'Université Européenne de Bretagne

pour obtenir le diplôme de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT SUPERIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES,
AGRO-ALIMENTAIRES, HORTICOLES ET DU PAYSAGE**

Spécialité : « Biologie et Agronomie »

Ecole Doctorale : « Vie-Agro-Santé »

présentée par :

Clément LAVAUD

DIVERSITE ET COMBINAISON DES EFFETS ET MODES D'ACTION DES QTL DE RESISTANCE A *APHANOMYCES* *EUTEICHES* CHEZ LE POIS

Soutenue le 29 octobre 2015 devant la commission d'Examen

Composition du jury :

C.- E. DUREL

P. MESTRE

C. JACQUET

J. LE GOUIS

M. MANZANARES-DAULEUX

R. DELOURME

M.- L. PILET-NAYEL

Directeur de recherche, INRA

Chargé de recherche, HDR, INRA

Professeur, Université Toulouse

Directeur de recherche, INRA

Professeur, Agrocampus Ouest

Directrice de recherche, INRA

Chargée de recherche, HDR, INRA

Rapporteur

Rapporteur

Examinateur

Examinateur

Examinatrice

Co-Directrice de thèse

Directrice de thèse

DIVERSITE ET COMBINAISON DES EFFETS ET DES MODES D’ACTION DES QTL DE RESISTANCE A *APHANOMYCES EUTEICHES* CHEZ LE POIS

La connaissance des effets et modes d’action des QTL (Quantitative Trait Loci) de résistance des plantes aux maladies est un enjeu majeur pour l’exploitation durable des résistances génétiques en agriculture. Dans le pathosystème pois/*Aphanomyces euteiches*, présentant une importance économique majeure, l’objectif de la thèse a consisté à valider les effets de QTL de résistance, seuls ou en combinaison, et à connaître leurs modes d’action sur les étapes du cycle de l’agent pathogène. Un total de 157 NILs (Near Isogenic Lines) de pois issues d’un programme de Back-cross Assisté par Marqueurs, porteuses d’aucun, un, deux ou trois des sept principaux QTL de résistance préalablement identifiés, a été génotypé à l’aide d’une puce 15K SNPs et évalué pour la résistance. Les NILs porteuses de QTL à effets majeurs, seuls ou en combinaison avec des QTL à effets mineurs, ont présenté des niveaux accrus de résistance partielle en conditions contrôlées et au champ par rapport aux NILs dépourvues de QTL, dans différents fonds génétiques. Certaines NILs comportant des QTL individuels ou combinés à effets mineurs ont également montré un niveau réduit de sévérité de la maladie dans l’une ou les deux conditions de test. La plupart des QTL a présenté des effets significatifs sur le ralentissement de l’infection et/ou de la quantité d’ADN pathogène ayant colonisé la racine pendant sept jours après inoculation. Cette thèse fournit des outils et éléments de choix de QTL à combiner en sélection pour augmenter l’efficacité de la résistance partielle à *A. euteiches* dans les futures variétés de pois.

Mots clés: *Pisum Sativum* L., pourriture racinaire, résistance partielle, QTL, NILs, BAM

DIVERSITY AND COMBINATION OF EFFECTS AND ACTION MODES OF *APHANOMYCES* ROOT ROT RESISTANCE QTL IN PEA

Knowledge of the effects and action modes of resistance QTL to plant diseases is a major challenge for the durable use of genetic resistances in agriculture. In the pea/*Aphanomyces euteiches* pathosystem, which has a major economic importance, the aim of this study was to validate the single or combined effects of main resistance QTL, and study their action modes on steps of the pathogen life cycle. A total of 157 pea NILs (Near Isogenic Lines) created by Marker-Assisted Back-crossing and carrying no, one, two or three of the seven main resistance QTL previously identified, was genotyped using a 15K SNPs array and evaluated for resistance. The NILs carrying major-effect QTL, individually or in combination with minor-effect QTL, had increased levels of partial resistance in controlled conditions and in the field compared to NILs without QTL, in different genetic backgrounds. Several NILs carrying single or multiple minor-effect QTL also showed reduced levels of disease severity in one or the two test conditions. Most of the QTL had significant effects on slowing down infection and/or pathogen DNA quantity which had colonized the root for seven days after inoculation. This study gives tools and information for the choice of resistance QTL to use in pyramiding breeding strategies for increasing partial levels of resistance to *A. euteiches* in future pea varieties.

Keywords: *Pisum sativum* L., root rot, partial resistance, QTL, NILs, MAB

REMERCIEMENTS

En écrivant ces quelques lignes, je conclus définitivement ces trois années de recherche, d'échange et de pur plaisir au sein de l'UMR IGEPP. Ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans le soutien de nombreuses personnes qui doivent être citées et remerciées comme il se doit.

Je tiens, tout d'abord, à remercier la Région Bretagne, le département Biologie et Amélioration des Plantes de l'INRA pour avoir co-financé cette thèse, ainsi que le projet investissement d'avenir ANR PeaMUST et la Société Française de Phytopathologie pour avoir financé mes différents travaux de recherche et mes déplacements nationaux et internationaux.

Je remercie également les différents membres de mon jury de thèse Charles-Eric Durel, Pere Mestre, Christophe Jacquet, Jacques Le Gouis et Maria Manzanares-Dauleux qui ont accepté d'évaluer et de juger ce travail. Merci également, aux membres de mon comité de thèse Anne Moussart, Christophe Le May, Henriette Goyeau, Laurence Moreau, Caroline Caporalino et Pascale Le Roy pour leurs regards critiques, les discussions (autour du modèle CLMM) mais aussi, pour avoir validé et orienté ces travaux.

Un grand MERCI à mes deux directrices de thèse Marie-Laure Pilet-Nayel et Régine Delourme, malgré vos emplois du temps très bookés, vous avez toujours su me consacrer du temps lorsque j'en avais besoin. Marie-Laure, je te remercie de m'avoir fait confiance en me proposant ce sujet de thèse et j'espère avoir répondu à toutes tes attentes. J'ai beaucoup appris à tes côtés pendant ces 4 années (stage compris), et je t'en suis extrêmement reconnaissant. Je tiens aussi à te remercier pour le temps que tu as passé dans les corrections et relectures de ce manuscrit même pendant tes vacances, merci aussi à ton fidèle et non moins célèbre crayon ROUGE.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe « Légumineuses » Alain, Marie-Laure, Anne M., Christophe LM, Gilles, Angélique, Christophe P, Anne Q, Gwenola, Isabelle, Pierrick, Jean-Philippe, Gérard, Henri, Christophe L, Stéphane, Coralie, Michèle, Caroline et Marie-Noëlle pour votre accueil très agréable et votre disponibilité tout au long de ces trois années.

Merci également à Pascale, Maryline et le reste de l'équipe ADSL pour tous les aspects administratifs.

Deux personnes Angélique Lesné et Christophe Piriou, qui ont participé de près à cette thèse, méritent tout le témoignage de ma reconnaissance. Pendant cette thèse, j'ai appris à vous connaître tout au début à travers les manips de SAM, puis au travers du génotypage pour sélectionner le matériel et enfin avec le phénotypage « Angélique : J'ai mis un INR de 2 à la lignée XX ➔ HOURRA c'est une lignée avec un QTL ». Plus que deux collègues, vous êtes de vrais amis, toujours de bonne humeur, prêts à me donner un coup de main mais aussi à venir boire un verre à la maison, je ne saurais jamais trop comment vous remercier. Merci Christophe pour toutes les parties de billard et je peux même affirmer que l'élève a dépassé le maître ☺. Merci également pour les grands moments de fou rire que nous avons pu avoir tous les trois.

Un grand MERCI également à Gwenola pour ton soutien sans faille. Lors de cette thèse, tu as appris à préparer une souche d'inoculum, fait de très nombreux semis, fait des inoculations (+ de 100 litres), nettoyé des racines et bien sûr réalisé tes premières notations en condition contrôlée et au champ (au total environ 25 000 plantes notées au cours de cette thèse). Je t'en remercie et j'ai vraiment apprécié de travailler avec toi.

Je remercie particulièrement Pierrick et Jean-Philippe ainsi que l'UE la Motte (Roger « bonne retraite »), l'UE Epoisses et les mains-d'œuvre pour les trois années d'essais au champ à Riec-sur-Belon et à Dijon. Malgré les 15 heures de notations dans le froid, le chantier Riec-sur-Belon est une vraie expérience indescriptible, que je ne pourrai oublier notamment la pizza du soir au restaurant « Ty-Ru » qui est extraordinaire.

Merci à Grégoire et Nadim pour les marqueurs SNP, mes yeux vous disent merci pour les 15000 SNP qu'il a fallu analyser un-par-un et cela 16 fois. Merci également à Gildas qui était toujours disponible pour lyophiliser mes racines de pois et à l'équipe « Serre » pour la préparation des plateaux et des chambres de culture.

Je remercie également tous les partenaires du WP2-PeaMUST et, en particulier, les quatre obtenteurs Jean-François, Philippe, Guillaume et Gilles qui ont bien voulu phénotyper ce matériel. Merci à vous pour l'ensemble des données mais également pour avoir pris du temps de nous accueillir afin de visiter les essais.

Une personne m'a été d'une grande aide, au cours de cette thèse, et sans qui les statistiques resteraient incomprises ou mal utilisées, je veux bien évidemment parler de Maxime Hervé. Je te remercie de tout le temps que tu as consacré pour pouvoir utiliser le modèle CLMM et pour toutes tes explications très pédagogiques et sujettes à de très nombreuses discussions avec ma chef (Bloc en facteur aléatoire mais pourquoi ???).

Je souhaiterais remercier les thésards issus de la même génération que moi à savoir Elise, Aurore, Séverine et Anne-Sophie. Je remercie également les anciens thésards Carole, Berline, Pascal et Clément qui ont quitté l'unité, ainsi que les petits nouveaux Alexandre, Yoann, Sylvain et Benjamin. Merci à vous pour l'ensemble des discussions que nous avons pu avoir.

Merci également à mes deux stagiaires, Estelle et en particulier Morgane dont j'étais l'encadrant principal, qui ont contribué à cette thèse. Merci pour tout ce travail réalisé, vous m'avez bien aidé !!!

Merci également Gilles et Aurore de m'avoir supporté dans le bureau (enfin je ne sais pas qui supporte qui !!!). Je tenais à vous remercier de la bonne humeur toujours présente et pour les nombreuses conversations que nous avons pu avoir, scientifiques ou non...

Je remercie également Laure pour avoir covoituré avec moi durant cette dernière année, je peux t'avouer que parfois tu me fais peur, surtout quand tu t'insères ou t'arrêtes dans les ronds-points.

Je voudrais maintenant remercier la célèbre « Pause-Café » avec qui les discussions ont toujours été intéressantes et très larges, mais tout de même un peu trop féministes. Pour n'oublier personne, je commencerai par les filles : Sophie R, Laurie, Anne L, Françoise, Virginie, Guéna, Vanessa, Cécile, Emilie, Maryse, Jocelyne, Solenn, Solenne, Anne-Marie, Tyfanie et les quelques hommes Patrick, Alexandre et Philippe. Tous vos gâteaux étaient délicieux et j'ai vraiment pris plaisir à tous les goûter sans exception ☺☺☺.

Merci à Angélique L et Bruno, Christophe P et Agnès, Anne Q et Nico, Sophie P, Christine et Gwenn pour nos différentes sorties (karting, bowling, ...). Même si au final je gagnais toujours, enfin presque (Bruno je te battrai un jour au karting), vous avez toujours été présents pour que l'on rigole et boive un bon coup sans trop parler du boulot. Merci également à Sophie P, Christophe P, Angélique L, Géraldine et Angélique B pour vos grandes discussions sérieuses enfin presque, nos fous rire et blagues vont me manquer ☹☹☹.

Pour finir, je souhaiterais remercier ma famille (mon papa, ma maman et mon frère) qui m'ont toujours soutenu et accompagné dans ce projet professionnel. Je remercie également mes grands-parents qui ont toujours pris de mes nouvelles et soutenu, malheureusement mamie je n'ai pas inventé des petits pois carrés. Enfin, je dédie cette thèse à deux personnes qui sont tout pour moi et qui m'ont toujours soutenu, supporté et boosté, je veux bien évidemment parler de ma fille LYLA et ma femme EMILIE.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	3
1. LA RESISTANCE GENETIQUE DES PLANTES	3
1.1. Les différents types de résistance génétique	3
1.2. Durabilité des résistances génétiques.....	4
1.2.1. Définition	4
1.2.2. Evolution des populations pathogènes	4
1.2.3. Lien entre durabilité et résistances génétiques	5
1.2.4. Stratégies de gestion des résistances génétiques	6
1.3. Dissection génétique de la résistance quantitative	7
1.3.1. Identification de QTL de résistance	7
1.3.2. Les QTL de résistance aux maladies.....	10
1.4. Utilisation des QTL de résistance en sélection	12
1.4.1. Sélection Assistée par Marqueurs.....	12
1.4.2. La sélection génomique	13
1.5. Mécanismes et modes d'action associés à la résistance	14
1.5.1. Mécanismes associés aux gènes R	14
1.5.2. Mécanismes de résistance quantitative	15
1.5.3. Modes d'action des QTL de résistance sur les agents pathogènes	17
2. LA RESISTANCE DU POIS A <i>APHANOMYCES EUTEICHES</i>	19
2.1. Le pois protéagineux.....	19
2.1.1. Enjeux et intérêts de la culture.....	19
2.1.2. Production et rendement.....	20
2.1.3. La génétique du pois	20
2.2. La pourriture racinaire précoce du pois.....	22
2.2.1. Importance et symptômes de la maladie	22
2.2.2. L'agent pathogène et son cycle infectieux	23
2.2.3. Spécificité d'hôte et variabilité d' <i>A. euteiches</i>	24
2.2.4. Méthodes de lutte.....	26
2.3. La résistance à <i>Aphanomyces euteiches</i> chez le pois	27
2.3.1. Sources de résistance et sélection	27
2.3.2. Génétique de la résistance	28
2.3.3. Mécanismes de résistance	30
3. OBJECTIFS ET STRATEGIES DU TRAVAIL DE THESE.....	32
CHAPITRE II : VARIABILITE DES EFFETS DES QTL DE RESISTANCE A <i>APHANOMYCES EUTEICHES</i> DANS DIFFERENTS FONDS GENETIQUES EN CONDITIONS CONTROLEES	34
1. INTRODUCTION DU CHAPITRE	34
2. ARTICLE PUBLIE	34
CHAPITRE III : VARIABILITE DES EFFETS DES QTL DE RESISTANCE A <i>APHANOMYCES EUTEICHES</i> DANS DIFFERENTS ENVIRONNEMENTS AU CHAMP....	51
1. INTRODUCTION DU CHAPITRE	51

2. ARTICLE EN PREPARATION	51
<i>Résumé de l'article</i>	53
<i>Introduction</i>	54
<i>Matériel et Méthodes</i>	56
Caractérisation moléculaire des NILs	57
Evaluation phénotypique des NILs	57
Analyse statistique.....	59
<i>Résultats</i>	60
Construction des génotypes graphiques des NILs	60
Evaluation des NILs pour la résistance à <i>A. euteiches</i> au champ.....	64
<i>Discussion</i>	69
Caractérisation génomique des NILs.....	69
Effets individuels des QTL dans différents environnements.....	72
Combinaison de QTL limitant la sévérité de la pourriture sur racines.....	73
CHAPITRE IV : MODE D'ACTION DES QTL DE RESISTANCE SUR LES ETAPES DU CYCLE D'APHANOMYCES EUTEICHES EN CONDITIONS CONTROLEES.	75
1. INTRODUCTION DU CHAPITRE	75
2. ARTICLE ASSOCIE	75
CHAPITRE V : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	96
1. SYNTHÈSE DES RESULTATS OBTENUS	97
1.1. <i>Diversité des effets et modes d'action des QTL de résistance</i>	97
1.2. <i>Efficacité des combinaisons de QTL de résistance</i>	99
2. DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS ; RETOMBEES EN RECHERCHE ET SELECTION.....	100
2.1. <i>Validation des effets des QTL de résistance dans différents fonds génétiques</i>	101
2.2. <i>Validation des effets des QTL de résistance dans différentes conditions</i>	102
2.3. <i>Mode d'action des QTL de résistance</i>	103
2.4. <i>Sélection assistée par marqueurs et combinaisons de QTL pour la résistance</i>	104
2.5. <i>Hypothèses sur les fonctions sous-jacentes aux QTL de résistance</i>	106
3. PERSPECTIVES DE RECHERCHE	107
3.1. <i>Effets des QTL de résistance sur la nuisibilité de la maladie</i>	107
3.2. <i>Utilisation des marqueurs et combinaisons de QTL en sélection</i>	108
3.3. <i>Cartographie fine de QTL de résistance</i>	108
3.4. <i>Mode d'action des QTL sur le cycle d'A. euteiches</i>	109
3.5. <i>Mécanismes associés aux QTL de résistance en réponse à l'infection</i>	110
3.6. <i>Durabilité des QTL de résistance</i>	110
4. CONCLUSION GENERALE	111
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	112
ANNEXES.....	128

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

ADI : Aerial Decline Index

ADN : Acide Désoxyribonucléique ou **DNA** : deoxyribonucleic acid

Af : Afila

ANOVA : Analysis Of Variance

ANR : Agence Nationale de la Recherche

AUDPC : Area Under the Curve Progression of the Disease

BAC : Bacterial Artificial Chromosome

BAM : Back-Cross Assisté par Marqueurs ou **MAB** : Marker-Assisted Backcrossing

BC : Back-Cross

CLMM : Cumulative Linked Model Mixed

cM : centiMorgan

CT : Threshold Cycle

DGC : Donor Genome Content

DL : Déséquilibre de Liaison ou **LD** : Linkage Disequilibrium

DS : Disease Severity

DSP : Dark Skin Perfection

E : Efficiency

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EST : Expressed Sequence Tag

GBS : Genotyping By Sequencing

GL : Groupe de Liaison ou **LG** : Linkage Group

GLMM : General Linear Mixed Model

GSP : Groupement des Sélectionneurs de Protéagineux

GWAS : Genome Wide Association Studies

h² : héritabilité

HD : Haploïde Doubé

HIF : Heterogeneous Inbred Families

HR : Hypersensibilité à la photopériode

IC : Intervalle de Confiance ou **CI** : Confidence Interval

INR : Indice de Nécrose Racinaire

LM : Linear Model

LMM : Linear Model Mixed

LR : Likelihood Ratio

LRR : Leucine Rich Repeat

LSMeans : Least Square Means

NB(S) : Nucleotide Binding (Site)

NGS : Next Generation Sequencing

NIL : Near Isogenic Line

NLR ou **NBS-LRR** : Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat

PCR : Polymerase Chain Reaction

PI : Potentiel Infectieux

PR : Partiellement Résistant

Q-PCR : Quantitative PCR

QTL : Quantitative Trait Loci

RGC : Recipient Genome Content

RIL : Recombinant Inbred Line

S : Sensible

SAM : Sélection Assistée par Marqueurs ou **MAS** : Marker-Assisted Selection

SG : Sélection Génomique

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SRAM : Sélection Recurrente Assistée par Marqueurs

SSR : Single Sequence Repeat

UNIP : Union Nationale Interprofessionnelle des plantes riches en Protéines

INTRODUCTION GENERALE

Depuis une trentaine d'années, l'amélioration génétique des plantes est de plus en plus étudiée grâce notamment au développement des biotechnologies. L'étude génétique des caractères agronomiques, comme le rendement, la qualité du fruit ou de la graine, sont des axes importants de la recherche. Depuis 2007, le Grenelle de l'Environnement prône le développement d'une agriculture durable, respectueuse de l'environnement et le plan Ecophyto vise à réduire de 50% l'utilisation des intrants chimiques dans les prochaines années. Dans ce contexte, la dissection génétique des résistances quantitatives aux maladies, a priori plus durables que les résistances monogéniques, a beaucoup progressé depuis une quinzaine d'années avec le développement des outils moléculaires et de la génomique. Cependant, même si de nombreuses études sur la résistance quantitative dans divers pathosystèmes ont permis d'identifier des QTL de résistance, leur exploitation en sélection reste difficile du fait de la complexité des déterminismes génétiques et de l'instabilité de leurs effets, en partie due à leurs interactions avec le fonds génétique.

Par ailleurs, peu de connaissances ont été acquises sur les modes d'action des QTL de résistance chez les plantes et spécialement pour les pathogènes racinaires (Richardson et al. 2006). De plus, l'effet du cumul de QTL de résistance agissant sur des étapes différentes du cycle de développement des populations de pathogènes afin d'augmenter le niveau de résistance des plantes est relativement peu connu à ce jour (Caranta et al. 1997; St Clair 2010). Une meilleure connaissance des modes d'action des QTL, *i.e.* l'identification des étapes du cycle infectieux sur lesquelles ils agissent, permettrait d'optimiser les stratégies de combinaison et de déploiement des locus de résistance afin d'augmenter les niveaux de résistance chez les plantes et de préserver l'efficacité de la résistance en limitant l'adaptation des populations pathogènes.

La pourriture racinaire précoce, due à l'oomycète tellurique *Aphanomyces euteiches*, est l'un des principaux facteurs limitant le développement de la culture du pois protéagineux dans de nombreux pays du monde. En France, depuis le début des années 1990, la maladie occasionne d'importantes pertes de rendements sur pois protéagineux (*Pisum sativum*), pouvant aller jusqu'à la perte totale d'une parcelle. Il est aujourd'hui admis que la combinaison de différentes méthodes de lutte, incluant la lutte génétique comme composante incontournable, sera à terme le seul moyen de gérer la maladie. Il n'existe aucune variété de pois résistante à

la maladie commercialisée à ce jour. Des lignées de pois américaines ont été identifiées comme présentant une résistance génétique à *A. euteiches* efficace en France, de niveau partiel et contrôlée par un grand nombre de QTL (Hamon et al. 2011; 2013; Pilet-Nayel et al. 2005). Les principaux QTL sont en cours d'intégration dans les schémas de sélection pour faciliter l'inscription prochaine des premières variétés de pois partiellement résistantes à *A. euteiches*.

Un programme de validation et de cumul de QTL de résistance à *A. euteiches* et d'identification de gènes candidats sous-jacents aux principaux QTL a été engagé à l'INRA, en vue de soutenir la création de variétés résistantes. Ce programme s'appuie sur un matériel quasi-isogénique aux QTL, créé précédemment dans un programme de Back-cross assisté par marqueurs. Il est adossé au projet Investissement d'avenir ANR-PEAMUST (2012-2019) qui vise à développer de nouvelles variétés de pois pour stabiliser le rendement et la qualité des graines, dans le contexte du changement climatique et de la réduction de l'utilisation des pesticides. Cette thèse s'intègre dans ce programme avec, pour objectifs, de déterminer les effets des principaux QTL de résistance à *A. euteiches*, seuls ou en combinaison, sur le niveau de symptômes de la maladie et de connaître leurs modes d'action sur les étapes du cycle infectieux de l'agent pathogène, en vue d'augmenter les niveaux de résistance.

Ce manuscrit de thèse se compose de cinq chapitres. Le chapitre I est une synthèse bibliographique qui dresse un état de l'art sur le sujet d'étude et replace ce projet dans son contexte. Le chapitre II présente la création de lignées quasi-isogéniques (NILs) aux QTL de résistance et leur évaluation pour la résistance à *A. euteiches* en conditions contrôlées. Le chapitre III présente une caractérisation fine du génome des NILs, réalisées à l'aide d'une puce 15k SNPs et montre les résultats d'évaluation au champ acquis sur l'ensemble des NILs. Ces 2 chapitres apportent des réponses sur l'efficacité des QTL de résistance dans différents fonds génétiques et permet d'identifier des combinaisons d'intérêt pour augmenter les niveaux de résistance partielle. Dans le chapitre IV, les NILs sont évaluées pour leur résistance à deux phases principales du cycle infectieux d'*A. euteiches* afin d'identifier les modes d'action des chaque QTL, seuls ou en combinaisons sur ces étapes. Enfin, le chapitre V résume et discute de l'ensemble des résultats apportés par ce travail et présente des perspectives de poursuite.

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

CHAPITRE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. LA RESISTANCE GENETIQUE DES PLANTES

1.1. LES DIFFERENTS TYPES DE RESISTANCE GENETIQUE

Les plantes sont exposées à un grand nombre d'agents pathogènes et ravageurs dans leur environnement, tels que les champignons, les bactéries, les virus ou encore les insectes. L'utilisation de plantes résistantes à ces agents pathogènes a un effet considérable sur la dynamique et l'évolution des populations pathogènes (McDonald and Linde 2002; Mundt 2002). Deux catégories de résistance ont historiquement été distinguées selon les généticiens : la résistance qualitative et quantitative (Ainsworth 1981; Van der plank 1968).

La résistance qualitative est contrôlée par un seul ou quelques gène(s) dit(s) « gène(s) R » (contrôle mono-ou oligo-génique). Elle confère le plus souvent à la plante une résistance complète vis-à-vis d'un agent pathogène. Celui-ci est bloqué dès les étapes précoces de l'infection et ne provoque alors pas de dégâts. Cette résistance est souvent associée à des symptômes d'hypersensibilité (HR) et déclenchée par des molécules manipulant la structure ou les fonctions cellulaires de l'hôte appelées effecteurs ou facteurs d'avirulence (Greenberg and Yao 2004).

La résistance quantitative est contrôlée par un grand nombre de gènes (résistance polygénique) associés à des portions de génome ou QTL (Quantitative Trait Loci) contribuant à l'expression de la résistance. Elle confère le plus souvent à la plante une résistance partielle vis-à-vis d'un agent pathogène car les défenses de la plante n'empêchent pas totalement la progression de la maladie. Celui-ci n'est donc pas bloqué mais seulement ralenti dans sa progression, ce qui provoque quelques dégâts visibles sur les plantes.

Une grande diversité de termes a été utilisée pour différencier ces deux types de résistance comme : horizontal/vertical ; complète/incomplète ; gène-majeur/gène-mineur ; spectre étroit/large spectre ou encore totale/partielle. Cette diversité des termes reflète l'intérêt et les hypothèses de recherche faites par les auteurs, mais il ajoute également un élément de confusion à la littérature parce que certains termes sont utilisés de différentes façons par différents auteurs. Dans ce manuscrit, nous utiliserons les termes résistance « qualitative » et résistance « quantitative » pour différencier les deux types de résistance selon leur déterminisme génétique, ainsi que les termes « gènes R » en référence à des gènes associés à la résistance qualitative et « QTL de résistance » en référence à des régions génomiques

associées à la résistance quantitative. La relation entre le niveau d'effet et le déterminisme génétique de ces deux types de résistance n'est pas toujours claire. Dans certains pathosystèmes, des QTL peuvent avoir un effet fort et, à l'inverse, certains auteurs ont aussi identifié des gènes R à effets partiels (Blein et al. 2009; Peressotti et al. 2010; Poland et al. 2009). Comme proposé par Poland et al. (2009), un continuum existe entre la résistance totale (sans maladie) et la sensibilité du génotype (mort de la plante), avec les gènes R se situant préférentiellement au niveau de la résistance totale et les QTL étant localisés tout le long du continuum de résistance.

1.2. DURABILITE DES RESISTANCES GENETIQUES

1.2.1. DEFINITION

L'utilisation des résistances génétiques peut conduire à une « course aux armements » entre l'agent pathogène et la plante, ce qui a conduit Johnson (1984) à proposer le concept de durabilité des résistances. Une résistance est durable si elle est efficace pendant une longue période, sur de grandes surfaces cultivées et dans des conditions favorables au développement de l'agent pathogène. Cette définition reste relativement confuse car chacun peut avoir une vision différente de la notion de temps et d'espace qu'elle engendre. Ainsi, on peut considérer qu'une résistance est durable si elle reste efficace tout au long de sa durée d'exploitation dans les variétés qui la portent (van den Bosch and Gilligan 2003).

1.2.2. EVOLUTION DES POPULATIONS PATHOGENES

L'évolution des populations pathogènes est la principale limite à l'utilisation des résistances génétiques. L'introduction d'un ou plusieurs gène(s) de résistance à une maladie va induire une pression de sélection sur l'agent pathogène ciblé. Or ce dernier, en fonction de son potentiel adaptatif, va pouvoir contourner les défenses mises en place par la plante. Ainsi, de bonnes connaissances des caractéristiques des populations parasites (mode de reproduction, structuration de la variabilité génétique, taux de multiplication, mode de dispersion, etc.) sont indispensables afin de mieux gérer les risques de contournement des résistances de la plante. Ces populations se caractérisent par leur virulence, c'est-à-dire leur capacité à infecter un hôte, et leur agressivité, c'est-à-dire la quantité de maladie qu'elles produisent sur une plante hôte en situation compatible. L'apparition d'une population virulente viable vis-à-vis de la résistance d'une plante, peut résulter de plusieurs mécanismes possibles, comme la mutation, la recombinaison, la dérive génétique, la migration ou encore la sélection. La majorité des cas de contournement peuvent avoir lieu quelques années seulement après le déploiement des gènes de résistance dans les cultures.

Contournement d'une résistance qualitative

Erosion d'une résistance quantitative

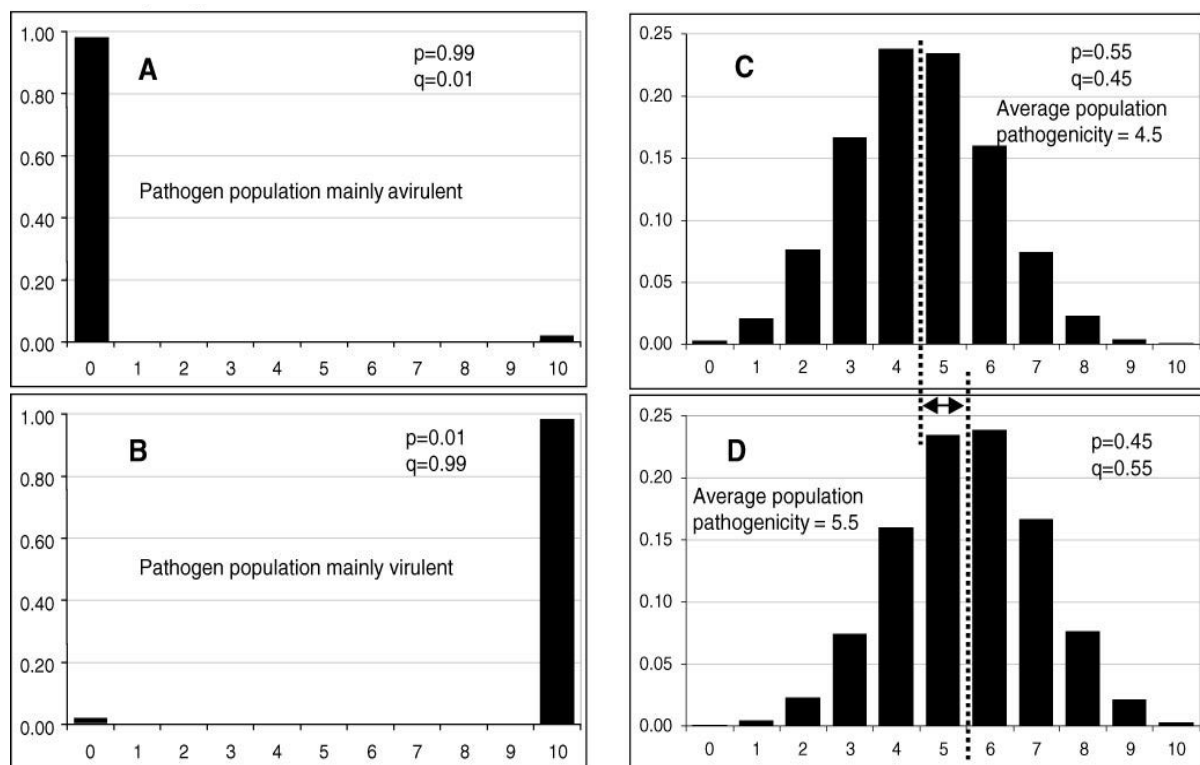


Figure 1 : Changements des fréquences des phénotypes dans les populations de pathogènes associés au contournement de la résistance qualitative apportée par un gène R (A et B) et à l'érosion de la résistance quantitative apportée par un QTL (C et D), d'après McDonald et Linde (2002).

A et B montrent le contournement d'une résistance qualitative, caractérisé par l'évolution rapide de l'avirulence vers la virulence d'une population pathogène à l'égard d'une population végétale porteuse d'un gène R. C et D montrent l'érosion de la résistance quantitative, caractérisée par une augmentation progressive de la pathogénicité de l'agent pathogène à l'égard d'une population porteuse d'un QTL.

1.2.3. LIEN ENTRE DURABILITE ET RESISTANCES GENETIQUES

Les résistances qualitatives reposant sur un seul gène R sont le plus souvent peu durables car il suffit d'une mutation de l'allèle correspondant au gène d'avirulence chez l'agent pathogène pour contourner la résistance (Figure 1). Le caractère éphémère de la résistance qualitative a été mis en évidence par de nombreuses études (Brown et al. 2015). Ainsi, Stokstad (2007) a identifié une nouvelle souche de la rouille noire du blé, virulente sur les cultivars portant des gènes R. Peressotti et al. (2010) ont également décrit une nouvelle souche de *Plasmopara viticola* capable de contourner le gène majeur de résistance *Rpv3* chez la vigne. Néanmoins, si la mutation entraîne une diminution suffisamment forte de la fitness de l'agent pathogène, cette résistance peut se révéler durable. Des exemples de résistances qualitatives durables ont surtout été rapportés pour les virus (Garcia-Arenal and McDonald 2003; Goulden et al. 1993; Kang et al. 2005) mais aussi chez les champignons, par exemple, pour le gène *Rx-1* de résistance de la pomme de terre au Potato virus X (Lecoq et al. 2004) ou le gène *Mlo* de résistance de l'orge à *Blumeria graminis* (Jorgensen 1992).

La nature polygénique de la résistance quantitative chez les plantes implique que l'agent pathogène puisse accumuler plusieurs mutations pour pouvoir se développer (Mundt 2014). De plus, l'effet partiel de la résistance quantitative sur la diminution de la sévérité de la maladie, ainsi que son spectre d'action supposé plus large, imposent une pression de sélection moins forte sur l'agent pathogène. Le terme « d'érosion » de la résistance quantitative a donc été employé à la place du terme « contournement » pour distinguer l'évolution des populations pathogènes vis-à-vis de cette résistance en comparaison à la résistance qualitative [Figure 1, (McDonald and Linde 2002; Poland et al. 2009)]. Toutefois, la vitesse et les mécanismes d'adaptation d'une population pathogène à une résistance quantitative ne sont pas connus. En comparaison aux résistances qualitatives, l'observation expérimentale des populations de pathogènes contournant les résistances quantitatives sont rares, mais aussi plus difficiles à détecter (McDonald and Linde, 2002). Néanmoins, des expériences de cycles successifs ont démontré une adaptation de l'agent pathogène à la résistance quantitative pour l'oïdium de l'orge (Villareal and Lannou 2000), le virus de la jaunisse naissante (BYDV) chez l'orge (Chain et al. 2007) et le virus de la pomme de terre (PVY) chez le piment (Montarry et al. 2012). Malgré cela, les résistances quantitatives n'en restent pas moins considérées à ce jour comme plus durables que les résistances qualitatives, bien que présentant un effet partiel (Palloix et al. 2009).

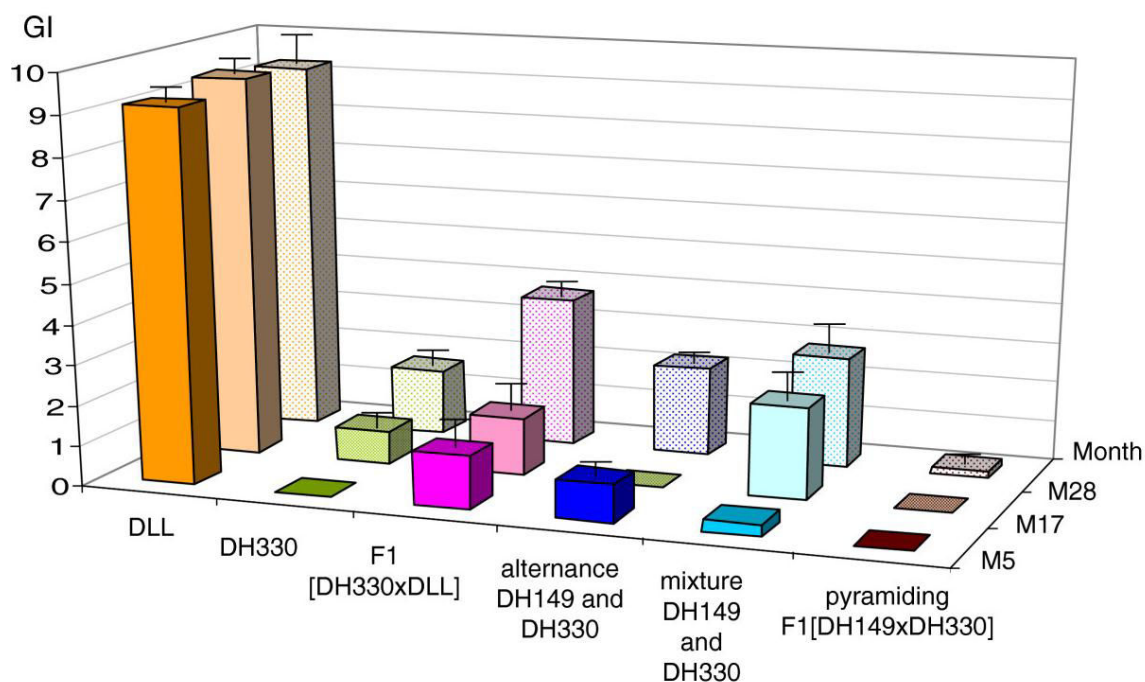


Figure 2 : Comparaison de trois stratégies de gestion des gènes de résistance du piment (*Capsicum annuum*) au nématode (*Meloidogyne incognita*), d'après Dijan-Caporalino et al. (2014).

L'indice de la maladie (GI) a été vérifié au 5^{ème} (M5), 17^{ème} (M17) et 28^{ème} (M28) mois pour le mélange, l'alternance et le pyramidage de différents gènes R. DLL est le cultivar sensible servant de contrôle, DH149 et DH330 sont les 2 cultivars résistant possédant le gène Me3 et Me1, respectivement.

1.2.4. STRATEGIES DE GESTION DES RESISTANCES GENETIQUES

Afin d'augmenter la durabilité des résistances, certains auteurs ont proposé une stratégie consistant à combiner les résistances quantitative et qualitative, ce qui a permis par exemple de préserver la durabilité de la résistance qualitative au PVY chez le piment (Palloix et al. 2009). Le même résultat a été obtenu dans un système conduit pendant 8 ans en plein champ infesté par *Leptosphaeria maculans* chez le colza (Delourme et al. 2014). D'autres études ont également montré que le fonds génétique de la plante affectait la durabilité d'un gène R comme chez la pomme de terre et le piment en réponse aux nématodes (Barbary et al. 2014; Fournet et al. 2013).

La gestion du déploiement des résistances dans l'espace et dans le temps couplée à une conduite appropriée des cultures, permettrait également de prolonger la durabilité des résistances, en diminuant la taille des populations pathogènes (Mundt et al. 2002; 2014; Sapoukhina et al. 2009).

Il existe quelques résultats expérimentaux de comparaison de différentes stratégies de gestion des gènes R. Par exemple, dans l'interaction piment/nématodes, il a été montré que le pyramidage, et dans une certaine mesure l'alternance de différents gènes R, présentent une efficacité pour limiter la maladie, alors que le mélange de cultivars possédant différents gènes R permet à la population de l'agent pathogène de se développer [Figure 2, (Djian-Caporalino et al. 2014)].

Dans certains pathosystèmes, seules des sources de résistance quantitative sont disponibles pour lutter contre un agent pathogène. Il a alors été suggéré que le spectre d'action des QTL pouvait être un déterminant important de la durabilité des résistances quantitatives. Le Van et al. (2013) ont démontré que les pressions exercées par les QTL pouvaient être différentes selon leur spectre d'action. Ils ont alors proposés deux stratégies possibles visant à réduire l'érosion de la résistance quantitative, qui ont consisté à i) cumuler des QTL à large spectre d'action, ou ii) combiner des QTL à spectres d'action différents. D'autres études ont aussi montré qu'une adaptation à des traits quantitatifs pouvait s'opérer assez rapidement au sein des populations pathogènes (Chin and Wolfe 1984; Pariaud et al. 2009a; Villareal and Lannou 2000). Cela a conduit à l'hypothèse que l'utilisation de QTL à modes d'action distincts sur différentes étapes du cycle d'un agent pathogène, telles que la période de latence, la colonisation ou encore la sporulation, pourrait améliorer la durabilité de la résistance quantitative et ceci quels que soient les gènes sous-jacents (Azzimonti et al. 2013). La compréhension des effets individuels ou combinés des QTL de résistance, ainsi que de leurs

mécanismes sous-jacents et modes d'action sur les agents pathogènes, constituent des axes de recherche primordiaux pour mieux développer des stratégies de gestion durable des résistances quantitatives.

1.3. DISSECTION GENETIQUE DE LA RESISTANCE QUANTITATIVE

1.3.1. IDENTIFICATION DE QTL DE RESISTANCE

La détection de QTL de résistance met en regard, dans une population végétale, une variabilité génétique, représentée par les allèles présents à des marqueurs moléculaires ou morphologiques balisant une carte génétique, et une variabilité phénotypique, observée pour la résistance à un agent pathogène.

Les marqueurs moléculaires

L'essor des marqueurs moléculaires au cours des 30 dernières années a permis de détecter du polymorphisme au niveau de l'ADN, basé sur la présence ou l'absence de sites de restriction (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) et la longueur de fragments amplifiés (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) ou de séquences répétées (Single Sequence Repeat, SSR). Ces outils ont permis le développement des méthodes de cartographie de QTL (Paterson et al. 1988). Les progrès réalisés, par la suite, dans le séquençage de l'ADN ont généré l'identification de marqueurs de type SNP (Single-Nucleotide Polymorphism), révélant un polymorphisme au niveau d'un seul nucléotide. Les SNPs sont généralement bi-alléliques et sont présents en très grand nombre dans les génomes (des milliers à des millions de SNPs sont disponibles pour de nombreuses espèces). Les SNPs sont ainsi devenus rapidement les marqueurs les plus couramment utilisés pour leur grande quantité disponible et leur révélation automatique. Aujourd'hui, les progrès technologiques dans le séquençage à haut débit du génome (NGS, Next Generation Sequencing) permettent de produire des millions de séquences à faible coût. Récemment, l'approche de génotypage par séquençage [GBS, Genotyping By Sequencing, (Elshire et al. 2011)] a été décrite pour la découverte de SNPs et leur génotypage simultané dans le matériel séquencé. Ainsi, Elshire et al. (2011) ont rapporté avoir génotypé plus de 25 000 marqueurs SNP dans une population biparentale de lignées de maïs. Chez l'orge et le blé, plus de 34 000 et 20 000 marqueurs SNP ont été obtenus par l'approche GBS, respectivement (Poland et al. 2012).

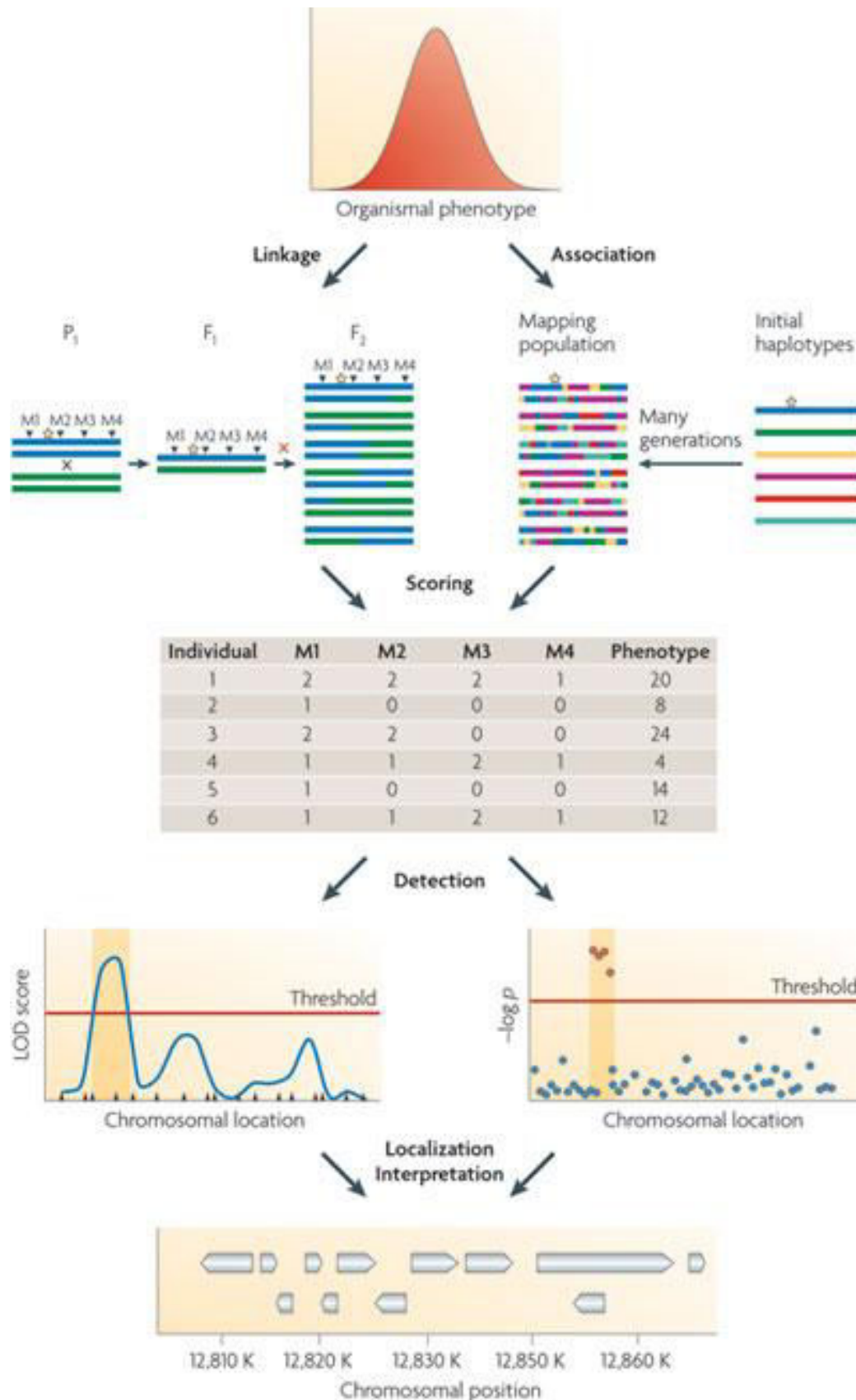


Figure 3 : Principe de la cartographie d'un QTL par l'analyse de liaison génétique et l'analyse par association, d'après Mackay et al. (2009).

Le phénotypage de précision

Le phénotypage de populations végétales pour la résistance aux maladies a été pendant longtemps essentiellement basé sur des tests pathologiques utilisant des échelles de notation de la sévérité de symptômes, en conditions contrôlées ou au champ. Récemment, des méthodes de phénotypage automatisées ont été développées, permettant une évaluation fine et/ou haut-débit de différents caractères chez les plantes, en particulier de symptômes ou de caractères indirectement corrélés à une maladie (Fahlgren et al. 2015; Furbank and Tester 2011).

Ainsi, les méthodes de phénotypage haut-débit « à base d'images », telles qu'utilisées par exemple pour analyser les symptômes de la maladie causée par *Z. tritici* (Stewart and McDonald 2014), offrent une large gamme d'avantages pour compléter les données obtenues par les tests pathologiques. Elles sont non destructives, ce qui signifie que les données phénotypiques peuvent être collectées à partir d'une même plante au cours de l'expérimentation. Elles se prêtent également à l'automatisation, ce qui rend possible d'étudier de grandes tailles d'échantillons pour augmenter la puissance statistique des analyses. Elles permettent de détecter la répartition spatiale de l'hétérogénéité et de visualiser des réponses localisées, qui peuvent être particulièrement importantes dans l'étude des interactions plante-pathogène (Mutka and Bart 2015). Elles permettent de recueillir des données qui ne peuvent être visualisées avec l'œil humain (Kuska et al. 2015). Ces méthodes permettent aussi de visualiser l'architecture d'un couvert, d'une plante ou même les racines (Prashar et al. 2013; Topp et al. 2013). Ces méthodes peuvent être mises en place dans une serre équipée de systèmes automatisés ou les plantes sont déplacées par des robots pour être arrosées, pesées et prises en photo. Ces systèmes permettent d'homogénéiser les mesures et d'augmenter le nombre de plantes phénotypées. Les photos peuvent être réalisées à l'aide de différents appareils comme les caméras infrarouges, les spectroscopes, la télédétection par laser (Lidar), l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), l'Imagerie Hyper Spectrale (HSI), l'imagerie 3D ou encore l'Imagerie thermique.

Grâce à la mise en place des plates-formes de phénotypage haut-débit, un grand nombre de locus de traits d'intérêt pourront ainsi être détectés avec précision (Yang et al. 2014). En France, le projet PHENOME a été récemment élaboré pour permettre le développement de méthodologies et d'analyse de données de phénotypage haut-débit afin d'acquérir des données quantitatives précises et reproductibles, au sein d'un réseau de neuf plates-formes de phénotypages (<https://www.phenome-fppn.fr>).

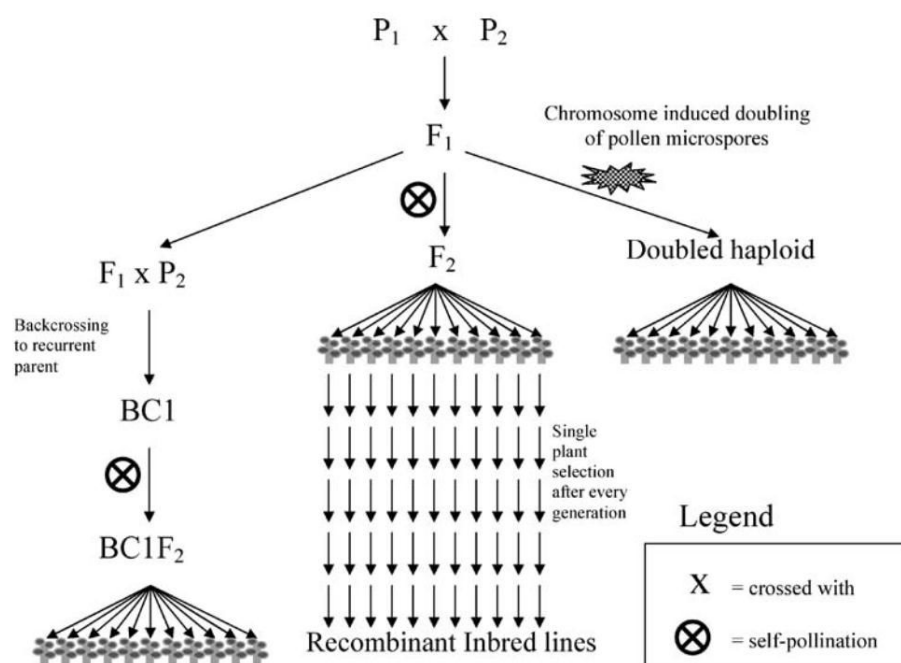


Figure 4 : Principaux types de population biparentale pour l'analyse de liaison, d'après Collard et al. (2005).

La détection de QTL

Deux grands types d'approches ont été développés pour détecter des QTL à partir de données de génotypage apportées par les marqueurs et de phénotypage obtenues dans des populations végétales (Figure 3).

La première approche est **l'analyse de liaison génétique** qui est fondée sur l'analyse de la co-ségrégation entre le phénotype d'intérêt et les allèles au locus considéré. Cette analyse, dans la majorité des cas, a été réalisée à partir de populations biparentales (Figure 4), dont les parents ont été choisis pour leur divergence pour le caractère étudié. Cependant, des analyses ont aussi été réalisées à partir de populations multi-parentales connectées, issues de croisements présentant des parents communs. Les données de génotypage obtenues sur ces populations permettent la construction de cartes génétiques, représentant l'ordonnancement des marqueurs les uns par rapport aux autres sur des groupes de liaison. Dans ces populations, l'association non aléatoire entre deux allèles à différents locus (appelée déséquilibre de liaison, DL) est représentative du taux de recombinaison entre les marqueurs. Les méthodes statistiques simples telles que l'analyse de variance (Anova) ont ouvert la voie au développement de méthodes de détection de QTL plus fines intégrant les informations disponibles au niveau de chaque marqueur [Interval Mapping : IM, Composite Interval Mapping : CIM, Multiple Interval Mapping : MIM ; (Doerge 2002)]. La méta-analyse de QTL a également été développée pour synthétiser les résultats de détection des QTL, sur la base des marqueurs communs entre les cartes génétiques (Veyrieras et al. 2007). Elle permet d'obtenir des méta-QTL à intervalles de confiance plus petits, de distinguer la pléiotropie (qui détermine plusieurs caractères) de la liaison génétique proche (Li et al. 2014; Shi et al. 2009) dans les zones de co-localisation de QTL. Différents facteurs peuvent influencer la détection de QTL, comme la taille et le type de la population, la densité et la couverture en marqueurs des cartes génétiques, le seuil de détection (LOD seuil) ou le test phénotypique choisi (Holland 2007; Jannink et al. 2009).

La deuxième approche est **l'analyse par association** qui est fondée sur les analyses des associations préférentielles entre le polymorphisme allélique à un gène ou aux marqueurs en DL à ce gène et la variabilité phénotypique pour un caractère d'intérêt, dans des populations végétales non apparentées ou « naturelles » (Gupta et al. 2014). Avec le développement de marqueurs à haute densité, cette approche a été récemment appliquée au génome entier, faisant l'objet d'études dites « GWAS » (Genome-Wide Association Studies). Cette approche présente l'avantage d'être plus résolutive que l'analyse de liaison, en exploitant des

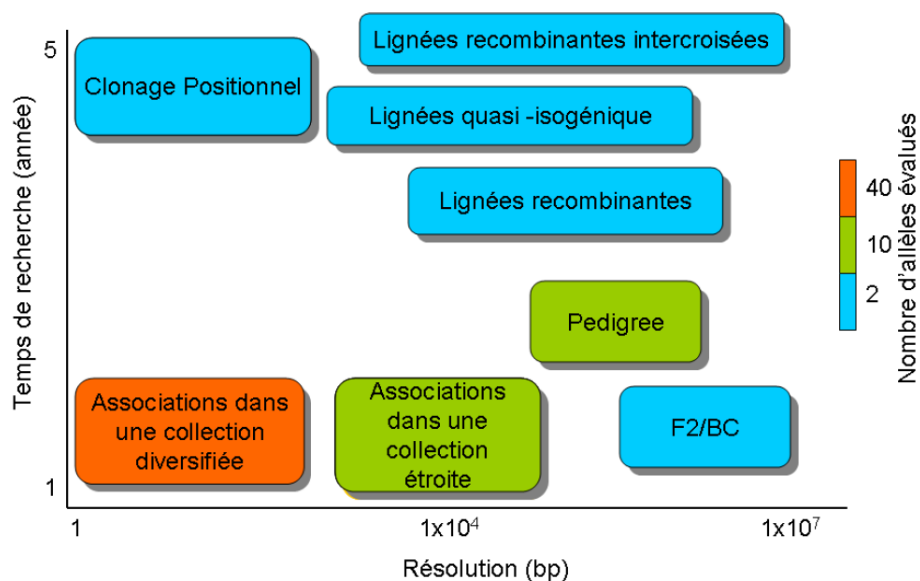


Figure 5 : Comparaison schématique des différentes méthodes de cartographie en termes de résolution, de temps de recherche et du nombre d'allèles détectables, d'après Yu et Buckler (2006) et Ranc N (2010).

BC= Back-Cross

Tableau 1: Comparaison des avantages et des limites des populations RIL, MAGIC et GWAS, d'après Pascual et al. (2015).

	RIL	MAGIC	GWAS
Temps de développement	Intermédiaire	Long	Court
Précision dans la cartographie dans allèles communs	+	++	+++
Précision dans la cartographie des allèles rares	+++	+	-
Nombre de recombinaisons	+	++	+++
Nombre de marqueurs nécessaire	+	++	+++
Structure de la population	no	no	+
Principaux avantages	Cartographie d'allèles rares Analyse facile	Plusieurs allèles en ségrégation Fondateur pour la SAM	Précision due à la recombinaison historique
Principales limites	Grands intervalles de confiance de QTL	Temps de mise en place de la population	Haut DL limite la précision Structure de la population responsable de faux positif

recombinaisons historiques dans les populations naturelles ou les collections. Les associations peuvent être fictives car basées sur le DL qui dépend non seulement de la liaison entre locus mais aussi de la structuration et de l'apparentement entre individus de la population. Les méthodes statistiques développées permettent de prendre en compte ces effets et limiter la détection de faux-positifs. Par ailleurs, l'analyse d'association n'est souvent pas suffisamment puissante pour détecter des allèles en fréquence rare. La composition et la taille de la population peuvent être choisis, afin de limiter les allèles rares et d'augmenter la puissance de détection (Figure 5).

Des approches d'analyse conjointe de liaison et d'association, encore nommées LD-LA (Linkage Disequilibrium-Linkage Association), ont été développées pour intégrer les avantages des deux approches, afin d'augmenter la précision de localisation et la puissance de détection des locus (Yu et al. 2006). Ces approches utilisent des populations de lignées recombinantes issues de dispositifs multi-parentaux de type NAM [Nested Association Mapping, (Yu et al. 2008)] ou MAGIC [Multiple Advanced Generation Intercross, (Kover et al. 2009)] pour lesquelles les parents sont connus. La comparaison des différentes approches est présentée dans le Tableau 1.

1.3.2. LES QTL DE RESISTANCE AUX MALADIES

Architecture génétique de la résistance quantitative

De nombreux QTL de résistance aux maladies ont été identifiés chez les plantes depuis une vingtaine d'années, en utilisant différentes approches. Les synthèses recensant les études d'identification de QTL de résistance sont rares car fastidieuses. Wilfert et Schmid-Hempel (2008) ont analysés 194 publications décrivant un total de 445 QTL de résistance à divers bio-agresseurs chez les plantes. Le nombre moyen de QTL identifié dans ces publications est de 3.24 QTL et la variance individuelle de chaque QTL est en moyenne de 16,7%. Cependant, lorsque les expériences d'identification de QTL sont répétées en utilisant différents génotypes hôte ou bio-agresseurs dans des conditions identiques, l'architecture génétique sous-jacente à la résistance peut varier considérablement, impliquant d'autres QTL et des interactions épistatiques. Ces dernières années, les études d'identification de QTL ont permis d'apporter davantage de vision sur leur diversité et organisation génomique intra- et inter-espèces par méta-analyse et cartographie comparée, ainsi que davantage de précisions sur leurs intervalles par cartographie fine.

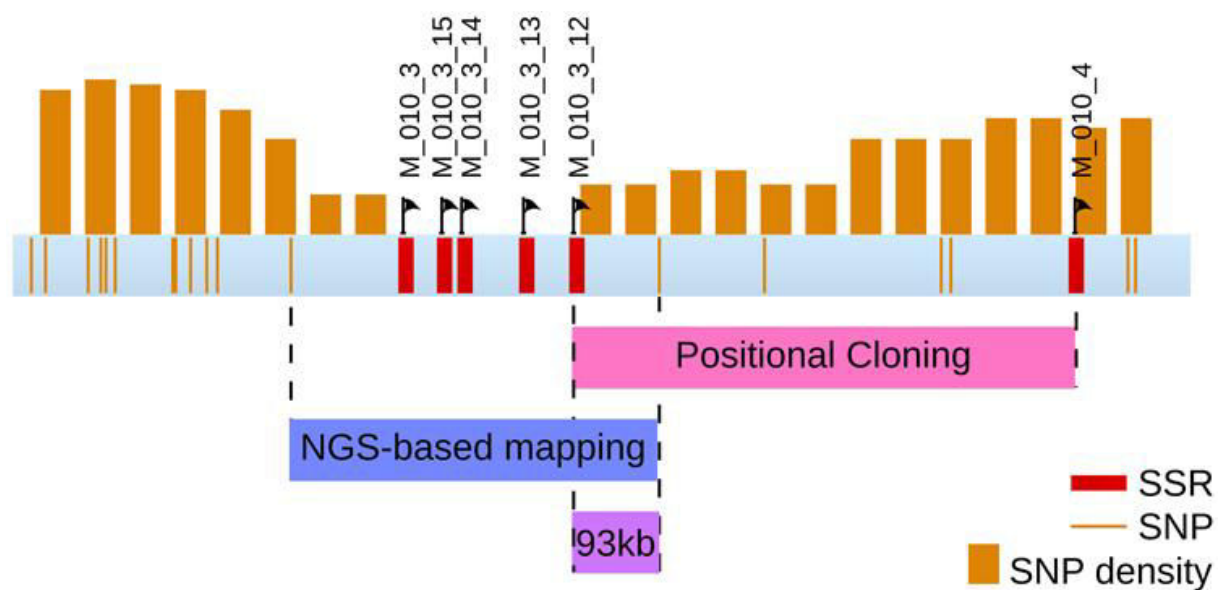


Figure 6 : Association d'une approche de clonage positionnel et de densification en marqueur grâce à la méthode NGS pour réduire l'intervalle de confiance du QTL à 93kb contenant seulement 12 gènes, d'après Billoud et al. (2015).

Diversité et organisation génomique des QTL de résistance

La méta-analyse de QTL/gènes de résistance à de multiples bio-agresseurs a été réalisée chez plusieurs espèces, montrant que les QTL de résistance pouvaient être distribués sur tout le génome. Chez le riz, cette analyse a notamment permis d'identifier des co-localisations de QTL et de gènes R de résistance à *Magnaporthe oryzae* ainsi qu'un choix de QTL intéressants pour les programmes de sélection futurs (Ballini et al. 2008). Chez les Solanacées, plusieurs études de cartographie comparée de QTL de résistance chez la pomme de terre, la tomate et le piment ont permis de mettre en évidence une conservation de la position des QTL majeurs à différents bioagresseurs (Grube et al. 2000; Leister et al. 1996; Pan et al. 2000). Dans une étude récente, Fomeju et al. (2014) ont démontré qu'une forte part des régions génomiques associées à la résistance quantitative du colza au phoma correspondaient à des régions homéologues dupliquées de différents blocs synténiques d'*A. thaliana*.

Cartographie fine et clonage de QTL

La cartographie fine de QTL de résistance aux maladies a récemment fait l'objet d'un nombre croissant d'études ces dernières années (Balkunde et al. 2013; Brouwer and St Clair 2004; Ding et al. 2011; Ngu et al. 2014; Zhong et al. 2014) mais un très faible nombre de ces QTL a été cloné (Cook et al. 2012; Fukuoka et al. 2012; Hurni et al. 2015; Wang et al. 2014). Elle a utilisé des approches d'identification et de caractérisation d'individus recombinants au QTL et/ou de génétique d'association. L'identification d'individus recombinants est réalisée à partir d'une population « pseudo-F2 » ségrégeant uniquement dans la région du QTL. Les individus recombinants sont alors génotypés finement et phénotypés, afin d'identifier la zone réduite du QTL par association marqueur-phénotype. Lorsque la taille de la zone du QTL est suffisamment réduite, mais le génome de la lignée porteuse du QTL n'est pas séquencé, l'assemblage de séquences d'ADN clonés (principalement de type BAC) peut permettre de construire une carte physique de la région afin d'identifier les gènes candidats. L'étape ultime est la validation fonctionnelle de gènes candidats, qui permet d'identifier le gène responsable de la variation quantitative. Cette approche de clonage positionnel est lourde et longue à mettre en œuvre du fait des intervalles de QTL parfois très longs (plusieurs dizaines de cM). Elle nécessite souvent la densification en marqueurs de la zones de QTL, spécialement grâce aux méthodes GBS et/ou NGS [Figure 6, (Billoud et al. 2015)] mais aussi la cartographie comparée à des génomes des espèces modèles (Pottorff et al. 2014). La génétique d'association a permis également de réduire l'intervalle de confiance de QTL et d'identifier des gènes candidats sous-jacents à la résistance partielle (Zhao et al. 2015).

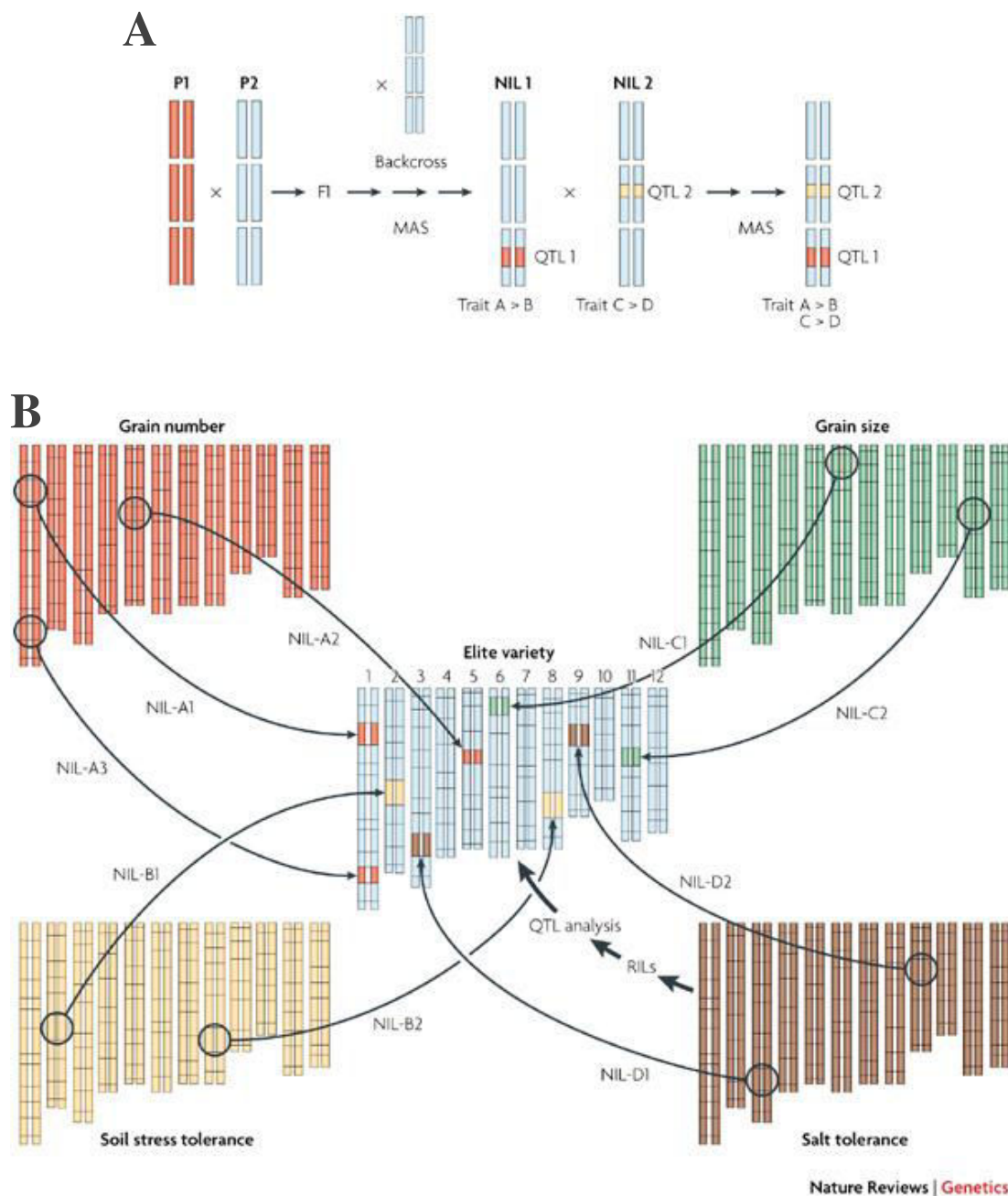


Figure 7 : Principe de la sélection assistée par marqueur (SAM), d'après Takeda et Matsuoka (2008).

A/ Méthode BAM ; Le parent résistant (P1) est croisé avec le parent sensible (P2) afin d'obtenir la F1. Ensuite plusieurs back-cross sont réalisés entre la F1 et le parent P2 afin d'obtenir des NILs possédant le QTL. B/ Pyramidage de plusieurs QTL dans une variété Elite.

1.4. UTILISATION DES QTL DE RESISTANCE EN SELECTION

Un grand nombre de QTL a été identifié dans différentes espèces végétales, mais très peu de publications décrivent leur utilisation dans les programmes de création variétale. St Clair (2010) a suggéré que ce constat était dû principalement à la quantité importante de QTL identifiés, au temps qu'il fallait pour générer une population améliorée et aussi aux résultats inattendus d'effets des QTL obtenus dans certains programmes d'introgression (Hospital 2005).

1.4.1. SELECTION ASSISTEE PAR MARQUEURS

Le principe de la sélection assistée par marqueurs (SAM) est basé sur l'exploitation du DL entre des marqueurs moléculaires et le QTL afin de pouvoir transférer celui-ci dans des lignées de sélection (dites « élites »). Par rapport à la sélection basée uniquement sur le phénotype, la SAM est sensée être plus rapide, fiable (si les marqueurs sont proches du gène d'intérêt), précise (marqueur présent ou absent), souple (besoin de peu de matériel) et peu onéreuse. Globalement, la SAM présente un réel avantage sur la sélection phénotypique si le coût du phénotypage est supérieur à celui du génotypage et si la variation expliquée par les marqueurs est élevée. Il a été montré que la SAM est plus efficace à court terme et moins à long terme car elle sélectionne davantage les QTL à effet fort que les QTL à effet faible (Hospital and Charcosset 1997).

Différents schémas de SAM ont été développés pour exploiter et cumuler des QTL de résistance chez les plantes, incluant la sélection précoce en F2 sur les haplotypes, le BAM (Back-cross assistée par marqueurs), le pyramidage de QTL ou la SRAM (Sélection récurrente assistée par marqueurs) (St Clair 2010). Les succès de la SAM déjà publiés jusqu'à présent ont été obtenus essentiellement à partir de la méthode BAM (Hospital 2009), consistant en une succession de rétrocroisements sur une même lignée parentale élite dite « receveuse » pour obtenir des lignées quasi-isogéniques (Near Isogenic Lines, NILs) (Figure 7). Ainsi, les NILs dérivées d'un schéma de rétrocroisement ne se distinguent les unes des autres que par leur(s) gène(s) ou segment(s) introgressé(s) issu(s) d'un parent dit « donneur », et fixé(s) à l'état homozygote. Elles présentent des génomes identiques en dehors des zones introgressées. La variabilité observée entre NILs pour un phénotype donné est donc attribuable au(x) segment(s) introgressé(s). Dans plusieurs études, les NILs ont été utilisées pour valider les effets de QTL de résistance détectés précédemment, ainsi que pour caractériser les phénotypes associés au segment génétique introgressé, comme chez la tomate (Brouwer and St Clair 2004), le blé (Ma et al. 2012), le riz (Zhang et al. 2006), l'orge

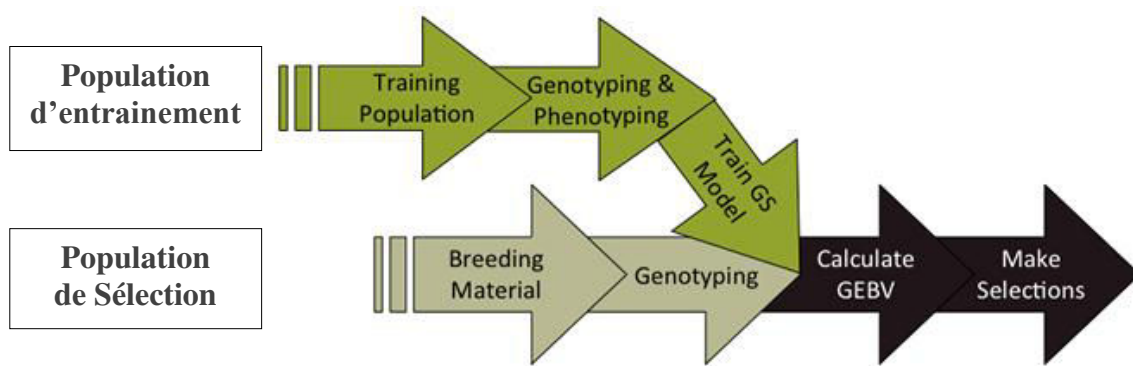


Figure 8 : Principe général de la sélection génomique, d'après Heffner et al. (2009).

Une population d'entraînement (ou calibration) est évaluée pour des caractères d'intérêt et génotypée avec des marqueurs moléculaires. L'analyse d'association marqueurs-phénotypes dans cette population permet de produire une équation de prédiction utilisée pour prédire la valeur phénotypique d'individus dans une population de sélection uniquement génotypés avec les marqueurs moléculaires.

(Schmalenbach et al. 2008), le pois chiche (Castro et al. 2010) et le colza (Delourme et al. 2008). Des NILs comportant un QTL introgressé à l'état hétérozygote ont également été exploitées pour générer, après une génération d'auto-fécondation des descendants « pseudo-F2 » au QTL. Ces populations sont utilisées pour identifier des individus recombinants permettant de réduire l'intervalle de confiance du QTL. La réduction de la taille d'un QTL introgressé permet d'identifier les marqueurs moléculaires plus fortement liés au QTL et de rompre des liaisons génétiques indésirables associées au QTL, pour optimiser l'usage du QTL dans les programmes de création variétale. La SAM peut aussi être la seule façon de sélectionner des combinaisons favorables de QTL à effets épistatiques, tel que démontré par Ahmadi et al. (2001) pour la résistance au virus de la marbrure du riz jaune. Cependant, différentes études ont également montré qu'après la SAM, l'effet d'un QTL pouvait être réduit ou voire même perdu. La perte des effets de QTL peut se produire lorsque le QTL i) est un faux positif, ii) est spécifique à certains environnements, iii) comprend plusieurs gènes dont les effets sont modifiés une fois introgressés iv) a un effet épistatique avec un autre QTL ou avec le fonds génétique ou v) n'est pas étroitement lié aux marqueurs moléculaire et donc est perdu suite à un événement de recombinaison (Collard and Mackill 2008; Hospital 2005; St Clair 2010). En conséquence, la validation des effets des QTL est une étape importante avant d'utiliser les QTL pour la création de nouvelles variétés résistantes.

1.4.2. LA SÉLECTION GÉNOMIQUE

Avec l'essor des technologies de séquençage NGS, la sélection génomique (SG) a été récemment développée comme une nouvelle approche pour améliorer la sélection d'allèles d'intérêt impliqués dans le contrôle des caractères complexes chez les plantes (Desta and Ortiz 2014; Jonas and de Koning 2013; Nakaya and Isobe 2012). Trois différences ont été mises en évidence entre la SAM et la SG : i) la SAM exploite des QTL précédemment détectés pour un phénotype d'intérêt alors que la SG ne se base pas sur une détection préalable de QTL; ii) les données génotypiques sur les individus sont uniquement nécessaires pour les régions ciblées par la SAM, tandis qu'elles sont obtenues sur le génome entier en SG; iii) les individus favorables sont sélectionnés sur la base de leur génotype aux marqueurs dans la SAM, alors qu'une prédiction de la valeur génétique des individus à partir de l'information des marqueurs couvrant tout le génome (dite Genomic Estimated Breeding Value, GEBV) est utilisée pour la SG. Le but de la SG est donc de prédire la valeur génétique d'un individu non phénotypé sur la base de son génotype, en se basant sur un panel d'individus de calibration et d'individus de validation permettant d'établir l'équation de prédiction (Figure 8). Plusieurs

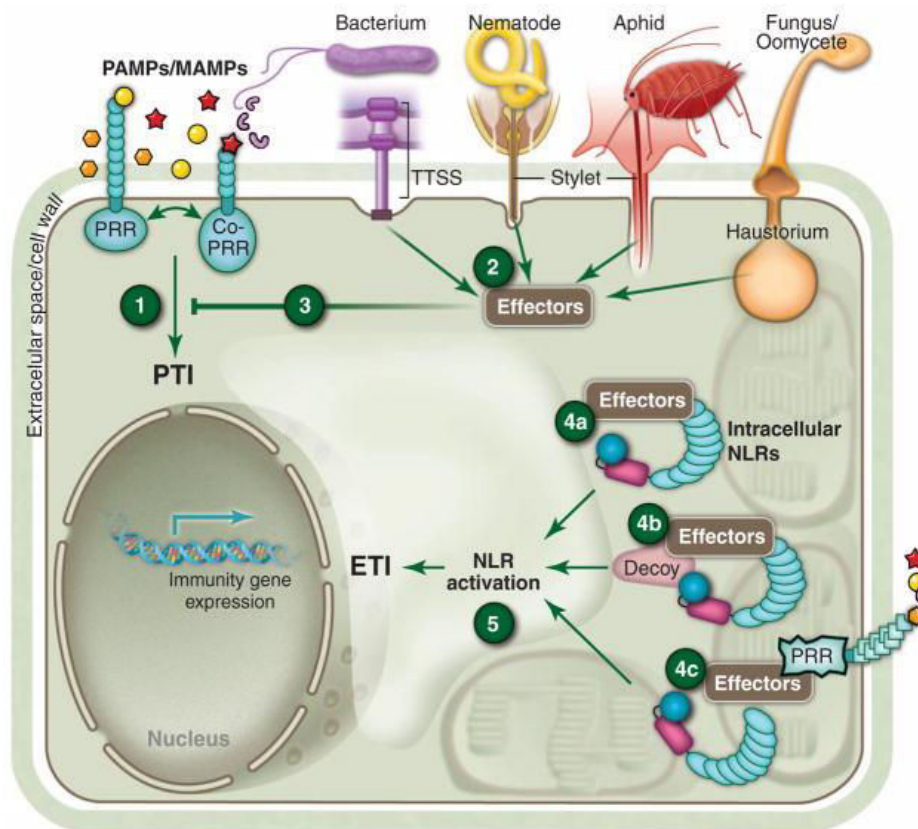


Figure 9 : Schématisation du système immunitaire de la plante, d'après Dangl et al. (2013)

Tout d'abord, les différents agents pathogènes expriment des PAMPs/MAMPs au moment de la colonisation de la plante. Les plantes les perçoivent via les PRR extracellulaires et initient une réponse de défense (PTI; étape 1). Les pathogènes vont émettre des effecteurs de virulence pour bloquer la perception des PAMPs/MAMPs (étape 2). Ces effecteurs sont adressés à des emplacements subcellulaires spécifiques où ils peuvent réprimer la PTI et ainsi faciliter la virulence (étape 3). La plante possède des récepteurs NLR intracellulaires qui peuvent reconnaître ces effecteurs de trois façons : i) modèle de reconnaissance directe (étape 4a); ii) modèle « du leurre » ou « Decoy Model » (étape 4b) et iii) modèle d'interaction indirecte (étape 4c). Une fois que la plante a reconnu un effecteur, elle déclenche une nouvelle immunité l'ETI.

approches statistiques ont été proposées pour la prédiction des estimations GEBV, comme la méthode BLUP [Best linear unbiased predictor, (Henderson 1975)] ou encore la méthode de régression Bayésienne (Gianola and Fernando 1986).

L'avantage majeur de la SG est l'accélération conséquente des schémas de sélection, par l'affranchissement d'étapes de phénotypage coûteuses et longues. De plus, la SG peut permettre de détecter des gènes à effets faibles qui ne peuvent être capturés par la SAM (Hayes et al. 2009). Ainsi, la SG est particulièrement adaptée à l'exploitation de locus à effets mineurs, qui ne représentent souvent qu'une part du déterminisme des résistances quantitatives. Cependant, de nombreuses études ont montré que la taille et la composition du panel de calibration, notamment l'apparement entre individus en calibration et individus prédits, ainsi que le DL entre SNPs et QTL, jouaient un rôle essentiel dans la qualité des prédictions des candidats à la sélection (Habier et al. 2007; 2010).

1.5. MECANISMES ET MODES D'ACTION ASSOCIES A LA RESISTANCE

Pour faire face aux différents agents pathogènes, les plantes ont développé un système d'immunité qui leur permet de réagir par une grande diversité de réponses inductibles. En effet, malgré l'existence de barrières constitutives (paroi végétale, métabolites secondaires antimicrobiens etc...), l'induction de défenses ciblées suite à l'infection est mise en place dans les interactions compatibles hôte-pathogène.

1.5.1. MECANISMES ASSOCIES AUX GENES R

La défense des plantes résulte de l'expression de la résistance basale et de la résistance spécifique (Boyd et al. 2013; Micheltore et al. 2013). Ces deux types de résistance ont été rassemblés dans un modèle multiphasique dit en « Zig-Zag » dans lequel la coévolution entre l'agent pathogène et la plante résulte dans des oscillations entre situation « sensible » et « résistante » selon que la plante est équipée ou non pour reconnaître le parasite et/ou que ce dernier est capable ou non de camoufler ses motifs reconnus ou d'inactiver les défenses de son hôte [Figure 9, (Dangl et al. 2013; Jones and Dangl 2006)].

La résistance basale est déclenchée par des récepteurs présents dans la membrane végétale (dits PRR, « Pattern Recognition Receptors ») capables de reconnaître des signaux moléculaires associés aux microbes ou agents pathogènes (dits MAMPs ou PAMPs « Micro-organism- ou Pathogen- Associated Molecular Patterns ») et d'induire des réponses de défense générales de la plante ou « PAMP-triggered immunity » (PTI). La flagelline (motifs peptidiques du flagelle des bactéries) ou encore la chitine (constituant des parois cellulaires chez les champignons) sont les PAMPs les plus connus. Afin de contourner cette résistance

basale, des agents pathogènes ont évolué pour libérer des effecteurs (dits ETS «Effector Triggered susceptibility »), qui vont supprimer la résistance basale et favoriser le développement de l'agent pathogène, résultant en une sensibilité de la plante.

La résistance spécifique est alors déployée, les plantes vont développer des mécanismes de reconnaissance des protéines effectrices, engendrant des réponses de défense de la plante appelées l'immunité déclenchée par des effecteurs (ETI, « Effector-Triggered Immunity ») (Jones and Dangl 2006; Tameling and Takken 2008). Très souvent, l'immunité ETI est à l'origine d'une réaction d'Hypersensibilité « HR » qui se caractérise par la mise en place d'une mort cellulaire au niveau de la zone infectée par l'agent pathogène et bloque sa progression au sein de la plante (Kombrink and Schmelzer 2001). Cette réponse de défense est régulée par des protéines codées par des gènes R. Depuis une quinzaine d'années, plus de 70 gènes R ont été clonés (Liu et al. 2007). La grande majorité de ces gènes R code pour l'une des cinq grandes classes de récepteurs intracellulaires dont la plus connue est représentée par les récepteurs de type Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat (NB-LRR ou NLR) (Dangl et al. 2013; Martin et al. 2003). Les mécanismes de la résistance spécifique répondent à trois modèles : le modèle d'interaction directe gène-pour-gène (Flor 1971), le modèle du Leurre (van der Hoorn and Kamoun 2008) et le modèle d'interaction indirecte (Bomblies and Weigel 2007; Dangl and Jones 2001).

1.5.2. MECANISMES DE RESISTANCE QUANTITATIVE

Les gènes sous-jacents aux QTL de résistance sont beaucoup moins connus et caractérisés que les gènes R. Peu de QTL de résistance ont été clonés à ce jour et ont montré une diversité de fonctions sous-jacentes (Niks et al. 2015). Les principaux QTL clonés par clonage positionnel sont *Lr34*, *Yr36*, *Pi21*, *Rhg1*, *Rhg4* et *Pi35*. Leurs fonctions identifiées sont diverses et incluent des protéines de transporteur ABC, de Kinase-START, une protéine riche en proline, une protéine tRNA^(HIS) guanylyltransferase, une sérine hydroxyméthyltransferase ou encore des protéines contenant un domaine NBS-LRR (Kou and Wang 2010; Michelmore et al. 2013; Niks et al. 2015). Ces résultats de clonage de QTL alimentent les hypothèses multiples synthétisées par Poland et al. (2009) sur la fonction des QTL de résistance. Ces hypothèses sont indépendantes mais il est possible que la résistance quantitative soit la résultante de plusieurs d'entre elles ainsi que d'autres hypothèses et mécanismes moléculaires non décrits à ce jour.

Hypothèse 1 : La résistance quantitative serait conditionnée par des gènes liés à la morphologie et au développement de la plante.

De nombreuses corrélations ont été décrites entre des caractères ou QTL de résistance et d'architecture et développement. Ainsi, les gènes R contrôlant, par exemple, la densité et/ou l'ouverture des stomates ont un effet important sur les traits morphologiques de la plante (Bradley et al. 2003; Melotto et al. 2006). Chez la pomme de terre, des co-localisations ont été observées entre des QTL de résistance à *Phytophthora infestans* et de nombreux caractères d'architecture ou de floraison (Calonnec et al. 2013 ; Collins et al. 1999). Chez le pois, des QTL de résistance partielle à *Didymella pinodes* ont été localisés dans les mêmes régions que des gènes contrôlant l'élongation des entre-nœuds (*Le*) et la sensibilité à la photopériode pour l'initiation de la floraison (*Hr*) (Giorgetti 2013).

Hypothèse 2 : Les QTL correspondraient à des mutations ou allèles de gènes impliqués dans la résistance basale de la plante.

Chez *Arabidopsis thaliana*, il a été mis en évidence que le gène de résistance basale « FLS2 » était impliqué dans la reconnaissance de la flagelline (un PAMP), protéine essentielle des bactéries. Des mutations dans ce gène semblent produire des effets quantitatifs sur la sévérité de la maladie et la colonisation bactérienne, qui sont accrus dans les tests en conditions naturelles (Zipfel et al. 2004).

Hypothèse 3 : Les QTL seraient impliqués dans la production de composés antitoxiques.

Les phytoalexines ont longtemps été reconnus comme des composés importants dans la protection des plantes aux maladies. Dans le pathosystème *Arabidopsis-Botrytis*, des études biochimiques ont montré que les taux de camalexine étaient corrélés au niveau de résistance quantitative, *i.e.* la diminution du taux de camalexine dans la plante provoquait une plus grande sensibilité vis-à-vis de l'agent pathogène (Denby et al. 2004).

Hypothèse 4 : Les QTL seraient impliqués dans la transduction du signal de défense des plantes

Chez *Arabidopsis thaliana* des mutants de facteurs de transcription (WRKY) impliqués dans les voies de signalisation régulées par l'acide salicylique et l'acide jasmonique, ont permis d'augmenter la sensibilité au pathogène nécrotrophe *Botrytis cinerea* (Qiu et al. 2007; Zheng et al. 2006). A l'inverse, une résistance accrue à *Pseudomonas syringe* pv *tomato* et *Peronospora parasitica* a été observée chez des mutants d'*A. thaliana* dans la protéine MAP kinase 4 (MPK4) (Petersen et al. 2000). Chez *A. thaliana*, le QTL RKS1 confère une

résistance à *Xanthomonas campestris* et correspond à une protéine kinase potentiellement impliquée dans la transduction de signaux (Huard-Chauveau et al. 2013).

Hypothèse 5 : Les QTL seraient des gènes R à effet faibles ou des gènes R contournés à un effet résiduel.

Plusieurs études ont mis en évidence des co-localisations entre des QTL et des gènes R contournés chez plusieurs espèces (Poland et al. 2009). Chez le riz, des substitutions dans le domaine LRR du gène *Xa21* ont conféré une résistance partielle à *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Wang et al. 1998). Chez le maïs, le QTL RCG1 a été identifié comme étant un gène de type NB-LRR impliqué dans la résistance partielle à l'anthracnose (Broglie et al. 2006). L'effet partiel d'un QTL pourrait donc provenir de la modification des sites de reconnaissance et/ou des sites effecteurs, conduisant à une faible interaction entre l'agent pathogène et la plante et par conséquent, déclencherait des réponses de défense moins importantes et/ou moins rapides.

Hypothèse 6 : Les QTL seraient des gènes uniques encore jamais identifiés.

Cette dernière hypothèse est confortée par les résultats récents de clonage de QTL, qui ont permis d'identifier de nouvelles classes de gènes. Chez le riz, une étude sur la résistance à *Magnaporthe grisea* a permis d'identifier une région de 65 kb sous-jacent au QTL *Pi34* contenant 10 phases ouvertes de lecture (en anglais, open reading frames = ORFs) dont la fonction des gènes est inconnue (Zenbayashi-Sawata et al. 2007). Chez le soja, le locus *Rhg1* conférant la résistance aux nématodes à kyste comporte 3 gènes : un transporteur, une protéine α -SNAP, et une protéine WI12 et 10 copies de ces 3 gènes sont nécessaires pour conférer la résistance (Cook et al. 2012). Chez le blé, le gène *Yr6* conférant une résistance quantitative à la rouille jaune est impliqué dans le transfert de lipides (Fu et al. 2009).

1.5.3. MODES D'ACTION DES QTL DE RESISTANCE SUR LES AGENTS PATHOGENES

Peu de connaissances sont également disponibles concernant les modes d'action des QTL sur les populations et traits de vie des agents pathogènes. L'action de la résistance quantitative se caractérise par une diminution des performances d'un agent pathogène sur les différentes phases de son cycle infectieux (Parlevliet 1979). Pour la plupart des agents pathogènes, le cycle infectieux comprend l'infection, la colonisation et la reproduction (Azzimonti et al. 2013). L'évaluation de l'efficacité de la résistance quantitative vis-à-vis de ces différentes

étapes nécessite la mesure des différentes étapes du développement de l'agent pathogène (Pariaud et al. 2009b; Parlevliet 1979).

Mesure de composantes du cycle épidémique

L'efficacité d'infection, considérée après le premier contact entre la cellule hôte et l'agent pathogène, mesure le nombre d'infections réussies en termes de lésions sporulantes. Elle inclut les étapes du cycle correspondant à la germination des spores et la pénétration mais aussi au début de la colonisation des tissus (Parlevliet 1979). **La période de latence** mesure le temps nécessaire à l'apparition des premières spores et **la période d'incubation** celui nécessaire à l'apparition des premiers symptômes visibles (Parlevliet 1979). Elle reflète la pénétration mais aussi la vitesse de croissance de l'agent pathogène durant les premiers jours après inoculation. **La taille des lésions**, mesure une superficie de la plante effectivement affectée par l'agent pathogène (Parlevliet 1979). Elle donne des informations sur la colonisation de l'agent pathogène. **La sporulation**, mesure la production de spores produites par l'agent pathogène (Pariaud et al. 2009b). Elle permet d'obtenir des informations sur sa reproduction après un cycle infectieux sur la plante hôte.

La quantification de ces composantes du cycle épidémique a été réalisée dans plusieurs études comme sur le blé (Broers 1989), l'orge (Baart et al. 1991), la lentille (Negussie et al. 2005), la cacahuète (Cantonwine et al. 2008), le sorgho (Resende et al. 2009), la tomate (Rodeva et al. 2009), le tournesol (Sakr 2009) et la banane (Leiva-Mora et al. 2015).

Mode d'action des QTL sur les étapes des cycles infectieux

Différentes études ont identifiés des QTL agissant, soit sur certaines phases du développement de l'agent pathogène, comme la sporulation (Calenge et al. 2004; Kelm et al. 2012), l'efficacité d'infection (Jorge et al. 2005), la période de latence (Marcel et al. 2008), soit sur plusieurs phases du développement (Azzimonti et al. 2013; Chung et al. 2010; Talukder et al. 2004). Cependant, l'effet de la résistance quantitative sur ces étapes du développement épidémique est influencé par les conditions climatiques, les stades de développement de la plante et du pathogène, ainsi que le substrat utilisé pour les expérimentations essentiellement dans le cas des pathogènes racinaires (Denissen 1991; Parlevliet 1979; Rufty and Main 1989). Dans le pathosystème orge-rouille, Wang et al. (2010) ont identifié trois QTL agissant sur la période de latence mais à des stades différents du développement de la plante, un QTL agissant uniquement au stade plantule, un autre uniquement à partir du stade tallage et le dernier à tous les stades. De plus, l'effet d'un QTL mis en évidence en conditions contrôlées

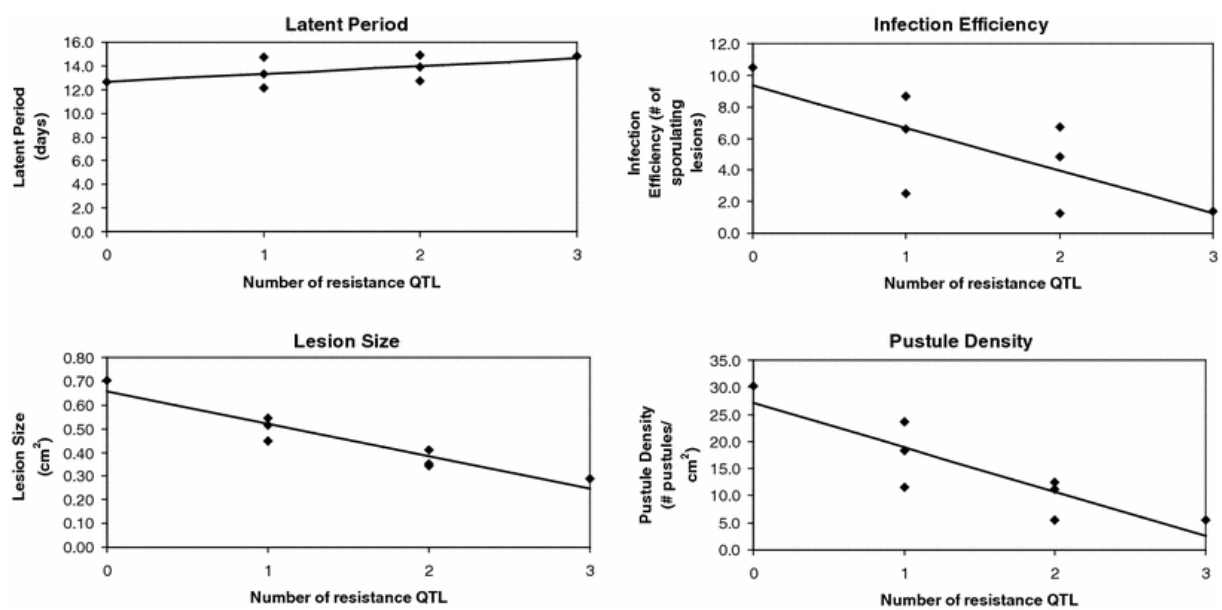


Figure 10 : Effet du cumul de QTL agissent sur différentes composante de résistance, d'après Richardson et al. (2006).

Evaluation de huit NILs contenant différentes combinaisons de zéro à trois QTL de résistance à la rouille jaune de l'orge vis-à-vis de quatre composantes du développement épidémique à savoir : Période de latence, l'efficacité d'infection, la taille des lésions et la densité de pustule.

peut être amplifié, semblable, ou au contraire réduit à l'échelle de l'épidémie au champ (Chung et al. 2010; Talukder et al. 2004). Cependant, peu d'études se sont intéressées à évaluer l'effet sur la résistance du cumul de QTL agissant sur des étapes différentes ou similaires du cycle de développement des populations pathogènes. Les études publiées concernent essentiellement les maladies foliaires (Caranta et al. 1997; St Clair 2010), du fait principalement du caractère destructeur des tests disponibles pour les maladies racinaires. Richardson et al. (2006) ont montré que le cumul de 3 QTL de résistance dans des NILs permettait d'augmenter le niveau de résistance à la rouille jaune chez l'orge et de réduire à la fois l'efficacité d'infection, la taille des lésions et la densité de pustules (Figure 10).

2. LA RESISTANCE DU POIS A *APHANOMYCES EUTEICHES*

2.1. LE POIS PROTEAGINEUX

2.1.1. ENJEUX ET INTERETS DE LA CULTURE

Le pois protéagineux, *Pisum sativum* L., est une culture récente, originaire du Moyen-Orient (Smýkal et al. 2012). Le pois est devenu une grande culture en 1980 suite à l'embargo des Etats-Unis sur le tourteau de soja qui oblige tous les pays de la Communauté Economique Européenne (CEE) à rechercher un produit de substitution, riche en protéines. Le pois protéagineux trouve alors rapidement sa place puisque la graine est riche en protéine [24% ; (Schneider and Huyghe 2015)]. La France, premier producteur de pois de conserve devient premier producteur de pois protéagineux dans la CEE. Néanmoins, au sein de l'Union Européenne (UE), 67 % des matières riches en protéines consommées restent aujourd'hui importées (25 millions de tonnes) dont 60 % sous forme de tourteau de soja en provenance des Etats-Unis (UNIP 2015). Au final, les matières riches en protéines constituent un poste important de déficit.

Par ailleurs, le pois présente de nombreux atouts agro-environnementaux. Sa culture ne requiert aucun apport en engrais azotés, dû à la capacité de la plante à fixer l'azote atmosphérique (Hébrard 2002). De plus, elle est une tête d'assolement favorable dans les systèmes de culture céréaliers (un gain de rendement pour une culture de blé qui suivrait et une réduction des apports azotés) nécessitant peu d'intrants et d'interventions en culture, et présentant des besoins hydriques relativement faibles (Carrouée et al. 2012; Sartori 2002).

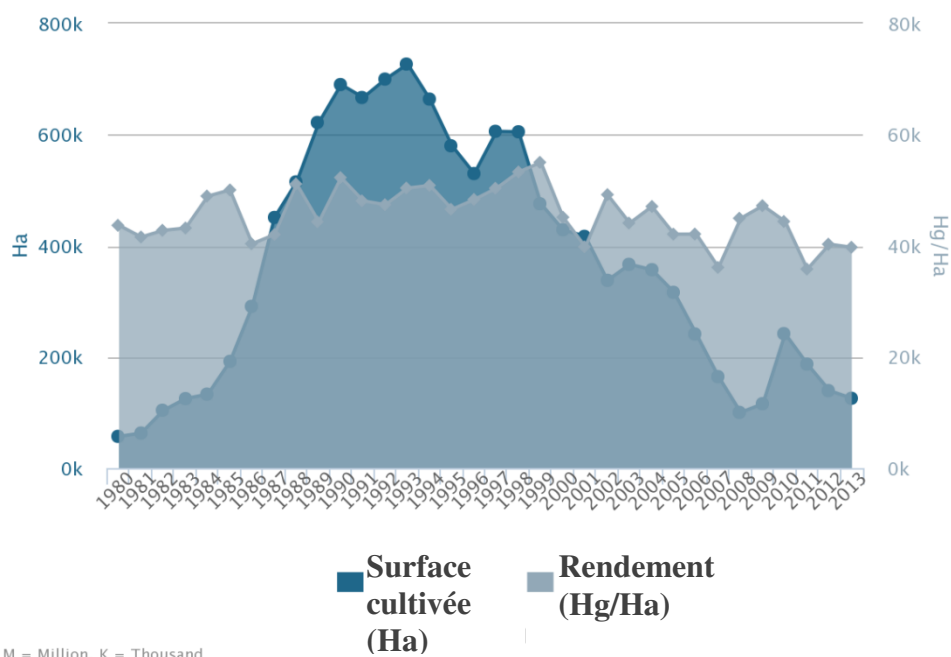


Figure 11 : Evolution des surfaces cultivées et du rendement de la culture du pois en France entre 1980 et 2013 (Source : FAOSTAT 2015)

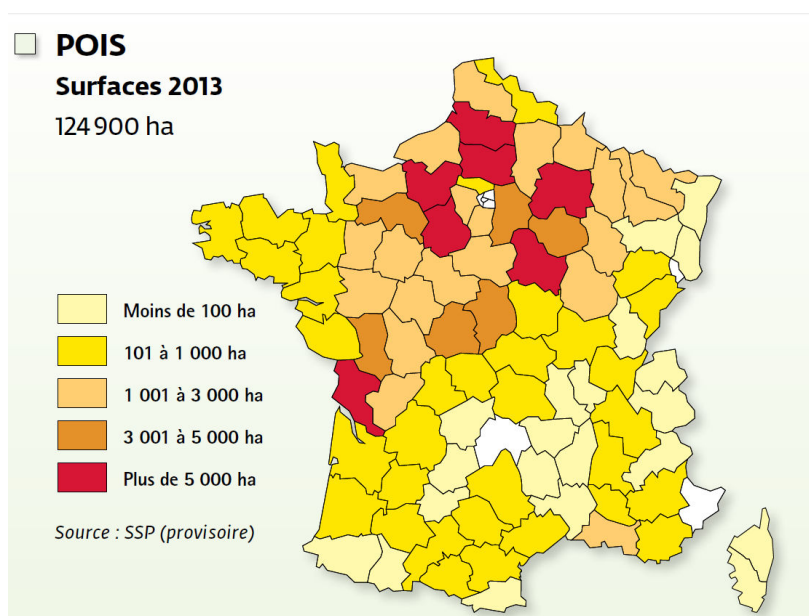


Figure 12 : Surfaces cultivées en pois protéagineux en France en 2013 (Source : UNIP 2015)

2.1.2. PRODUCTION ET RENDEMENT

Après une phase d'expansion très rapide de 1981 à 1990, les surfaces de pois protéagineux en France ont marqué un palier en 1993 (727 000 ha) (Figure 11). La première réforme de la Politique Agricole Commune (PAC) en 1992 puis l'Agenda 2000 défavorables aux prix du pois à l'hectare, ont contribué au recul de la production et des surfaces cultivées. Puis, le plan Protéines 2010, octroyant une aide à la culture sur deux ans, a permis d'augmenter temporairement les surfaces. Néanmoins, pour la campagne française 2013/2014, les surfaces de culture du pois protéagineux en France se sont élevées à 124 900 ha et le rendement à 39.7 quintaux/ha pour une production de l'ordre de 533 000 tonnes (FAOSTAT 2015). Les grandes régions françaises de production sont la Picardie, le Centre et la Champagne-Ardenne (Figure 12). Malgré la baisse de production depuis plus de 10 ans, la France reste de loin le premier pays européen producteur de pois protéagineux (54 % de la production de l'UE) et le sixième au niveau mondial après le Canada, la Chine, la Russie, les Etats-Unis et l'Inde. Le pois est cultivé dans 95 pays à travers le monde et représente ainsi une superficie mondiale cultivée de 6.3 millions d'hectares (FAOSTAT 2015).

La diminution de la production de pois protéagineux en France et en Europe depuis 1993 a été aussi fortement associée à l'instabilité des rendements particulièrement observée durant ces dix dernières années (Figure 11). La sensibilité des variétés de pois aux maladies, tout particulièrement à la pourriture racinaire précoce due à *Aphanomyces euteiches*, a été et reste un facteur majeur d'instabilité des rendements ayant décru jusqu'à 36q/ha en 2007 et 2011 (Figure 11). Le développement de moyens de lutte, notamment de type génétique, contre *A. euteiches* est devenu l'une des grandes préoccupations de la filière pois en France depuis une quinzaine d'années.

2.1.3. LA GENETIQUE DU POIS

Le pois est une espèce appartenant à la famille des Légumineuses ou Fabacées et au genre *Pisum*. On distingue deux grands types culturels de pois, l'un semé au printemps et l'autre en hiver. Le pois de printemps est le type culturel actuellement prédominant. Le pois d'hiver peut-être semé précocement ou non à l'automne, selon qu'il porte ou non l'allèle *Hr* de sensibilité à l'initiation de la floraison [Highly responsive to photoperiod for floral initiation, (Lejeune-Henaut et al. 2008)] lui permettant d'échapper aux gels de fin d'hiver. Les deux types de pois sont récoltés au mois de juillet.

Le pois est une plante diploïde ($2n = 14$) annuelle et autogame par cléistogamie. Les variétés de pois cultivées sont des lignées pures. L'apex de la tige principale différencie des nœuds

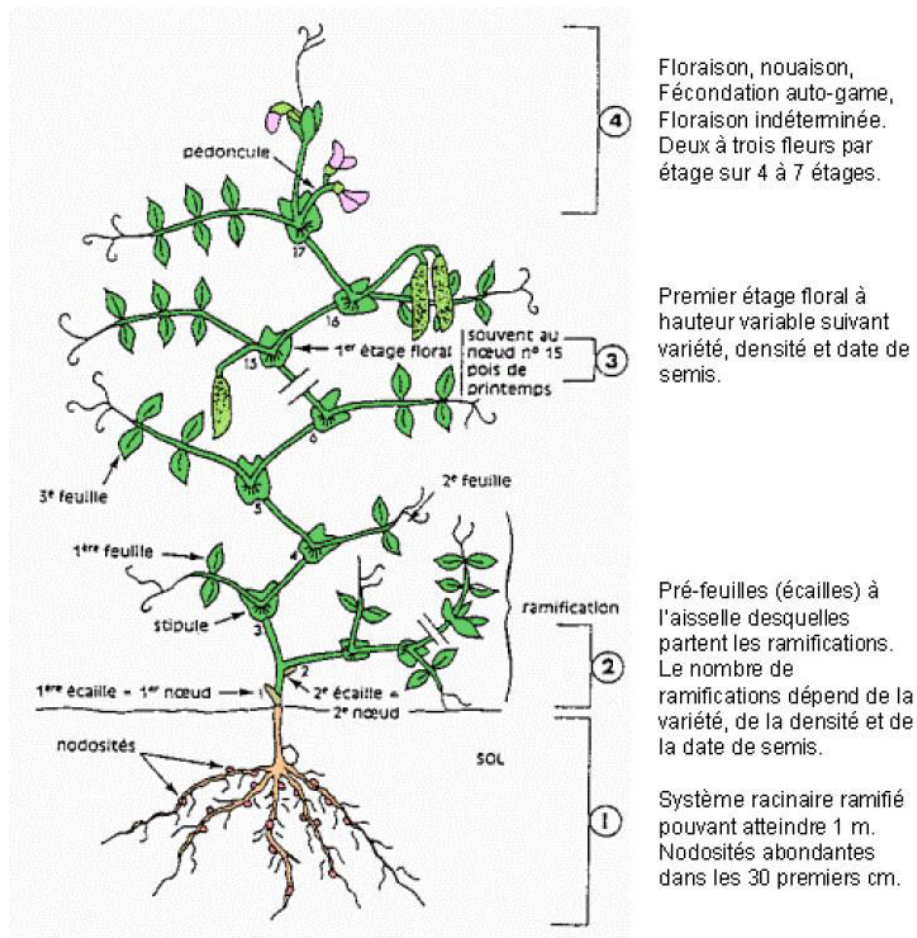


Figure 13 : Organisation d'une plante de pois (Boyeldieu 1991)

alternes successifs (Figure 13). Les feuilles normales sont composées à leur base de deux grandes stipules à forme arrondie, puis de paires de folioles. La morphologie de la feuille est variable selon que la plante porte ou non l'allèle récessif *afila* (*af*) (Mishra et al. 2009) qui transforme les folioles en vrilles. Depuis les années 1980, cet allèle est intégré dans toutes les variétés de pois protéagineux pour limiter la verse des plantes et favoriser la récolte. Sur ses racines, le pois présente des nodosités fixatrices de l'azote de l'air, développées grâce à des bactéries symbiotiques du genre *Rhizobium*. Le grain présente une grande variabilité génétique pour sa couleur, sa forme et sa taille. La forme et la couleur des grains ont été les premiers caractères étudiés par G. Mendel, qui lui permirent d'établir les premières lois de la génétique (Figure 13).

Des collections de ressources génétiques *ex-situ*, comprenant 200 à plus de 8000 accessions de pois sauvages et cultivés, sont réparties dans des banques de gènes d'une vingtaine de pays dans le monde (Warkentin 2015). Des collections de référence ou core-collections ont été générées à partir de ces ressources, notamment en Grande-Bretagne (Jing et al. 2010; Smykal et al. 2011), aux Etats-Unis (Kwon et al. 2012), en Chine (Zong et al. 2009) et en France (Deulvot et al. 2010). Par ailleurs, des collections de mutants naturels ou induits sont également disponibles, en particulier au John Innes Center, UK [1400 mutants « Fast Neutron » ; (Domoney et al. 2013)], à l'USDA, USA (Marx *Pisum* Genetic Stock collection extraites de 80,000 accessions ; www.ars.usda.gov) et à l'INRA, France [5000 mutants de TILLING, Targeting Induced Local Lesions IN Genomes ; www.urgv.evr.inra.fr/UTILLdb ; (Dalmais et al. 2008)].

Le génome de Pois présente une large taille de 4 450 Mpb (Dolezel and Greilhuber 2010) et comporte 50 à 60 % d'éléments répétés, ayant retardé le développement des travaux de génétique moléculaire et de génomique chez le pois (Smýkal et al. 2012). Depuis les années 2000, de nombreuses cartes génétiques ont été construites, à partir principalement de populations bi-parentales de RILs, comportant chacune quelques centaines de marqueurs essentiellement RAPD ou SSR (Bordat et al. 2011; Lorigon et al. 2005; Tayeh et al. 2015). Ce n'est que depuis 2010 que des données conséquentes de séquençage du pois ont commencé à être mises à disposition (Deulvot et al. 2010; Franssen et al. 2011; Smýkal et al. 2012). En 2014, Duarte et al. ont décrit le développement d'une carte composite, alignée sur le génome de *M. truncatula*, comportant 1340 marqueurs de type SNP développés à partir du séquençage d'ADNc de huit lignées. Plus récemment dans le cadre du projet ANR GENOPEA (2010-2014), une puce Infinium® BeadChip comportant 13,204 SNPs a été générée, à partir de

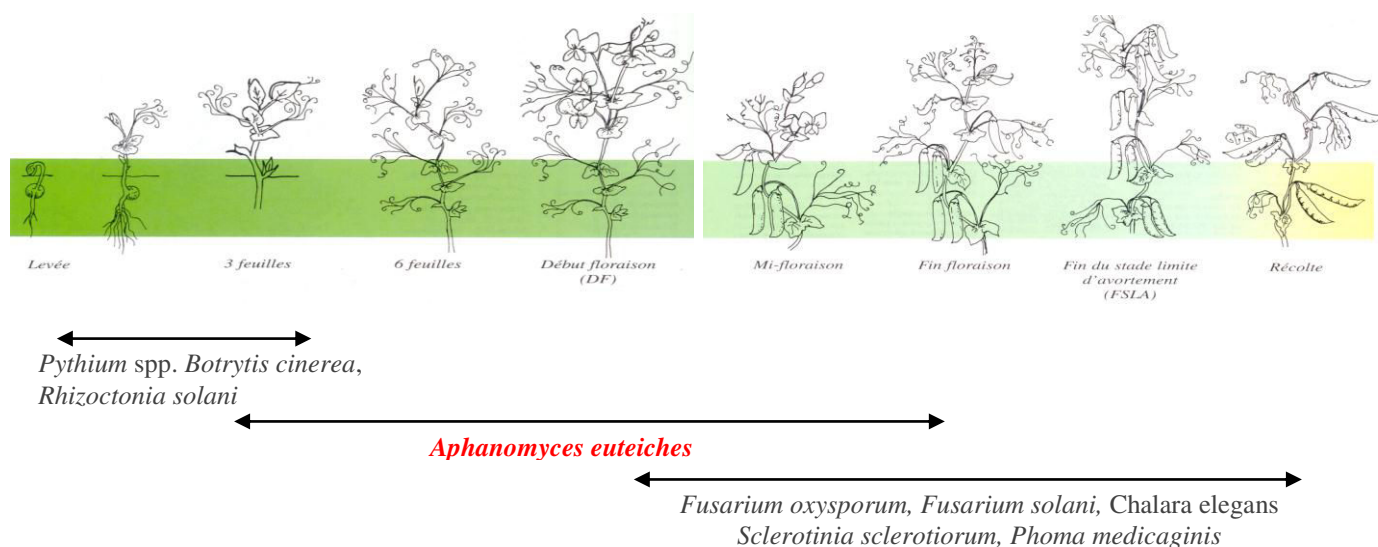


Figure 14 : Micro-organismes du complexe racinaire du pois.

Dans l'ordre chronologique, le pois est la cible de la fonte des semis causé par *Pythium* spp, *Rhizoctonia solani* et *Botrytis cinerea*. Dès le stade 3-4 feuilles, le pois est la cible de la pourriture racinaire précoce, due à *Aphanomyces euteiches*, se déclarant généralement un mois après le semis dans des conditions pédoclimatiques favorables à la maladie. A partir de la floraison, le pois est la cible du flétrissement précoce dû à *Fusarium oxysporum* ainsi qu'à *Sclerotinia sclerotinium*. En fin de cycle, le pois peut présenter également des nécroses racinaires provoquées par *Phoma medicaginis*, *Fusarium solani* et *Chalara elegans* (Didelot, Maumene, and Carrouee 1994).



Figure 15 : Symptômes racinaires provoqués par *A. euteiches* sur pois.



Figure 16 : Champ de pois infesté par *A. euteiches* avec un foyer déclaré « rond jaunes » (stade début de floraison)

séquences d'ADN génomique de 16 génotypes, alignées sur des contigs d'ADNc du génotype Caméor représentant le répertoire de gènes du génome du pois (Alves-Carvalho et al. 2015). Une carte génétique consensus intégrée, réalisée à partir d'environ 1440 individus dérivés de 12 populations de RILs, a permis d'ordonner avec précision 12,802 des SNPs de la puce et d'identifier des régions dupliquées par recherche de paralogie entre les séquences contenant les SNPs (Tayeh et al. 2015). Par ailleurs, Boutet et al. (2016) ont identifié par GBS et cartographié génétiquement un total de 63,353 SNPs, à partir d'une population de 48 RILs issue du croisement « Baccara x PI180693 ». Récemment, un consortium international a été créé pour réaliser le séquençage du premier génome du pois (Madoui et al. 2015).

2.2. LA POURRITURE RACINAIRE PRECOCE DU POIS

2.2.1. IMPORTANCE ET SYMPTOMES DE LA MALADIE

La pourriture racinaire précoce du pois, due à l'agent pathogène tellurique *Aphanomyces euteiches* Drechs., est la maladie la plus dommageable en France parmi celles générées par les micro-organismes du complexe racinaire du pois (Figure 14). Elle a été décrite pour la première fois aux USA dans les années 1920 par Jones et Drechsler (Papavizas and Ayers 1974). Depuis, elle est présente dans de nombreuses régions du monde, particulièrement en Amérique du Nord, Europe, Australie, Nouvelle-Zélande et Japon. En France, elle a été mise en évidence dès 1932 mais n'a posé de problèmes significatifs qu'à partir de 1993 dans le Bassin Parisien et au Nord de la France (Didelot and Chaillat 1995). Elle est aujourd'hui présente dans toutes les zones de production du pois excepté dans les sols très calcaires types craies de Champagne, peu réceptifs à la maladie (Moussart, Comm. pers.).

Les symptômes de la maladie sur pois se manifestent à deux niveaux, dès le stade 3-4 feuilles sur pois de printemps si les conditions climatiques sont favorables. Sur les parties racinaires, on observe la présence de lésions molles et translucides sur les radicelles dès 3-4 jours après infection, lésions qui évoluent en une pourriture « brun-miel » s'étendant sur tout le système racinaire et sur l'épicotyle qui présente alors un étranglement caractéristique (Figure 15). Puis, les racines et les nodosités touchées se dessèchent. A partir du stade début floraison, ces pourritures s'assombrissent du fait de l'attaque secondaire des champignons du complexe parasitaire des racines (essentiellement *Fusarium solani*, *Phoma medicaginis* var. *pinodella*, ...). Sur les parties aériennes, la maladie entraîne un jaunissement et/ou un nanisme puis un dessèchement des plantes. A l'échelle de la parcelle, les symptômes aériens se manifestent le plus souvent des zones de végétation vert pâle qui tournent rapidement au jaune « ronds jaune » dans les parcelles (Figure 16). Lorsque l'attaque est importante, les plantes touchées

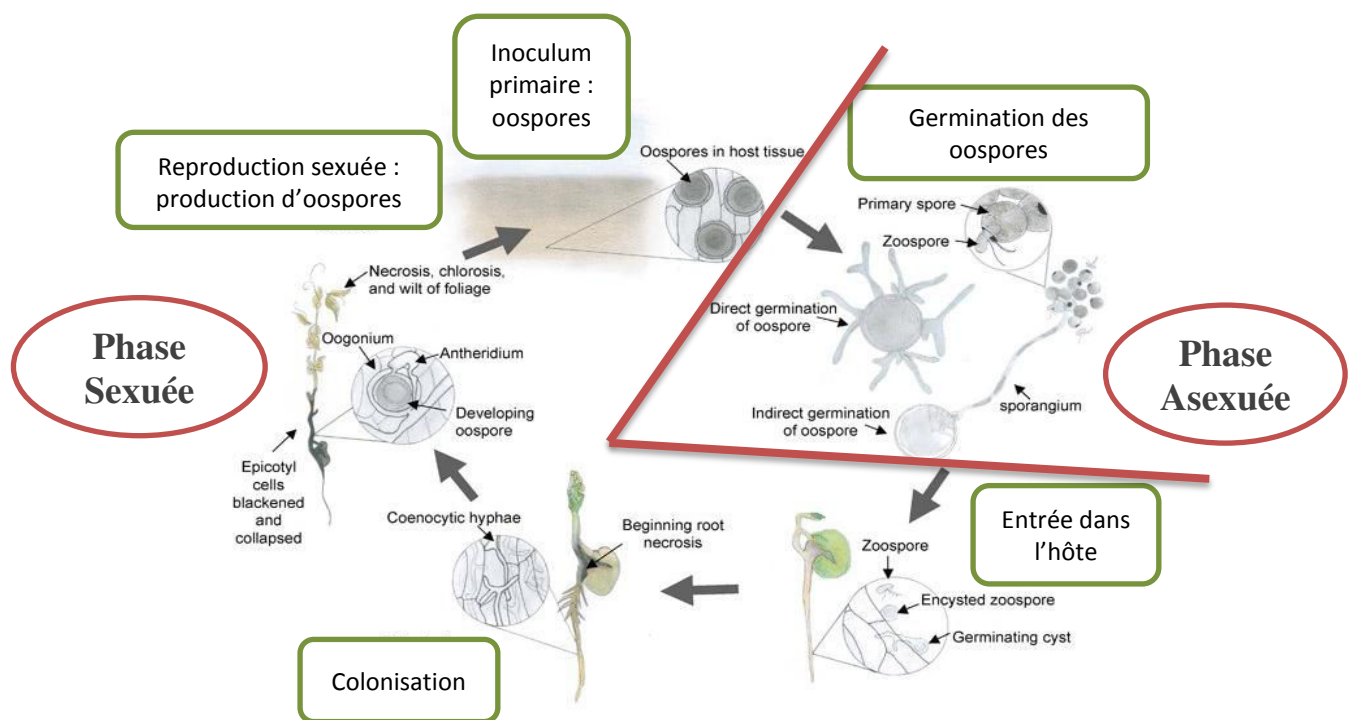


Figure 17 : Cycle infectieux d'*Aphanomyces euteiches*, modifié d'après Hugues et Grau 2007.

produisent très peu d'étages de gousses. La maladie peut engendrer des pertes de rendement de l'ordre de 20 à 50 quintaux/ha, selon l'intensité de l'attaque.

2.2.2. L'AGENT PATHOGENE ET SON CYCLE INFECTIEUX

A. euteiches est aujourd'hui rangé dans la classe des Oomycètes, l'ordre des Saprolegniales et la famille des Saprolegniaceae. Le genre *Aphanomyces* regroupe plusieurs espèces de parasites racinaires. Parmi les plus importants d'un point de vue agronomique, on trouve *A. cochlidioides* qui infecte la betterave et l'épinard ainsi qu'*A. euteiches* qui infecte de nombreuses espèces de légumineuses (pois, haricot, fève, pois chiche, vesce, luzerne, trèfle, lupin,...) (Gaulin et al. 2007; Hughes and Grau 2007; Moussart et al. 2008). *A. euteiches* est considéré comme un agent pathogène homothallique se développant dans des tissus vivants mais dont les oospores sont observés dans les tissus nécrosés.

La pourriture racinaire précoce est considérée comme une maladie monocyclique, incluant un seul cycle d'infection par saison (Hughes and Grau 2007). Le cycle infectieux est constitué d'une phase asexuée et d'une phase sexuée (Figure 17). L'inoculum primaire est constitué essentiellement d'oospores (stade sexué) présentes dans les racines de la culture hôte précédente ou à l'état libre dans le sol. Ces spores de repos ont une durée de vie particulièrement longue (10 à 20 ans dans le sol) et une grande résistance aux conditions extrêmes (Papavizas and Ayers 1974). La phase asexuée débute par la germination de l'oospore qui conduit à la production des zoospores, considérées comme l'unité infectieuse de l'agent pathogène. Cette germination peut se traduire directement par l'émission d'un tube germinatif qui se ramifie pour former des hyphes, ou indirectement par la production de sporanges qui libèrent des zoospores. Elle serait dépendante de composés spécifiques présents dans les exsudats racinaires (Shang et al. 2000). Selon Malvick et Percich (1998), la germination d'une oospore permet de libérer 300 à 400 zoospores biflagellées à l'aspect réniforme (7 à 8 µm de diamètre et 13 µm de long). La phase sexuée du cycle infectieux démarre une fois les zoospores libérées, qui sont viables pendant environ 5 jours et se déplacent dans l'eau libre du sol (Papavizas and Ayers 1974). L'infection est donc favorisée à la suite de précipitations importantes. Les zoospores sont attirées près des racines par chimiotactisme. Au contact des racines elles perdent leurs flagelles, s'enkystent puis émettent un tube germinatif en utilisant du calcium et des nutriments libérés par la plante (Deacon and Saxena 1998). Aucune structure de pénétration (appressorium) ou d'invasion (haustorium) au moment de l'infection n'a été mise en évidence à ce jour (Kjoller and Rosendahl 1998). Le tube germinatif émis par la zoospore est à l'origine du développement d'hyphes dans les

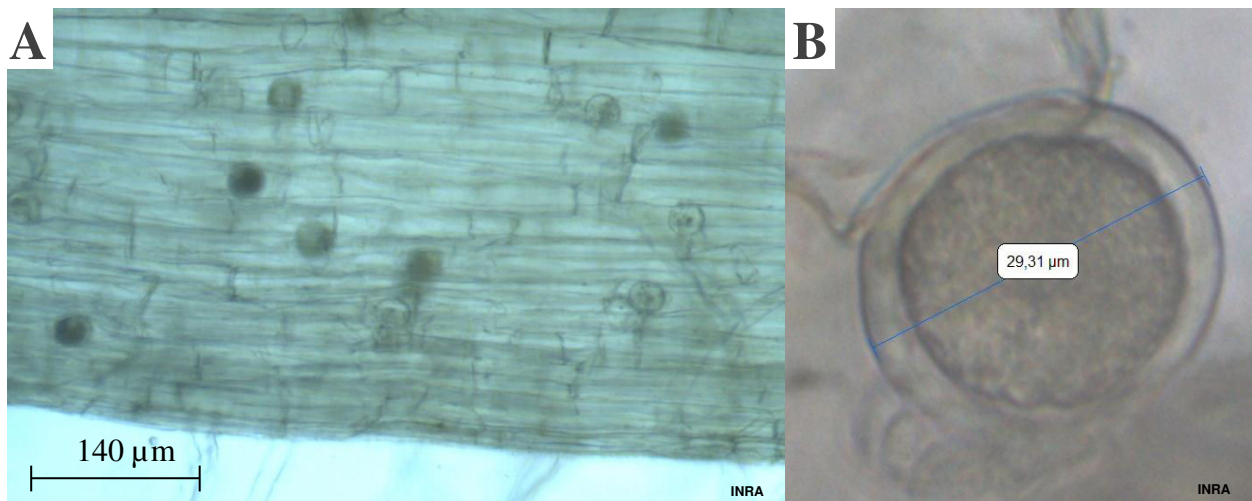


Figure 18 : Coupe de racine de pois présentant des oospores d'*A. euteiches*.

compartiments intra- et inter-cellulaires de l'hôte. Dès le 4^{ème} jour après infection, les hyphes différencient les organes de la reproduction sexuée, les oogones (organes femelles) et les anthéridies (organes mâles), avec un rapport de 5 anthéridies pour 1 oogone. L'anthéridie pénètre l'oogone avec les tubes de fertilisation, qui fournissent les noyaux mâles à l'oogone, ayant pour résultat la formation d'oospores diploïdes. Après cette fécondation, de nombreuses oospores apparaissent alors dans les tissus corticaux des racines et de l'épicotyle et serviront d'inoculum primaire pour l'infection suivante (Figure 18A). Ces oospores sont sphériques avec une paroi épaisse de 1.5 à 2 μm et contient en son centre un globule huileux (Figure 18B). Lorsque les symptômes commencent à s'exprimer au niveau aérien, les hyphes de l'agent pathogène seraient déjà inactifs.

La dissémination de l'agent pathogène dans le sol est possible par le contact de racine à racine. Les distances parcourues sont alors rarement supérieures à 15 cm (Pfender and Hagedorn 1983; Willocquet et al. 2007). Tous les sols régulièrement saturés en eau favorisent la dissémination du champignon. Il en est de même pour les parcelles en pente, où le ruissellement est important, et les sols sableux. Sur de longues distances, la dissémination a pour origine principale les transports de terre contaminée par les outils agricoles.

2.2.3. SPECIFICITE D'HOTE ET VARIABILITE D'A. *EUTEICHES*

La spécificité d'hôte d'*A. euteiches* est difficile à déterminer, puisqu'il est capable d'infecter en conditions artificielles 19 familles botaniques différentes comprenant les légumineuses, les graminées, les brassicacées et les solanacées (Papavizas and Ayers 1974). Chez les légumineuses, *A. euteiches* a été isolé en conditions naturelles à partir de cultures de pois (Wicker et al. 2001), haricot (Pfender and Hagedorn 1983), luzerne (Delwiche et al. 1987), trèfle (Tofte et al. 1992), lentille (Lamari and Bernier 1985) et féverole (Leur et al. 2008). En utilisant une souche de référence française isolée sur pois, Moussart et al. (2008) ont montré que la lentille, la luzerne et le haricot étaient sensibles à la maladie et présentaient peu de variabilité génétique intra-spécifique. En revanche, la féverole, la vesce et le trèfle présentaient une large variation génétique intra-spécifique pour la résistance vs. sensibilité, avec l'observation de génotypes sensibles et de génotypes présentant des niveaux de résistance élevés. L'ensemble des génotypes de lupin et de pois chiche testés présentaient un niveau très élevé de résistance. A l'inverse, il a été démontré que des souches d'*A. euteiches* isolées sur luzerne cultivée, vesce ou haricot avaient un spectre d'hôte beaucoup plus étroit (Levenfors et al. 2003; Malvick et al. 1998).

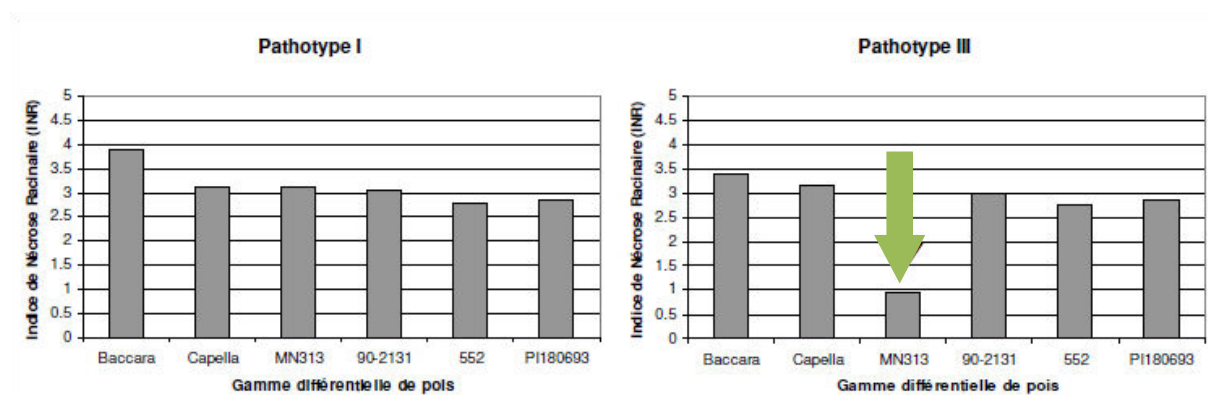


Figure 19 : Les deux principaux pathotypes d'*A. euteiches* mis en évidence par l'indice de nécrose racinaire (INR) sur une gamme différentielle de pois, d'après Wicker et Rouxel (2001).

Cette gamme contient deux génotypes sensibles (Baccara et Capella), 1 génotype partiellement résistant ou sensible selon le pathotype (MN313) et 3 génotypes partiellement résistants (90-2131, 552 et PI180693).

Sur pois, Wicker et Rouxel (2001) ont mis en évidence l'existence de deux pathotypes majeurs au sein de 109 souches (dont 80 % d'origine française), caractérisées pour leur pouvoir pathogène sur une gamme différentielle de six génotypes de pois (Wicker et al. 2003). Le premier, nommé pathotype I, a inclus les $\frac{3}{4}$ des souches testées (dont la totalité des souches françaises), lesquelles ont présenté néanmoins des différences d'agressivité. Le deuxième, nommé pathotype III, a été spécifique de souches américaines et caractérisé par une avirulence sur le génotype MN313. Les isolats français se sont distingués par leur agressivité plus élevée que celle des isolats américains (Figure 19). L'existence de différents pathotypes d'*A. euteiches* a aussi été décrite pour les isolats de la luzerne. Ces isolats ont été classés en deux races (1 et 2) sur la base de leur pouvoir pathogène sur une gamme différentielle de trois populations de luzerne (Malvick and Grau 2001).

La diversité génétique d'*A. euteiches* est encore mal connue et n'a pas été clairement démontrée comme corrélée à la diversité du pouvoir pathogène. Deux banques de cDNA ont été créées contenant 7 977 séquences d'unigènes (Gaulin et al. 2008) et répertoriées dans la base de données « AphanoDB » (Madoui et al. 2007). Récemment, le génome complet d'une souche de référence d'*A. euteiches* (ATCC201684) appartenant au pathotype I a été séquencé (Gaulin et al. en prép ; www.genoscope.cns.fr). Le re-séquençage de deux souches de référence pour les pathotypes I et III (RB84 et Ae109, respectivement) est en cours, afin notamment d'identifier les polymorphismes génétiques distinguant les deux pathotypes. L'ensemble de ces ressources génomiques pourront être utiles pour analyser la diversité génétique et l'évolution des populations d'*A. euteiches*.

Du fait de son caractère tellurique et homothallique, un faible potentiel d'évolution des souches d'*A. euteiches* peut être imaginé. Néanmoins, Grunwald et Hoheisel (2006) a suggéré que la structure génétique des populations d'*A. euteiches* était façonnée par un système de reproduction mixte, incluant de l'autofécondation régulière et, occasionnellement, des migrations de nouveaux génotypes ou intercroisements. Ces caractéristiques classeraient *A. euteiches* comme un agent pathogène à risque d'évolution moyen à modérément haut (échelle 5–7) d'après la classification proposée par McDonald et Linde (2002). Ainsi, chez la luzerne, des souches d'*A. euteiches* appartenant à la race 2 ont été décrites comme contournant la résistance à la race 1 dans des variétés cultivées aux Etats-Unis (Malvick and Grau 2001).

2.2.4. METHODES DE LUTTE

Actuellement, il n'existe aucune méthode de lutte efficace pour gérer la maladie. La gestion du risque repose sur un test biologique, qui permet de connaître le potentiel infectieux (PI) du sol et ainsi de conseiller l'agriculteur sur l'implantation en vue de sécuriser les rendements. La réponse à ce test est donnée selon une échelle de PI de 0 à 5. Si le PI est inférieure à 1, la culture du pois est possible, si le PI est comprise entre 1 et 2.5, seule la culture du pois d'hiver, qui échappe partiellement à la maladie, peut être envisagée et s'il est supérieur à 2.5, la culture du pois est déconseillée (Crosson and Moussart 2011). La féverole ou le lupin, résistant à *A. euteiches*, peuvent se substituer au pois dans les parcelles à risque. Un test PCR a été également développé pour quantifier l'agent pathogène dans le sol (Gangneux et al. 2014; Sauvage et al. 2007; Vandemark et al. 2002; 2000).

La lutte culturale offre aussi des possibilités. Une fréquence de retour du pois de 5-6 ans minimum est indispensable et il est conseillé, lorsque cela est possible, d'alterner pois et féverole ou lupin. L'amélioration de la structure du sol par l'amendement de matière organique fraîche améliorerait le drainage et créerait des conditions moins favorables à l'infection du pois par *A. euteiches* (Allmaras et al. 2003). Les précédents culturaux, tels que les Brassicacées, pourraient exercer un effet suppressif sur la maladie en libérant des composés volatils (COV) dans le sol qui réduiraient la mobilité des zoospores (Hossain et al. 2012; Smolinska et al. 1997).

Il n'existe actuellement aucun moyen de **lutte chimique**. Le Tachigaren® (traitement de semence) aurait un effet réducteur sur la maladie, mais à des doses trop élevées pour être envisageables sur le plan économique et environnemental. L'Aliette® (traitement de semence) aurait un effet inhibiteur sur les nécroses racinaires par rapport au Wakil XL® utilisé actuellement, mais il n'est pas homologué sur les cultures pois. Certains travaux antérieurs évoquent également l'impact des herbicides (trifluraline, dinoseb) sur le potentiel infectieux (Jacobsen and Hopen 1981).

Des méthodes de **lutte biologique** ont été étudiées. L'utilisation de bactéries ou champignons antagonistes (*Burholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, etc) ou mycorrhizes (*Glomus spp*) auraient un effet néanmoins faible sur l'agent pathogène *A. euteiches* (Wicker 2001).

La lutte génétique est la plus encourageante même si, à ce jour, aucune variété résistante à *A. euteiches* n'est encore commercialisée. En effet, des sources de résistance partielle ont été mises en évidence aux Etats-Unis et des lignées de type agronomique améliorées pour la résistance ont été développées en France. La lutte génétique, couplée à des moyens de lutte

prophylactiques et culturaux, est aujourd'hui la piste la plus prometteuse pour contrôler la pourriture racinaire du pois.

2.3. LA RESISTANCE A *APHANOMYCES EUTEICHES* CHEZ LE POIS

2.3.1. SOURCES DE RESISTANCE ET SELECTION

Les travaux de recherche de génotypes résistants à *A. euteiches* ont débuté dès les années 1930 dans le Nord des Etats-Unis et se sont intensifiés vers 1950 par la mise en évidence des lignées PI166159 et PI180693 partiellement résistantes à *A. euteiches* (Lockwood and Ballard 1960). A la fin XXème siècle, les travaux de sélection pour la résistance à *A. euteiches* ont essentiellement été publiés par trois équipes américaines (Davis et al. 1995; Gritton 1990; Kraft 1992), ce qui a permis d'identifier des lignées partiellement résistantes comme : 79-2022, MN313 et MN314 ; 200 et 552 ; 90-2079 et 90-2131, respectivement (Hamon 2010). Un large programme de criblage de ressources génétiques conduit par Malvick et Percich (1998) a également permis l'identification de sources de résistance efficaces vis-à-vis de souches américaines.

En France, en 2003, l'INRA et l'UNIP ont mis en place un large programme de criblage de ressources génétiques (environ 1900 accessions) pour la résistance vis-à-vis de souches françaises d'*A. euteiches*, puis au champ. Ce programme a permis de sélectionner un total de 20 accessions présentant un niveau de résistance partielle. L'ensemble des travaux de recherche de sources de résistance à *A. euteiches* menés aux Etats-Unis et en France ont ainsi montré qu'il existait un faible nombre de sources de résistance dans la variabilité naturelle étudiée au sein du genre *Pisum*. De 1995 à 2005, le Groupement des Sélectionneurs de Protéagineux (GSP, France) a développé un programme de sélection récurrente pour la création de géniteurs partiellement résistants, à partir de sources de résistance américaines (Roux-Duparque et al. 2004). Ce programme a permis de créer des géniteurs, tels que les lignées AeD99OSW-45-8-7, AeD99OSW-50-2-5 et AeD99QU-04-9-10-1, présentant des niveaux accrus de résistance par rapport à ceux des meilleurs témoins partiellement résistants utilisés en France (PI180693, 552 et 90-2131), (Desgroux et al. 2016).

Malgré ces travaux, la sélection lignées de pois résistantes à *A. euteiches* est restée difficile du fait du niveau partiel et du déterminisme polygénique de la résistance (Morrison et al. 1971; Shehata et al. 1983), de la variabilité de l'agent pathogène (Wicker et al. 2001), et des interactions avec d'autres pathogènes du complexe parasitaire du sol (Papavizas and Ayers 1974). Depuis les années 2000, des études de détection de QTL de résistance à *A. euteiches* ont été développées en vue notamment d'identifier des marqueurs pour assister la sélection.

2.3.2. GENETIQUE DE LA RESISTANCE

Chez le pois, la dissection de la résistance quantitative à *A. euteiches*, par l'identification de QTL de résistance a démarré dans les années 2000 aux Etats-Unis. Tout d'abord, à partir d'une population de 45 lignées recombinantes (RIL) issues du croisement « OSU1026 (sensible « S ») x MN313 (partiellement résistant « PR ») », Weeden et al. (2000) ont mis en évidence une région génomique, sur le groupe de liaison (LG) IV, associée à la résistance au champ en 1999 sur le site de LeSueur (USA).

Parallèlement, à partir d'une population de 127 RILs issues du croisement « Puget (S) x 90-2079 (PR) », Pilet-Nayel et al. (2002) ont identifié 7 QTL associés à la résistance partielle au champ sur deux lieux, LeSueur (MN, USA) et Pullman (WA, USA), et sur deux années (1996, 1998). L'un des QTL détectés, nommé *Aph1*, a été caractérisé comme un QTL « majeur » car il expliquait jusqu'à 47% de la variation observée pour la résistance à LeSueur. Deux autres QTL, *Aph2* et *Aph3*, ont été révélés de manière stable sur plusieurs environnements ou à partir de plusieurs variables de résistance au niveau racinaire ou aérien dans un même environnement. Des tests en conditions contrôlées ont également permis d'identifier notamment les trois QTL à partir de données de test sur plantule vis-à-vis de deux souches d'*A. euteiches*, l'une d'origine américaine (SP7), l'autre d'origine française (Ae106) (Pilet-Nayel et al. 2005). Par la suite, le QTL *Aph1* a été détecté comme un gène majeur de résistance ($R^2=89\%$) spécifique du pathotype III (souche américaine Ae109), jusqu'à présent absent en France (Pilet-Nayel et al. non publié). Ces données ont expliqué la sensibilité du génotype 90-2079 confirmée au champ en France alors qu'il avait été sélectionné comme source de résistance aux Etats-Unis dans des environnements comportant des souches du pathotype III.

De 2002 à 2011, des travaux collaboratifs entre l'INRA et l'USDA ont ensuite été menés pour identifier des QTL dans trois autres sources de résistance partielle, dont l'efficacité avait été confirmée en France, *i.e.* 90-2131, PI180693 et 552. Une analyse QTL a ainsi été réalisée à partir de trois populations de RILs (111 RILs « DSP (S) x 90-2131 (PR) » ; 178 RILs « Baccara (S) x PI180693 (PR) » ; 178 RILs « Baccara (S) x 552 (PR) »), génotypées à l'aide de marqueurs SSR, RAPD et PCR spécifiques pour construire des cartes génétiques (126 à 168 marqueurs par carte individuelle) et phénotypées pour la résistance en conditions contrôlées (2 à 6 souches par population) et au champ sur un réseau multi-local franco-américain (4 à 11 environnements par population de RILs). A partir des résultats de détection de QTL obtenus sur chacune des trois populations ainsi que sur la population « Puget x 90-

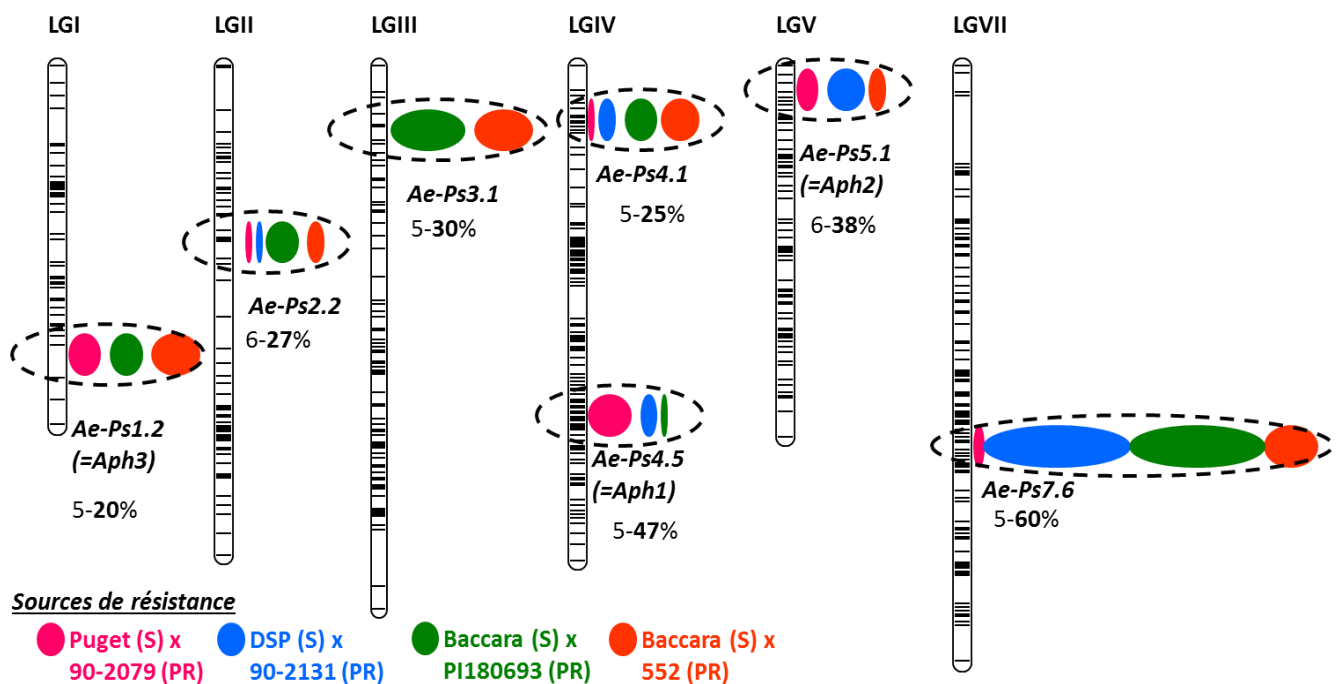


Figure 20 : Sept principaux QTL de résistance à *A. euteiches* identifiés chez le pois à partir des quatre populations de RILs issues de croisements impliquant les sources de résistance 90-2079, 90-2131, PI180693 et 552, d'après Hamon et al. 2011, 2013.

La longueur de chaque QTL représente l'intervalle de confiance approximatif du QTL. Sa largeur est proportionnelle au nombre de variables ayant permis sa détection, donc représente sa stabilité. Les pourcentages de variation expliqués par chaque QTL (Min-Max) selon les variables, sont indiqués en dessous des noms des QTL.

2079 » (au total, 29 environnements au champ en France et aux USA et 12 essais en conditions contrôlées), une **méta-analyse de QTL** a permis d'identifier 27 méta-QTL de résistance, par clusterisation de 115 QTL initiaux. Les 27 méta-QTL incluait **7 régions génomiques principales** [dont les QTL *Aph1*, *Aph2* et *Aph3* ; (Pilet-Nayel et al. 2002)], ayant chacune été détectée de manière très consistante dans 2 à 4 populations de RILs à partir d'au moins 12 variables initiales (Hamon et al. 2011; 2013). Ces 7 principaux QTL de résistance ont été nommés « *Ae-Psx.x* ». Deux d'entre eux, *Ae-Ps7.6* sur le LGVII et *Ae-Ps4.5* (ou *Aph1*) sur le LGIV, ont été caractérisés comme des QTL à effets majeurs vis-à-vis de souches du pathotypes I et III, respectivement [Figure 20, (Hamon et al. 2011; 2013)]. L'ensemble des résultats a permis de souligner les points marquants suivants : (i) Une relativement faible diversité de QTL de résistance non spécifiques des sources de résistance étudiées a été observée, suggérant l'existence de bases génétiques communes entre les lignées parentales partiellement résistantes étudiées. La quasi-totalité des méta-QTL regroupant au moins deux QTL initiaux ont en effet été détectés à partir d'au moins deux populations de RILs, chacun comportant entre 2 à 5 allèles contribuant à la résistance. (ii) Une faible spécificité des QTL de résistance a également été mise en évidence en fonction des deux principaux pathotypes d'*A. euteiches* décrits. En effet, les cinq régions génomiques détectées pour la résistance au pathotype III ont été également associées à la résistance au pathotype I présent en France. La faible spécificité des QTL a également été observée vis-à-vis de différents critères de notations (racinaire, aérien) et conditions de test (chambre climatique, champ) réalisés à différents stades de développement de la plante. Une grande stabilité d'expression de la plupart des QTL vis-à-vis de différents environnements a été observée, seuls 5 des 27 méta-QTL identifiés ayant été détectés spécifiquement à partir d'environnements français ou américains. (iii) Des associations négatives entre allèles de résistance et allèles de traits morphologiques/phénologiques favorables à la sélection du pois protéagineux ont été identifiées, spécialement dans la source de résistance PI180693 à trois principaux QTL (associations résistance/feuilles normales (*af*), production d'anthocyanes (*A*) et tardiveté). Des associations alléliques positives ont également été mises en évidence, particulièrement à un QTL principal *Ae-Ps5.1* (associations résistance/ grains lisses (*R*)). (iv) Une diversité de gènes candidats sous-jacents aux principaux QTL a été identifiée, incluant des analogues de gènes de résistance ou gènes impliqués dans la reconnaissance plante-pathogène de type LRR (sous-jacents notamment au QTL à effet majeur *Ae-Ps7.6*), des gènes impliqués dans des mécanismes de défense ou de transduction de signaux (kinases, F-Box, enzymes de synthèse de la cellulose, de stress oxydatif, PR protéines...).

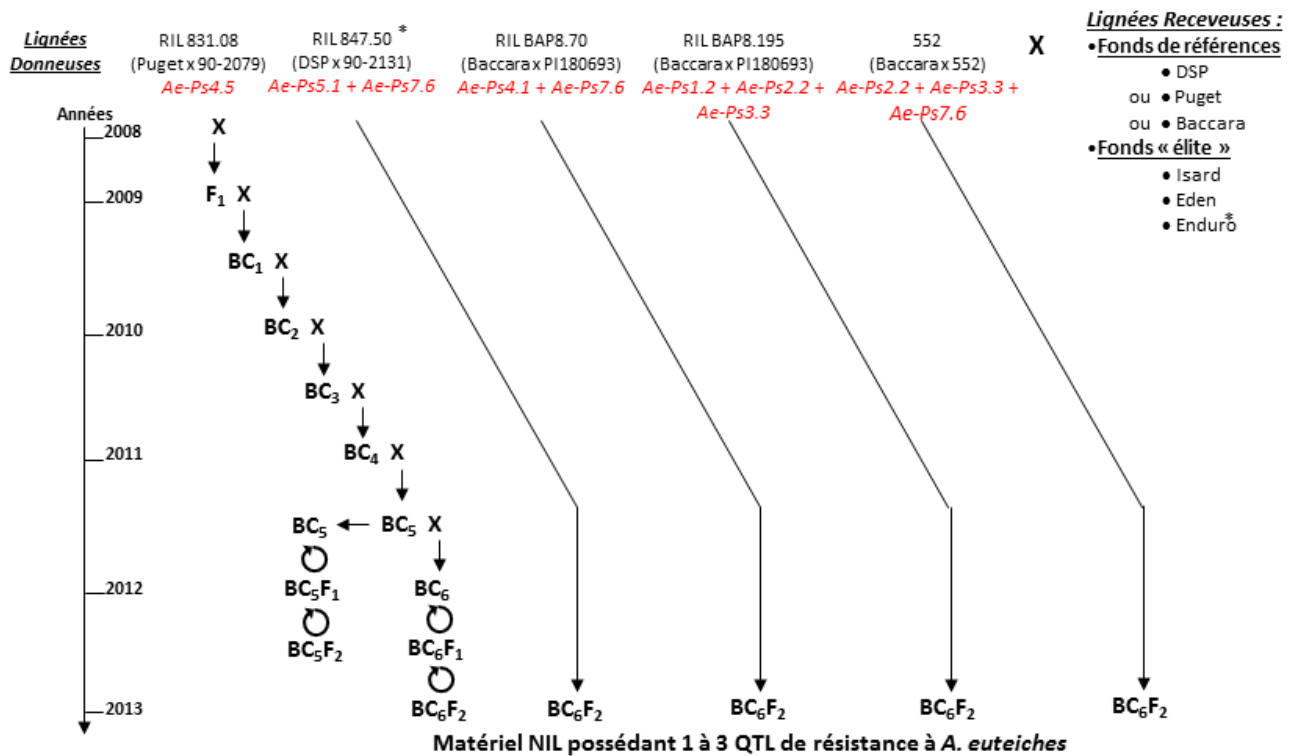


Figure 21 : Schéma de back-cross assisté par marqueurs développé dans le cadre du projet SAMAPH chez le pois.

Programme incluant 5 schémas parallèles d'introgression d'allèles aux 7 principaux QTL, à partir de 5 lignées dites « donneuses » dans plusieurs lignées dites « receveuses ». Les lignées « donneuses » choisies, qui sont les parents porteurs d'allèles de résistance aux QTL (en rouge), sont : le géniteur 552 (Gritton, 1990) et 4 RILs (831.08, 847.50, BAP8.195 et BAP8.70). Les lignées « receveuses », qui sont des parents sensibles, incluent, d'une part les lignées dites « de référence » (Puget, DSP ou Baccara) qui sont les lignées parentales sensibles des RIL « donneuses », d'autre part les variétés de pois élites Eden (pois de printemps, inscription Nickerson, 2004), Isard (pois d'hiver, inscription Agri-Obtentions, 2005) et Enduro* (pois d'hiver, inscription Florimond-Desprez, 2007). *Enduro n'a été utilisé en croisement qu'avec la lignée donneuse RIL847.50.

Depuis 2008, une étude de **génétique d'association** pour la résistance à *A. euteiches* a été conduite à l'INRA, à partir d'une collection dite « Aphanomyces » enrichie en sources de résistance, afin de valider les principaux QTL détectés précédemment et tracer les allèles de résistance dans les lignées de la collection. La collection établie a consisté en 175 lignées, incluant i) environ $\frac{2}{3}$ de lignées issues du programme de création de géniteurs « Aphanomyces » du GSP, ayant utilisé les génotypes 90-2131, 552 et PI180693 comme principales sources de résistance, ainsi que ii) environ $\frac{1}{3}$ de lignées issues des travaux INRA de génétique (meilleures RILs, meilleures sources de résistance) et de variétés de pois sensibles. La collection a été génotypée à l'aide des 13,204 SNPs de la puce Infinium® BeadChip récemment développée (Tayeh et al. 2015) et phénotypés pour la résistance en conditions contrôlées (2 souches) et au champ (9 environnements). L'analyse a permis d'identifier un total de 52 QTL d'intervalles inférieurs à 5 cM, couvrant les zones de 6 des 7 principaux QTL détectés par analyse de liaison (Desgroux et al. 2016). Elle a permis de mettre en évidence 14 régions de QTL consistants, ainsi que l'accumulation de « best haplotypes » à ces régions dans les lignées les plus résistantes directement issues de croisement entre les témoins partiellement résistants PI180693, 90-2131 et 552 (Desgroux et al. 2016).

De 2008 à 2013, un programme de **Back-cross Assisté par Marqueurs (BAM)** a été développé à l'INRA en collaboration avec l'UNIP et le GSP (projet SAMAPH) pour la création de NILs à un ou plusieurs des 7 principaux QTL de résistance. Les allèles de résistance présentant les effets les plus élevés et consistants aux 7 QTL ont été ciblés. Cinq schémas parallèles ont été développés pour l'introgession simultanée d'allèles de résistance à un, deux ou trois des 7 principaux QTL de résistance, à partir de cinq lignées dites « donneuses » dans trois lignées dites « receveuses » (Figure 21). Les NILs obtenues permettront de valider les effets et d'identifier les meilleures combinaisons de QTL permettant d'augmenter les niveaux de résistance mais aussi de caractériser les modes d'action et fonctions des principaux QTL.

2.3.3. MECANISMES DE RESISTANCE

Peu d'études ont été développées dans le monde pour mieux connaître les mécanismes biologiques ou moléculaires associés à la résistance à *A. euteiches*.

Les mécanismes d'action de la résistance sur le cycle de l'agent pathogène a fait l'objet de quelques études. Morrison (1971) a tout d'abord montré que la résistance quantitative chez le pois se traduisait essentiellement par la réduction du nombre d'oospores produites dans les

racines. Kraft et Boge (1994, 1996) ont développé diverses méthodologies pour évaluer la résistance à différentes phases du cycle, incluant le comptage d'oospores dans les racines, l'évaluation de la vitesse d'apparition et de progression des symptômes et de la vitesse de germination des zoospores dans les exsudats racinaires et la quantification d'antigènes de l'agent pathogène par ELISA. Ils ont ainsi montré que la résistance des lignées PI180693, 90-2131 et/ou 79-2022 était liée à une diminution de la multiplication d'*A. euteiches* dans les racines, à une moindre production d'oospores et à une moindre germination des zoospores dans les exsudats racinaires. Cette moindre germination serait due à la présence d'anthocyanes dans les exsudats de la lignée PI180693. Plus récemment, Vandemark et Grünwald (2005) ont utilisé une méthode de quantification par PCR de l'ADN de l'agent pathogène, pour suivre son développement dans la plante. Chez la lignée PI180693, une quantité modérée d'ADN d'*A. euteiches* a été détectée dans les racines sans conférer de symptômes. Les auteurs suggèrent que le développement de symptômes observés chez PI180693 serait en partie inhibé par des mécanismes qui confèrent une tolérance aux effets de la colonisation.

Les mécanismes moléculaires associés à la résistance à *A. euteiches* sont très mal connus chez le pois. En conditions contrôlées, Pueppke et VanEtten (1974) ont montré que le pois, infecté par *A. euteiches*, serait capable de produire une phytoalexine en grande quantité, la pisatine, et que la sensibilité du pois serait due à la capacité d'*A. euteiches* à tolérer cette molécule en la détoxifiant. Morin et al. (2008) ont identifié par SSH (Suppression Subtractive Hybridization) un total de 372 gènes différentiellement exprimés chez les géotypes 552 (partiellement résistant) et Baccara (sensible) en conditions d'inoculation ou non par *A. euteiches*. La validation de 92 d'entre eux par RT-PCR quantitative et par cartographie génétique en comparaison aux QTL identifiés, a permis d'identifier des gènes candidats d'intérêt. Plus récemment, Hosseini et al. (2015) ont identifié, par analyse transcriptomique un total de 574 et 817 gènes exprimés différemment en réponse à *A. euteiches* à 6 et 20 heures après l'inoculation (hpi), respectivement. Ils suggèrent que plusieurs voies de signalisation sont déclenchées chez le pois à un stade précoce de l'infection, conduisant à des mécanismes immunitaires tels que le renforcement de la paroi cellulaire, la régulation des voies de l'acide jasmonique et de l'éthylène et surtout une induction de la synthèse de chalcone à 20 hpi qui inhibent le transport de l'auxine. Chez la légumineuse modèle *Medicago truncatula*, Djebali et al. (2009) et Badis et al. (2015) ont montré par des analyses cytologiques que la résistance était liée à (i) une accumulation de composés phénoliques solubles et une accélération de la

fréquence de divisions dans les cellules du péri-cycle et (ii) à un dépôt de lignine sur les parois cellulaires du péri-cycle, protégeant ainsi le cylindre central racinaire de l'invasion par *A. euteiches*. Par ailleurs, des approches transcriptomiques et protéomiques ont également été menées chez l'espèce modèle afin d'identifier les gènes et protéines régulés chez *M. truncatula* suivant l'infection par *A. euteiches* (Colditz and Braun 2010; Nyamsuren et al. 2003). Récemment, Badis et al. (2015) ont identifié plus de 700 gènes sur-exprimés dans une NIL porteuse de l'allèle de résistance à *A. euteiches* au locus majeur *prAe1* (Djebali et al. 2009) par rapport à la NIL sensible correspondante. Le rôle de gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des flavonoïdes a été particulièrement validé par qRT-PCR et dosage de métabolites.

3. OBJECTIFS ET STRATEGIES DU TRAVAIL DE THESE

La compréhension des bases génétiques et moléculaires de la résistance est nécessaire afin de pouvoir créer des variétés comportant des résistances efficaces et durables. Une meilleure connaissance des modes d'action de la résistance quantitative sur les agents pathogènes est à ce jour nécessaire afin d'optimiser les stratégies de combinaison et de déploiement des QTL de résistance, qui permettront de préserver et d'augmenter les niveaux de résistance chez les plantes. Le pathosystème *Pisum sativum*/*A. euteiches* présente un enjeu économique majeur. Le re-développement de la culture du pois passera par la disponibilité de variétés résistantes à la pourriture racinaire. La sélection de variétés résistantes nécessite l'apport de connaissances pour mieux exploiter la résistance quantitative et orienter le choix des combinaisons de QTL à considérer.

Dans ce contexte, cette thèse a visé à déterminer les effets des principaux QTL de résistance à *A. euteiches*, seuls ou en combinaison, sur le niveau de symptômes de la maladie et à connaître leurs modes d'action sur certaines étapes du cycle infectieux de l'agent pathogène, en vue de leur gestion durable. Ces objectifs s'appuient sur trois questions de recherche : i) Quelle est la diversité des effets et modes d'action des principaux QTL de résistance à *A. euteiches* ? ii) Les effets des QTL sont-ils conservés en fonction du fonds génétique de la plante ? iii) La combinaison de QTL de résistance présentant des modes d'action variés et/ou similaires permet-elle d'augmenter l'efficacité de la résistance. ?

Afin de répondre à ces questions, la thèse s'est appuyée sur un panel de matériel végétal innovant de type NILs et a décliné une démarche d'étude en trois étapes pour l'étude de la

variabilité des effets et modes d'action des QTL qui correspondent aux trois chapitres de résultats de cette thèse. Ces trois étapes ont consisté à :

- ✓ Valider les effets des QTL, seul ou en combinaison, dans différents fonds génétiques sur la résistance à *A. euteiches* en conditions contrôlées.
- ✓ Identifier les combinaisons de QTL permettant d'augmenter la résistance au champ dans les NILs, au regard de leurs effets selon l'environnement et de la composition génomique des NILs.
- ✓ Etudier la diversité des modes d'action des QTL, seuls ou en combinaison, sur certaines étapes du cycle infectieux en conditions contrôlées.

Les résultats obtenus dans chacune des étapes sont présentés et discutés sous forme d'articles scientifiques. Puis dans le dernier chapitre, une discussion générale est présentée, ainsi que des perspectives pour la recherche et la sélection.

CHAPITRE II

*Variabilité des effets des QTL de
résistance à *Aphanomyces euteiches*
dans différents fonds génétiques en
conditions contrôlées*

CHAPITRE II : VARIABILITE DES EFFETS DES QTL DE RESISTANCE A *APHANOMYCES EUTEICHES* DANS DIFFERENTS FONDS GENETIQUES EN CONDITIONS CONTROLEES

1. INTRODUCTION DU CHAPITRE

La validation des QTL associés à la résistance aux maladies dans différents fonds génétiques est une étape importante et souvent négligée avant leur utilisation dans les programmes de sélection assistée par marqueurs et la recherche des mécanismes sous-jacents aux QTL. La validation des QTL contrôlant la résistance partielle à *A. euteiches* est d'un intérêt majeur pour le développement futur de variétés résistantes.

Les objectifs de ce chapitre de thèse ont donc été i) de décrire la création de NILs aux principaux QTL de résistance à *A. euteiches*, réalisée dans le programme de BAM développé à l'INRA (Projet SAMAPH), et ii) d'évaluer dans les NILs l'effet des QTL de résistance à *A. euteiches*, seuls ou en combinaison, en fonction de différents fonds génétique et de la variabilité du pathogène.

Les résultats obtenus dans ce chapitre ont permis i) d'évaluer la faisabilité du programme de sélection assistée par marqueurs pour introgresser un, deux ou trois QTL dans trois ou quatre fonds génétiques différents, ii) de confirmer la variabilité des effets des QTL observée précédemment dans les mêmes conditions (Hamon et al. 2013) et iii) d'évaluer la stabilité des effets des QTL, seuls ou en combinaison, une fois transférés dans de nouveaux fonds génétiques.

Ce chapitre de thèse est présenté sous la forme d'un article publié dans la revue *TAG (Theoretical and Applied Genetics)*.

2. ARTICLE PUBLIE

Validation of QTL for resistance to *Aphanomyces euteiches* in different pea genetic backgrounds using near-isogenic lines

C. Lavaud¹ · A. Lesné^{1,2} · C. Piriou^{1,3} · G. Le Roy^{1,3} · G. Boutet^{1,3} · A. Moussart^{3,4} · C. Poncet⁵ · R. Delourme¹ · A. Baranger^{1,3} · M.-L. Pilet-Nayel^{1,3}

Received: 6 May 2015 / Accepted: 10 July 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract

Key message Marker-assisted backcrossing was used to generate pea NILs carrying individual or combined resistance alleles at main *Aphanomyces* resistance QTL. The effects of several QTL were successfully validated depending on genetic backgrounds.

Abstract Quantitative trait loci (QTL) validation is an important and often overlooked step before subsequent research in QTL cloning or marker-assisted breeding for disease resistance in plants. Validation of QTL controlling partial resistance to *Aphanomyces* root rot, one of the most

damaging diseases of pea worldwide, is of major interest for the future development of resistant varieties. The aim of this study was to validate, in different genetic backgrounds, the effects of various resistance alleles at seven main resistance QTL recently identified. Five backcross-assisted selection programs were developed. In each, resistance alleles at one to three of the seven main *Aphanomyces* resistance QTL were transferred into three genetic backgrounds, including two agronomically important spring (Eden) and winter (Isard) pea cultivars. The subsequent near-isogenic lines (NILs) were evaluated for resistance to two reference strains of the main *A. euteiches* pathotypes under controlled conditions. The NILs carrying resistance alleles at the major-effect QTL *Ae-Ps4.5* and *Ae-Ps7.6*, either individually or in combination with resistance alleles at other QTL, showed significantly reduced disease severity compared to NILs without resistance alleles. Resistance alleles at some minor-effect QTL, especially *Ae-Ps2.2* and *Ae-Ps5.1*, were also validated for their individual or combined effects on resistance. QTL × genetic background interactions were observed, mainly for QTL *Ae-Ps7.6*, the effect of which increased in the winter cultivar Isard. The pea NILs are a novel and valuable resource for further understanding the mechanisms underlying QTL and their integration in breeding programs.

Communicated by D. E. Mather.

C. Lavaud and A. Lesné contributed equally to the work described in the manuscript.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00122-015-2583-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ M.-L. Pilet-Nayel
marie-laure.pilet@rennes.inra.fr

¹ INRA, UMR IGEPP 1349, Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, Domaine de la Motte au Vicomte, BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex, France

² Terres Univia, 11 rue de Monceau, CS 60003, 75378 Paris Cedex 08, France

³ PISOM, UMT INRA/Terres Inovia, UMR IGEPP 1349, Domaine de la Motte au Vicomte, BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex, France

⁴ Terres Inovia, 11 rue de Monceau, CS 60003, 75378 Paris Cedex 08, France

⁵ INRA, UMR GDEC 1095, Génétique, Diversité, Ecophysiologie des Céréales, 5 chemin de Beaulieu, 63039 Clermont-Ferrand Cedex 2, France

Introduction

A large number of Quantitative trait loci (QTL) have been identified in different plant species, but very few have been utilized in plant breeding programs. Difficulties integrating QTL information into breeding strategies have been due to the large number of QTL identified, the time it takes to generate improved populations

(St Clair 2010), but also to unexpected results obtained in QTL introgression programs (Hospital 2005). Thus, a very important step is to validate QTL effects before further research is pursued into QTL cloning, genomics studies, or Marker-Assisted Selection (MAS) to introgress QTL into new genetic backgrounds. Marker-Assisted Backcrossing (MAB) has been frequently used for QTL introgression (Collard and Mackill 2008; Hospital 2009). The goal of MAB is to incorporate a major gene or QTL from an agronomically inferior source (the donor parent) into an elite cultivar or breeding line (the recurrent or recipient parent). The desired outcome is a near-isogenic line (NIL) to the recurrent parent, containing the major allele at the gene or QTL from the donor parent, with the recurrent parent genotype present everywhere else in the genome (Hospital 2003; Kaeppler et al. 1993). NILs have been used advantageously to identify and validate QTL, as well as to produce fine maps, especially in tomato (Brouwer and St Clair 2004), wheat (Ma et al. 2011), maize (Koester et al. 1993), rice (Yu et al. 1991), barley (Schmalenbach et al. 2008), chickpea (Castro et al. 2010) and rapeseed (Delourme et al. 2008). In many studies, NILs allowed the QTL effect associated with introgressed segments to be confirmed. However, in some cases, after MAS the effect of a QTL was reduced or nullified. The loss of QTL effects can occur when the QTL (1) is a false positive, (2) is specific to some environments, (3) includes several genes and recombination between those genes modifies the effect of the introgressed segments or (4) has an epistatic effect with another QTL or with the genetic background (Collard and Mackill 2008; Hospital 2005). For example, Ahmadi et al. (2001) reported that MAS was particularly useful for validating epistatic effects between two QTL for resistance to rice yellow mottle virus, in introgression lines carrying both QTL compared to lines hosting only one of the two QTL which displayed no effects. The rate of unexpected results in MAS was reported to increase when QTL are used rather than known genes, when the number of QTL increases and when manipulating genetic components of more complex traits [complexity comes from the large number of genes controlling the trait, interactions between genes due to linkage and epistasis, low heritability and interaction between genes and environment (Hospital 2005)]. Disease resistances have often been reported to be inherited as simple traits or complex traits with major-effect QTL (St Clair 2010). There are many examples of successful validation of major resistance QTL effects in introgression or pyramiding lines (St Clair 2010). Subsequently, an increasing number of fine mapping studies of major-effect resistance QTL have been recently described (Keller et al. 2015). Several less successful attempts were also reported, such as

QTL detected with minor effects in specific environments (Delourme et al. 2008; Li et al. 2003).

Aphanomyces root rot of pea, caused by the soil-borne oomycete *Aphanomyces euteiches* (Jones and Drechsler 1925), is one of the most devastating diseases of peas worldwide. In Europe, the disease has spread since the 1990s due to the intensification of pea production (Wicker and Rouxel 2001) and can lead to total devastation of the crop in infested fields (Didelot and Chaillet 1995). Symptoms of the disease are translucent lesions on the rootlets, which evolve into brown rot affecting the entire root system up to the epicotyl (Moussart et al. 2008). Above ground, the disease causes stunted seedlings, yellow leaves and even dead plants. Two main *A. euteiches* pathotypes have been reported in pea (Wicker and Rouxel 2001) based on their differential reactions on a set of six genotypes (Wicker et al. 2003). Pathotype I is predominant in Europe and was observed in the United States. Pathotype III was observed at some locations in the United States [Onfroy et al. (2015) submitted]. The use of partial polygenic resistance to *A. euteiches* has been considered as a key component of disease management for forty years (Papavizas and Ayers 1974). Breeding of pea lines resistant to *A. euteiches* was first developed in the United States. Genetic resources and agronomic lines with partial levels of resistance were identified, including the breeding lines 90-2079 and 90-2131 (Kraft 1992), 552 (Gritton 1990) and the landrace PI180693 (Lockwood and Ballard 1960). The latter three lines were then confirmed among the highest partially resistant lines in France (Pilet-Nayel, unpublished data). Using Recombinant Inbred Line (RIL) populations derived from crosses involving the four sources of resistance, a comprehensive meta-QTL mapping program identified seven QTL out of 27 meta-QTL associated with resistance to *A. euteiches* (Hamon et al. 2011, 2013; Pilet-Nayel et al. 2002, 2005). Each of the seven QTL was detected consistently in two to four RIL populations from at least 12 initial variables out of the total 29 field environment and 12 controlled condition variables studied. In particular, one major-effect QTL, *Ae-Ps7.6* located on Linkage Group VII (LGVII), was consistently identified and explained up to 60 % of the phenotypic variation, depending on environments and isolates. The other QTL contributed up to 15–44 % of the variation depending on the QTL (Hamon et al. 2013). A quite low diversity of non-specific QTL to sources of resistance was observed, suggesting a common genetic origin between the partially resistant parental lines studied. A low specificity of resistance QTL was also shown according to the strains, environments and scoring criteria studied. Negative associations between resistance and undesirable morphological alleles (normal leaves and flower color) for dry pea breeding, especially alleles originating from PI180693, were found. Epistatic interactions contributing to increased

resistance were also identified, especially between the two main QTL *Ae-Ps7.6* and *Ae-Ps2.2*. SSR markers linked to the seven main QTL identified have been made available for use in MAS (Hamon et al. 2013). However, although the main QTL were detected over different RIL populations, their effect remains to be validated when introgressed into new genetic backgrounds as no knowledge is available about *Aphanomyces* resistance QTL $\times$ genetic background interactions.

The aims of this study were to validate individual or multiple *Aphanomyces* resistance QTL effects in different genetic backgrounds using introgression lines. First, an extensive backcross-assisted selection program was conducted to generate NILs carrying resistance alleles at one to three of the seven main resistance QTL in three genetic backgrounds. Second, the generated NILs were phenotyped for resistance to two reference strains of the main *A. euteiches* pea pathotypes, for validating QTL effects, individually or in combination, in the different genetic backgrounds under controlled conditions. This study provides unprecedented pea resources and knowledge for QTL validation, future QTL genomic studies and demonstrates the potential of MAS for creating resistant agronomic germplasm for release.

Materials and methods

Plant material for MAB

Five parallel MAB schemes were developed, each scheme aiming to simultaneously introgress resistance alleles at one to three QTL from one donor line into three recipient lines. The five donor lines used in the MAB schemes included four RILs (RIL 831.08, RIL 847.50, RIL BAP8.70 and RIL BAP8.195) from previously studied mapping populations (Hamon et al. 2013) and the partially resistant garden pea breeding line 552 also analyzed in Hamon et al. (2011) (Table 1). Each donor RIL was chosen to carry allele(s)

from its resistant parent at the one to three target QTL and alleles from its susceptible parent at a maximum number of markers outside the target QTL (Supplementary data file 1). Eleven of the 16 resistance alleles identified at the seven main resistance QTL (Table 3 in Hamon et al. 2013) were targeted for introgression from the five donor lines, based on their level and/or consistency of effects on resistance previously identified. These included three resistance alleles (90-2131, PI180693 and 552) at the major-effect QTL *Ae-Ps7.6*, two resistance alleles (PI180693 and 552) at QTL *Ae-Ps2.2* and *Ae-Ps3.1* and one resistance allele (90-2079, 90-2131 or PI180693) at each of the four other main QTL.

The three recipient parents used in each MAB scheme included (1) a reference line, which was the susceptible parent of the RIL population in which QTL were detected, i.e., Baccara (Hamon et al. 2011), DSP (Hamon et al. 2013) or Puget (Pilet-Nayel et al. 2002) and (2) two dry pea agronomic lines of different sowing types, i.e., the spring cultivar Eden and the winter cultivar Isard. A fourth recipient parent, the winter dry pea cultivar Enduro, was also used in one of the five MAB schemes (donor line RIL 847.50), due to its higher agronomic value (Table 2).

NIL production

The breeding scheme for introgression of the target QTL is shown in Fig. 1. Sixteen bi-parental crosses between donor (as male) and recipient (as female) lines were carried out. Plant progenies from each cross were repeatedly backcrossed with the recipient parent in greenhouse conditions, with two generations per year.

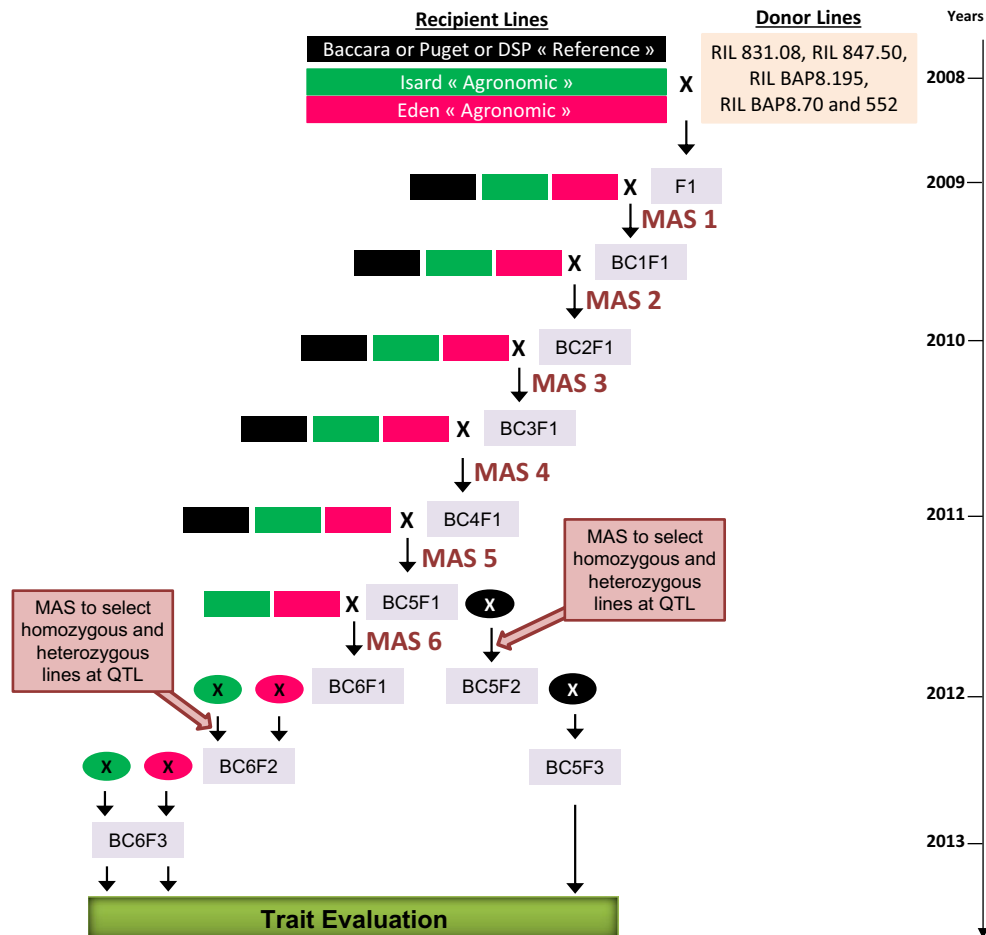
At each backcross generation, 45–91 15-day-old plants were genotyped using microsatellite markers, to select plants carrying one, two or three QTL introgressions, respectively. During genotyping, growth of the young plants was slowed down in a growth chamber at 5 °C and 8-h photoperiod for about 1 month. Plants carrying the donor introgressions at all the target QTL (heterozygous at

Table 1 Donor lines used for MAB

Donor line	Donor	RIL cross of origin	Target QTL for MAB (Hamon et al. 2013)	Resistance enhancing alleles at target QTL	References
RIL 831.08	USDA, USA	Puget * 90-2079	<i>Ae-Ps4.5</i>	90-2079	Pilet-Nayel et al. (2002, 2005)
RIL 847.50	USDA, USA	DSP * 90-2131	<i>Ae-Ps5.1</i> , <i>Ae-Ps7.6</i>	90-2131	Hamon et al. (2013); McGee et al. (2012)
RIL BAP8.70	INRA, France	Baccara * PI180693	<i>Ae-Ps4.1</i> , <i>Ae-Ps7.6</i>	PI180693	Hamon et al. (2011)
RIL BAP8.195	INRA, France	Baccara * PI180693	<i>Ae-Ps1.2</i> , <i>Ae-Ps2.2</i> , <i>Ae-Ps3.1</i>	PI180693	Hamon et al. (2011)
552	University of Wisconsin, USA		<i>Ae-Ps2.2</i> , <i>Ae-Ps3.1</i> , <i>Ae-Ps7.6</i>	552	Gritton (1990)

Table 2 Recipient lines used for MAB

Recipient parent	Parents type for MAB	Cultivar type	Registration year	Breeder
Puget	Reference	Spring garden pea	1967	Brotherton Seed Company, UK
Dark Skin Perfection (DSP)	Reference	Spring garden pea	1960	Unilever limited, UK
Baccara	Reference	Spring dry pea	1992	Florimond-Desprez, France
Eden	Agronomic	Spring dry pea	2004	Nickerson, France
Enduro	Agronomic	Winter dry pea	2007	Florimond-Desprez, France
Isard	Agronomic	Winter dry pea	2005	Agri-Obtentions, France

**Fig. 1** The marker-assisted backcrossing scheme used to construct NILs at the main *Aphanomyces* resistance QTL. A fourth recipient parent (not presented), the winter cultivar Enduro, was also used in one of the five MAB schemes (donor line RIL 847.50)

markers linked to QTL) and the highest level of recipient genome outside the target QTL were selected and transplanted in greenhouse conditions. One to five selected plants were used for producing the next backcross progeny, by manual outcrossing with the recipient parent.

Five backcrossed generations were produced from four crosses (Puget $\times$ RIL 831.08, DSP $\times$ RIL 847.50, Baccara $\times$ RIL BAP8.70 and Baccara $\times$ RIL BAP8.195), in which the donor lines initially carried portions of the

reference recipient line genomes. Six backcrossing generations were performed from the other crosses to improve recovery of genomes of the recipient lines, except for the Isard $\times$ RIL BAP8.70 and Enduro $\times$ RIL 847.50 crosses for which only five generations of backcrosses could be carried out (Table 3).

BC5/6F1 progenies were then self-pollinated to select, in subsequent QTL pseudo-F2 populations, homozygous plants carrying resistance alleles at zero, one, two or three

Table 3 Near-isogenic lines (NILs) developed at Aphanomyces resistance QTL

Donor Line	Recipient Line	NIL set number	Target QTL	Fixity generation ^a	Genetic divergence generation ^b	No. of markers for MAS ^c		RGC % ^d (min-max)	No. of NILs selected ^e			
						QTL	Outside QTL (min-max)		0 QTL	1 QTL	2 QTL	3 QTL
RIL 831.08	Puget	1	<i>Ae-Ps4.5</i>	BC ₃ F ₂	BC ₃ F ₂	3	43-46	98-100	2	2		
	Isard	2	<i>Ae-Ps4.5</i>	BC ₆ F ₂	BC ₆ F ₂	4	68-72	99-100	2	2		
	Eden	3	<i>Ae-Ps4.5</i>	BC ₆ F ₂	BC ₆ F ₂	5	65-70	100	2	2		
RIL 847.50	DSP	4	<i>Ae-Ps5.1 + Ae-Ps7.6</i>	BC ₃ F ₂	BC ₃ F ₂	5-3	57-65	94-100	2	4	2	
	Isard	5	<i>Ae-Ps5.1 + Ae-Ps7.6</i>	BC ₆ F ₂	BC ₄ F ₁	4-5	60-69	98-100	2	4	2	
	Eden	6	<i>Ae-Ps5.1 + Ae-Ps7.6</i>	BC ₆ F ₂	BC ₆ F ₁	4-4	65-73	99-100	2	4	2	
	Enduro	16	<i>Ae-Ps5.1 + Ae-Ps7.6</i>	BC ₃ F ₂	BC ₃ F ₁	3-4	47-55	100	2	4	2	
	Baccara	7	<i>Ae-Ps4.1 + Ae-Ps7.6</i>	BC ₃ F ₂	BC ₃ F ₁	2-3	57-62	97-100	2	4	2	
	Isard	8	<i>Ae-Ps4.1 + Ae-Ps7.6</i>	BC ₃ F ₂	BC ₄ F ₁	2-5	43-51	98-100	2	4	2	
RIL BAP8.195	Eden	9	<i>Ae-Ps4.1 + Ae-Ps7.6</i>	BC ₆ F ₂	BC ₆ F ₁	2-4	29-35	100	2	4	2	
	Baccara	10	<i>Ae-Ps1.2 + Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1</i>	BC ₃ F _{2/3}	BC ₂ F ₁	3-3-3	68-74	99-100	4●●●	8●●●	2●	0●
552	Isard	11	<i>Ae-Ps1.2 + Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1</i>	BC ₆ F _{2/3}	BC ₆ F ₁	3-3-3	63-72	97-100	2	6	6	3●●●
	Eden	12	<i>Ae-Ps1.2 + Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1</i>	BC ₆ F _{2/3}	BC ₆ F ₁	3-3-3	45-54	96-100	2	6	4●●	2
	Baccara	13	<i>Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1 + Ae-Ps7.6</i>	BC ₆ F _{2/3}	BC ₆ F ₁	4-2-4	57-68	100	2	6	4●	2
	Isard	14	<i>Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1 + Ae-Ps7.6</i>	BC ₆ F _{2/3}	BC ₄ F ₁	4-1-4	52-61	98-100	2	6	5●●	1●●
	Eden	15	<i>Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1 + Ae-Ps7.6</i>	BC ₆ F _{2/3}	BC ₃ F ₁	4-1-4	49-58	98-100	2	6	6	2
Total no. of NILs selected									34	72	41	10

^a Generation from which homozygous NILs at QTL was selected^b Generation from which the selected homozygous NILs carrying same allele combinations (two sister lines per NIL type) diverged^c Total number of markers used in each cross for controlling (1) each introgression at the target QTL at each MAB generation and (2) return to the recipient line genome in regions outside the QTL over all the MAB generations, in each homozygous NIL set at the fixity generation (minimum and maximum per NIL set)^d Minimal and maximal percentages of Recipient Genome Content in each homozygous NIL set at the fixity generation, calculated by the ratio between the number of markers outside the target QTL for which NILs are homozygous for the recipient alleles and the total number of polymorphic markers tested outside the target QTL in the NIL set. RGC values are relative to the number of markers tested outside the target QTL in each NIL set^e Number of NILs selected, homozygous at 0, 1, 2 or 3 resistance QTL. Two sister NILs with same introgressions were usually selected in each cross. QTL allelic combinations for which at least three, one or no NIL could be selected in each cross are indicated by ●●●, ●● and ●, respectively. In Baccara x RIL BAP8.195, the number of each NIL type selected was higher since the MAB scheme was divided into two parts from BC2 for bi-QTL introgressions (*Ae-Ps1.2 + Ae-Ps2.2* and *Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1*), due to no identification of plants carrying the three target introgressions

QTL. A total of 91–273 BC5/6F2 plants were screened, depending on the number of segregating QTL. In some crosses, a second generation of self-pollination was necessary to select BC5/6F3 homozygous lines carrying resistance alleles at three QTL. In each cross, two of the selected homozygous plants per allelic combination at target QTL, named “sister” lines, were self-pollinated to increase seed and the BC5/6F3/4 seeds were used for pathological tests.

Marker-assisted selection

Over all the backcross and selfing generations during NIL production, 152 microsatellite markers were used for MAS, including 99 SSR markers (Simple Sequence Repeats) from Loridon et al. (2005) and 53 EST-SSR markers (Expressed Sequence Tags-Simple Sequence Repeats, named “eSSRs”; Mohamadi, unpublished data).

A total of 37 markers (32 SSRs and 5 eSSRs) previously associated with the seven main resistance QTL to *A. euteiches* (Hamon et al. 2013) were used to control introgressions at each MAS generation (Fig. 2). One to five markers, depending on their level of polymorphism between the donor and recipient lines, were used for tracing each QTL, the size of which was estimated at 9–37.5 cM when projected onto the consensus genetic map of Duarte et al. (2014). Most of the QTL were controlled with at least three markers (Supplementary data file 1).

A total of 115 markers (67 SSRs and 48 eSSRs), regularly distributed on the genome (Supplementary data file 1; Fig. 2), was used over all the MAS generations to control that the genome had returned to the recipient type. One to three markers per QTL carrier- or non-carrier linkage group were used at each generation from BC1F1 to BC4F1. All the remaining polymorphic markers were used to check the recipient genome in BC5F2 and BC6F2/3. A Recipient Genome Content (RGC) value was calculated for each homozygous NIL as the percentage of markers among all those tested outside the target QTL, which revealed alleles from the recipient parent.

SSR genotyping

At each MAS generation, foliar tissues were harvested from each plant at the four-leaf stage and freeze-dried. Total DNA was extracted from freeze-dried leaf material using a NucleoSpin 96 Plant II Core Kit (Macherey–Nagel GmbH & Co. KG, Germany), following the manufacturer’s instructions. PCRs were carried out in a total volume of 7 μ L, containing 20 ng genomic DNA template, 1X PCR Polymerization Buffer, 0.2 mM of dNTPs, 2 mM of $MgCl_2$, 0.13 pM of the forward primer coupled to a 19-base M13 tail in 5′, 0.26 pM of the reverse primer and 0.5 Units of *Taq* DNA polymerase (reagents from Promega, USA). PCR

Fig. 2 Genetic map positions of the seven main *Aphanomyces* resistance QTL and markers used in the Marker-assisted backcrossing scheme for NIL production. Positions (in cM Haldane) of markers indicated in black on each Linkage Group (LG) were determined from the consensus genetic map reported in Duarte et al. (2014). Positions of markers indicated in red, purple, and orange were estimated from Hamon et al. (2013), Loridon et al. (2005) and Mohamadi (unpublished data), respectively. Positions of target fragments at the seven main QTL, named “*Ae-Ps.-*”, are indicated by green bars and were estimated from Hamon et al. (2013)

products were labeled by adding a universal M13 oligonucleotide labeled with the fluorescent dye, 6-FAM, to the PCR reaction. Thermocycling was carried out as follows: denaturation at 94 °C for 4 min; followed by 10 cycles at 94 °C for 30 s, annealing at the required temperature for 45 s and extension at 72 °C for 1 min; then, 30 cycles at 94 °C for 30 s, annealing at 51 °C for 45 s and extension at 72 °C for 1 min; followed by a final extension step at 72 °C for 10 min. The annealing temperature (T_a) was optimized for each locus (Supplementary data file 1). PCR products were sent to the GENTYANE genotyping platform (INRA Clermont-Ferrand, France) to be loaded on an ABI3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems®, USA). PCR amplification results were analyzed using GeneMapper® Software v.4.0 (Applied Biosystems®, USA).

Evaluation of NILs for resistance

Two single spore strains of *A. euteiches* were used to assess NIL disease resistance in tests under controlled conditions. The RB84 strain was isolated from a French infested soil (Riec-sur-Belon, Finistère) (Moussart et al. 2007) and is the reference for pathotype I. The Ae109 strain was isolated from American soil (Wisconsin) (Malvick et al. 1998) and is the reference for pathotype III. Fourteen pea control lines were used in the disease test, including the five donor and six recipient parents of the MAB scheme and three partially resistant parental lines of RIL populations (PI180693, 90-2131 and 90-2079).

Disease resistance tests were performed in a growth chamber, using a modified version of the standardized test developed for evaluating pea resistance to *A. euteiches* (Moussart et al. 2001). For each strain, all the lines were evaluated within two tests, in a randomized complete block design with two blocks as replicates per test. In each block, five seeds of a single genotype were sowed in one pot containing unsterilized vermiculite. Plants were grown under constant conditions at 25 °C for 16 h of day and 23 °C for 8 h of night. Seven days after sowing, seedlings were inoculated with 5 ml per plant of a suspension of zoospores concentrated at 200 spores per ml, from a pure culture of the French or American strain. Zoospores were produced as previously described by Moussart et al. (2001). The



vermiculite was saturated by capillary watering after inoculation to favor disease development and avoid zoospores leaching. Seven days after inoculation, disease severity (DS) on each uprooted and washed plant was assessed according to a 0 to 5 scoring scale (Moussart et al. 2008) (0 = no symptoms; 1 = traces of discoloration on the roots (<25 %); 2 = discoloration of 25–50 % of the roots; 3 = discoloration of 50–75 % of the roots; 4 = discoloration of >75 % of the roots; 5 = plant dead).

Data analysis

Statistical analyses of phenotypic data were performed using R software (R Development Core Team 2014). For each strain, the absence of genotype $\times$ test interactions was checked with a linear model, using the ‘Anova’ function of the ‘car’ package (John and Sanford 2011). Then, the DS scoring data obtained for all the NILs, or each NIL set per cross or donor line, were analyzed using a linear mixed model [LMM; ‘lmer’ function, ‘lme4’ package (Bates et al. 2014)], considering the DS scoring data as explanatory variables, the genotype as fixed factor and the replicate as random factor. A Wald F test was applied for evaluating genotypic effect ($\alpha = 5\%$). Broad sense heritability (h^2) was estimated from an analysis of deviance table using the formula $h^2 = \sigma^2_g / [\sigma^2_g + (\sigma^2_e/n)]$ [‘pbkrtest’ package (Halekoh and Højsgaard 2013)], where σ^2_g is the genetic variance, σ^2_e is the residual variance and n is the number of replicates per line. Least square means (LSMeans) were estimated for each line using the ‘lsmeans’ function of the ‘lsmeans’ package (Lenth and Herve 2015). LSMeans values were compared between each other with the pairwise contrast or multiple comparison Tukey HSD or Tukey test ($\alpha = 5\%$), using the ‘pairs’ or ‘cld’ functions of the ‘MultcompView’ package (Graves et al. 2012). Pearson correlation coefficients were calculated between the two strain LSMeans data ($\alpha = 5\%$).

Results

Construction of NILs at the main *Aphanomyces* resistance QTL

A total of 157 NILs were selected from the 16 MAB crossing programs conducted over 6 years (2008–2013) (Fig. 1). These were homozygous at zero to three of the seven main target resistance QTL (Table 3). Two homozygous NILs per allelic combination at the target QTL, known as sister NILs, could usually be selected in each cross. However, only one or no NIL was found for six allelic combinations at two to three QTL in four different crosses. Five combinations in two crosses were each represented by more than

two NILs (Table 3). All the sister NILs diverged from each other in later generations (BC4F1 to BC6F1), except those from Baccara $\times$ RIL BAP8.195 which was divided into two bi-QTL introgression schemes from BC2 because no plants were selected carrying introgressions at the three QTL initially targeted.

The 157 homozygous NILs at QTL were coded as follows: NIL“NIL set number”-“0 for zero QTL or QTL number(s)” “sister NIL letter (a or b)” (Supplementary data file 1). They were characterized for two morphological traits, i.e., type of leaves and flower color (Supplementary data file 1). NILs carrying resistance alleles from RIL BAP8.195 at QTL *Ae-Ps1.2* and *Ae-Ps2.2* had normal leaves and purple flowers, respectively.

The size of the genome fragment containing the QTL which was introgressed in NILs could not be estimated precisely due to the low density of available SSR markers. In some cases, the introgression was larger than the initial target fragment since the recipient genome in the QTL flanking regions was not recovered (Supplementary data file 1). In contrast, some portions of target fragments, not controlled by markers, may have been lost in several NILs, e.g., the QTL *Ae-Ps3.1* in three NIL sets (13, 14 and 15). Variations in introgression size resulted from differences in the number of polymorphic markers, between the donor and recipient parents, available for controlling introgressions at the target QTL and return to recipient genomes in QTL flanking region.

In each final selected NIL, a total of 29–74 SSR markers tested outside the target QTL, depending on their level of polymorphism between donor and recipient lines, were used to examine the return to the recipient genome (Table 3, Supplementary data file 1). Each QTL homozygous NIL selected carried the recipient type allele at 94–100 % of the markers tested outside the target QTL. Out of all the QTL homozygous NILs, only six NILs (NIL1-4.5b, NIL7-4.1/7.6b, NIL12-2.2a-b, NIL12-1.2/2.2a and NIL12-1.2/2.2/3.1a) have a fragment of the donor line outside the target QTL according to the SSR markers tested.

Based on all the SSR markers tested in or outside the QTL regions, the genomic composition of sister NILs was identical, except in two NIL sets (11 and 15), which comprised five pairs of sister NILs carrying different introgression sizes at QTL *Ae-Ps2.2* or *Ae-Ps7.6*.

Evaluation of NILs for *Aphanomyces* resistance under controlled conditions

For both strains, genotype $\times$ test interactions were not significant ($P = 0.30$ and 0.99 , for RB84 and Ae109 strain, respectively). LMM analysis of DS scoring data for all the NILs showed a highly significant genotypic effect ($P < 0.001$) for each strain test. Heritability estimates of the

trait observed in the tests were high, i.e., 0.93 for the RB84 strain and 0.91 for Ae109. LSMeans of DS scores and standard errors obtained for each NIL with the two strains are detailed in Supplementary data file 2, and averaged 3.24 ± 0.14 for RB84 and 2.93 ± 0.13 for Ae109 for all the NILs tested. Frequency distributions of DS LSMeans values for all the NILs tended to fit normal curves with both strains (Fig. 3). However, a group of 12 highly resistant NILs to the Ae109 strain was separated from the other lines. This group contains (1) all the NILs carrying QTL *Ae-Ps4.5* from RIL 831.08 and (2) six NILs carrying QTL *Ae-Ps7.6*, individually and/or in combination with other QTL, from three donor parents (RIL 847.50, RIL BAP8.70 and 552) in the recipient line Isard. The control lines tested ranked as expected for DS LSMeans with the two strains. In particular, the donor parents RIL 847.50, RIL BAP8.70 and RIL BAP8.195 were the most partially resistant controls to the RB84 strain with scores between 1.7 and 2.7 and RIL 831.08 was the most resistant to the Ae109 strain with a score of 0.6 (Fig. 3). Levels of susceptibility of the recipient parents were similar for the RB84 strain (scores of 3.56–3.87), while they were more variable for the Ae109 strain (score of 2.85–3.4). The Pearson correlation coefficient between RB84 and Ae109 LSMeans data for all NILs was 0.28 ($P < 0.001$).

Histograms of DS LSMeans scores obtained for each of the 16 NIL sets with the two strains are shown in Fig. 4 and Supplementary data file 3, in comparison to parental line values. LSMeans of NILs without introgressions were not significantly different from those of the recipient parents, except for the NIL14-0b.

Three NIL sets showed significant LSMeans differences between NILs and their parental lines in the

reference genetic backgrounds (Fig. 4). In two of the three NILs sets, the effects of 90-2131 and PI180693 resistance alleles at QTL *Ae-Ps7.6*, individually and/or in combination with the 90-2131 allele at QTL *Ae-Ps5.1* or PI180693 allele at QTL *Ae-Ps4.1*, were validated for resistance to the RB84 strain in the reference recipient lines. The DSP $\times$ RIL 847.50 NILs carrying the single QTL *Ae-Ps5.1* or *Ae-Ps7.6* were significantly more resistant to RB84 than the recipient parent (Fig. 4A). The combination of the two QTL had a significantly increased effect compared to the two single QTL effects in the NILs tested (Figs. 4, 5). The Baccara $\times$ RIL BAP8.70 NILs carrying the single QTL *Ae-Ps7.6* were also significantly more resistant to RB84 than the recipient parent, whereas NILs carrying QTL *Ae-Ps4.1* were not significantly different from the recipient parent. The combination of QTL *Ae-Ps7.6* and *Ae-Ps4.1* had a greater effect than the single *Ae-Ps7.6* QTL effect (Fig. 4B). In the third NIL set, the effect of the 90-2079 allele from RIL 831.08 at QTL *Ae-Ps4.5* was also validated for resistance to Ae109, but not to the RB84 strain, in the reference recipient line (Fig. 4C, Supplementary data file 3).

In two other NIL sets, significant but smaller LSMeans differences were observed between NILs carrying either the QTL *Ae-Ps2.2* from RIL BAP8.195 or the QTL *Ae-Ps7.6* (combined or not with *Ae-Ps2.2* and/or *Ae-Ps3.1*) from 552, and the reference recipient line Baccara with the RB84 strain.

Analysis of QTL $\times$ genetic background interactions

The main QTL effects observed in the reference recipient lines with each strain were confirmed in the other recipient

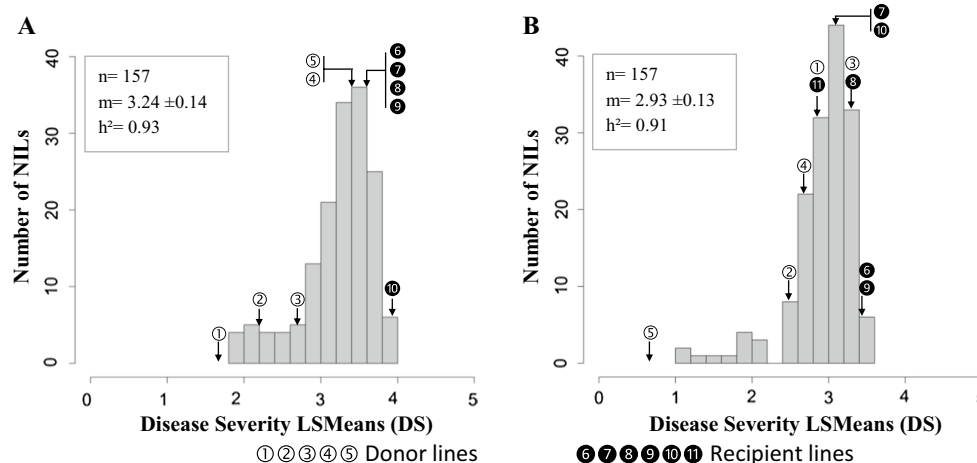


Fig. 3 Frequency distribution of disease severity (DS) of the 157 NILs produced by MAB, for resistance to two strains of *A. euteiches*, **A** RB84 strain, **B** Ae109 strain. DS LSMeans values of the donor lines are shown in white: 1-RIL 847.50, 2-RIL BAP8.195, 3-RIL BAP8.70,

4-552 and 5-RIL 831.08, respectively. The values of the recipient lines are shown in black: 6-Eden, 7-Isard, 8-DSP, 9-Puget, 10-Baccara and 11-Enduro, respectively. n total number of NILs assessed, m mean $\pm$ standard error of the total NILs, h^2 heritability estimate

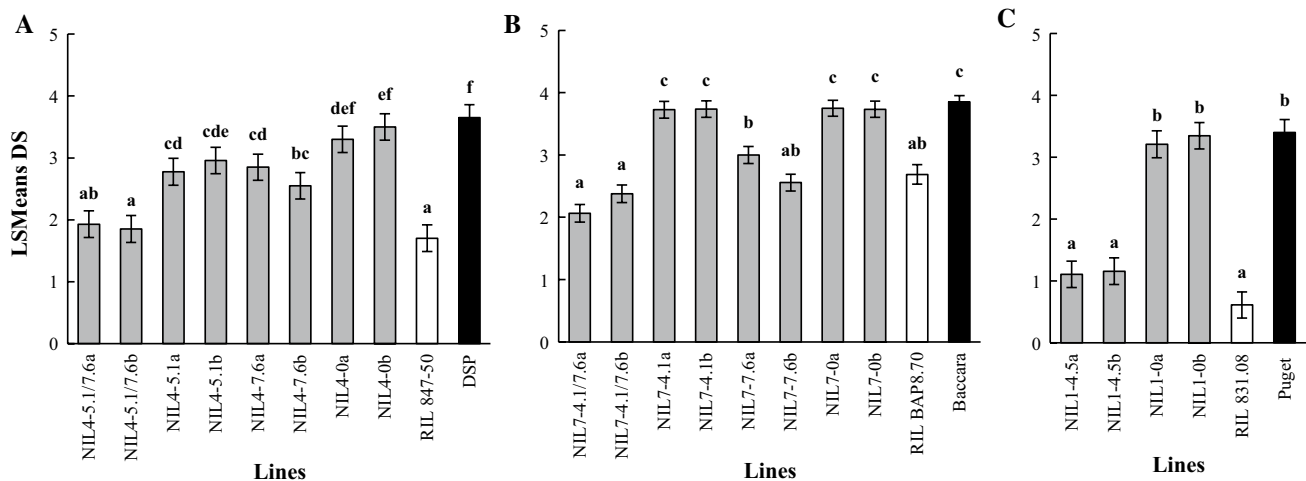


Fig. 4 Comparison of disease severity (DS) between NILs and parental lines, in three NIL sets, produced in reference genetic backgrounds **A** DSP × RIL 847.50, **B** Baccara × RIL BAP8.70 and **C** Puget × RIL 831.08. White, black, and gray bars indicate DS

LSMeans values with the RB84 strain (**A**, **B**) or Ae109 strain (**C**) of the donor parent, the recipient parent and the NIL set, respectively. Bars standard errors. LSMeans labeled with different letters differ significantly ($P < 0.05$, Tukey HSD)

lines. QTL × genetic background interactions were identified mainly for QTL *Ae-Ps7.6* and to a lesser extent for QTL *Ae-Ps4.1*, *Ae-Ps4.5* and *Ae-Ps5.1*, by analyzing the data in the NIL sets showing the highest effects, from the three donor lines RIL 847.50, RIL BAP8.70 (RB84 strain) and RIL 831.08 (Ae109 strain) (Fig. 6). QTL × genetic background interactions were also noted for QTL *Ae-Ps2.2* from RIL BAP8.195 and QTL *Ae-Ps7.6* from 552, depending on the strain (Supplementary data file 3). The three alleles (PI180693, 90-2131 and 552) introgressed at QTL *Ae-Ps7.6* conferred significantly different levels of effects in each agronomic recipient line.

Introgressions of the 90-2131 resistance alleles at QTL *Ae-Ps5.1* and *Ae-Ps7.6* from RIL 847.50 had different effects on resistance to RB84, depending on the recipient line (Fig. 6A). The effect of QTL *Ae-Ps7.6* alone was significantly higher in Isard than in DSP and Eden, with differences in the DS LSMeans values between the NILs carrying and not carrying the QTL at 1.3, 0.7 and 0.8, respectively. The QTL *Ae-Ps5.1* only had an effect in DSP. The effect of the two combined QTL was similar in Isard and DSP, and significantly higher than in Eden (LSMeans differences of 1.2, 1.5 and 0.7, respectively, between NILs with and without the two QTL). However, the two QTL in DSP provided the same level of resistance as the single QTL *Ae-Ps7.6* in Isard.

Interactions between the PI180693 resistance allele at QTL *Ae-Ps7.6* from RIL BAP8.70 and recipient lines were also observed for RB84, with a significantly greater effect in Isard than in Baccara and Eden (LSMeans differences between NILs with or without the QTL were 1.0, 1.0 and 0.4, respectively) (Fig. 6B). The PI180693 allele at QTL *Ae-Ps4.1* did not confer resistance when introgressed individually into



Fig. 5 Comparison of Root Rot symptoms between two NILs from the DSP × RIL 847.50 NIL set, either carrying donor introgressions or not at the two QTL *Ae-Ps7.6* and *Ae-Ps5.1*. Symptoms are shown at seven days after inoculation with the RB84 strain

the three recipient lines. When used in combination with QTL *Ae-Ps7.6*, QTL *Ae-Ps4.1* increased significantly the level of resistance in the spring recipient lines Baccara and Eden whereas it decreased resistance in Isard, compared with

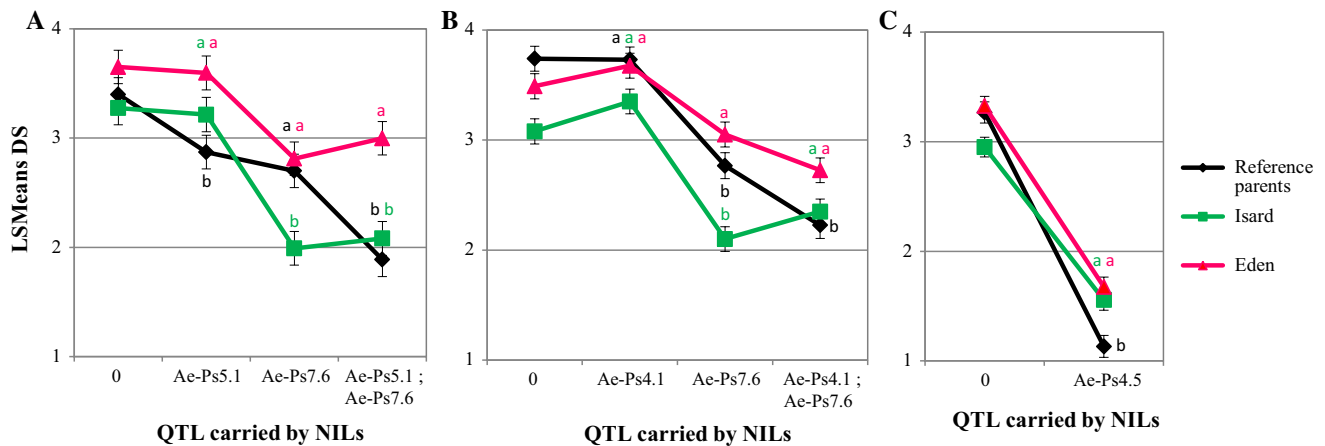


Fig. 6 Effects of individual or a combination of *Aphanomyces* resistance QTL, in NILs carrying introgressions from the donor lines, **A** RIL 847.50, **B** RIL BAP8.70 and **C** RIL 831.08, in different recipient lines. Each value is the average of DS LSMeans obtained for the two sister lines of each NIL type, with the RB84 strain (**A**, **B**) or Ae109 strain (**C**). Bars standard errors. LSMeans differences between

NILs with or without QTL that are labeled with *different letters* differ significantly in the three recipient lines ($P < 0.05$, Tukey). Black, green, and pink lines indicate the reference parents (DSP or Baccara or Puget) and the agronomic recipient parents Isard and Eden, respectively

the effect of the single QTL *Ae-Ps7.6* (LSMeans differences between NILs with the single QTL *Ae-Ps7.6* and NILs with the two QTL are 0.2 in Isard, 0.5 in Baccara and 0.3 in Eden).

Introgressions of the 90-2079 resistance allele at QTL *Ae-Ps4.5* from RIL 831.08 had a strong effect in the three genetic backgrounds on resistance to the Ae109 strain, with a slightly but significantly higher effect in Puget than in Eden and Isard (Fig. 6C).

Discussion

Validation of QTL for resistance to *A. euteiches* in different pea genetic backgrounds is essential for further genetic research and integration of QTL in MAS. We used MAB to generate a unique plant resource of sixteen pea NIL sets carrying resistance alleles at one to three of the seven main *Aphanomyces* resistance QTL, in different genetic backgrounds including two elite agronomic cultivars (Eden and Isard). NILs allow individual or combinations of QTL to be isolated in a given genetic background. Consequently, phenotypic differences between the recipient parent and the NILs are most likely attributable to the targeted QTL. We evaluated the NIL sets for resistance to two strains of *A. euteiches* under controlled conditions. The effects of several QTL were validated, depending on the genetic background, and agronomically important NILs, with improved resistance to *A. euteiches* compared to recipient parents, were identified. Our findings validate previous QTL mapping studies (Hamon et al. 2011, 2013; Pilet-Nayel et al. 2002, 2005), and also show the feasibility of using MAS for improving resistance to *A. euteiches* in pea.

A unique plant resource of pea NILs at *Aphanomyces* resistance QTL

Our MAB approach produced a total of 157 NILs homozygous for resistance alleles at one to three main resistance QTL from five introgression schemes into three recipient lines. We conducted an extensive program for NIL creation, which generated more than 28,000 SSR genotyping data points and 1300 manual flower inter-crosses per generation. Some examples of extensive MAS programs have been reported in the literature (Fujita et al. 2010; Thabuis et al. 2004; Yi et al. 2009; Zhou et al. 2005).

The introgression fragments were chosen based on their level and consistency of effect on resistance in previous QTL detection programs (Hamon et al. 2013). Resistance alleles from 552 at QTL *Ae-Ps1.2* and *Ae-Ps4.1* were not targeted in the present introgression program despite their interest (Hamon et al. 2013) but are being considered in an ongoing additional MAB program (Pilet-Nayel Pers. Comm.). Resistance alleles from several donors at identical QTL, specifically QTL *Ae-Ps7.6*, were targeted in the MAB program, since there was no information on whether common or different linked genes underlie the different alleles at this QTL. Common genes may be expected to confer resistance from the PI180693 and 90-2131 alleles at QTL *Ae-Ps7.6* since these two resistant germplasms are related (Kraft 1992).

The strategy developed in the MAB program successfully allowed 93 % of the target introgressions to be obtained in NILs comprising more than 98 % of the recipient genome. However, several factors may have influenced MAS efficiency. First, the number of plants screened at each BC and

first selfing generation (45–91 and 91–273, respectively) was adapted to the number of simultaneously introgressed QTL and to technical constraints (entire or half of a 96-well DNA plate). The plant number was usually adequate or overestimated for introgressing one or two QTL or for selecting different allelic combinations at target QTL in BC5/6F2/3. It could have been underestimated in some crosses for simultaneous introgression of three QTL (91 lines per BC generation), according to theoretical estimates (Hospital and Charcosset 1997), leading to no or low plant selection outside QTL regions. Second, the number of markers to control introgressions (≥ 3 for 84 % of the introgressed fragments) was mostly adequate to prevent QTL loss from double recombination events in the moderate to large sized QTL fragments (9–37.5 cM), even though marker positions were not always optimized due to the lack of polymorphic markers available. Undesirable alleles (normal leaves, colored flowers), which were previously reported to be linked to PI180693 resistance alleles at *Ae-Ps1.2* and *Ae-Ps2.2* (Hamon et al. 2013), were introduced into the NILs, as a result of unreduced introgression sizes (Supplementary data file 1). Such negative associations between resistance and morphological alleles were frequently reported (St Clair 2010; Tanksley and Nelson 1996). Third, the number of markers for controlling the return to the recipient genome was reasonable on each QTL non-carrier linkage group (one to three markers), since 50 % of the recipient genome is returned without markers at each BC generation. On QTL carrier linkage groups, few flanking markers to control and reduce introgression sizes were available, sometimes resulting in larger introgressed fragments than initially targeted. Five or six BC generations were conducted to ensure a higher level of return to recipient genome and overcome the overall low number of markers for MAS. Recently, massive numbers of SNP markers were developed from next-generation sequencing programs in pea (Boutet et al. (2015) submitted; Duarte et al. 2014; Sindhu et al. 2014), which will be a valuable tool for improved optimization of future MAB programs.

Major- and some minor-effect QTL validated in NILs for resistance to *A. euteiches* under controlled conditions

In the NIL sets which showed the highest QTL effects, individual QTL effects observed in reference recipient backgrounds were detected with similar levels as previously described for RIL populations, i.e., high for QTL *Ae-Ps7.6* and *Ae-Ps4.5*, low for QTL *Ae-Ps5.1* and null for QTL *Ae-Ps4.1* under controlled conditions. Bi-QTL combinations increased resistance compared to individual QTL, suggesting additive or epistatic QTL effects when combined.

The QTL *Ae-Ps7.6* had a major effect on resistance in most of the NILs evaluated with the RB84 strain. Effects

of introgressions from the different donor lines at QTL *Ae-Ps7.6* were different in the NILs produced, either high or null for resistance alleles derived from 90-2131 or PI180693 and from 552, respectively, in accordance with previous QTL results. The QTL *Ae-Ps7.6* was not detected previously in the Baccara $\times$ 552 RIL population with the RB84 strain but it was found with other strains, while the 90-2131 and PI180693 alleles at QTL *Ae-Ps7.6* were detected and explained up to 60 and 14 % of the phenotypic variation (R^2) in the DSP $\times$ 90-2131 and Baccara $\times$ PI180693 RIL populations, respectively (Hamon et al. 2011, 2013). Differences in effects were previously reported between the 90-2131 and PI180693 alleles at QTL *Ae-Ps7.6* which were not detected in the same genetic background.

QTL *Ae-Ps4.5* showed a highly significant effect on resistance to the Ae109 strain in all NIL sets from the RIL 831.08 donor line. This result validates those obtained in the Puget $\times$ 90-2079 RIL population (Pilet-Nayel et al. 2002, 2005), which showed a contribution of QTL *Ae-Ps4.5* to the resistance up to 44 % depending on the environments tested. Furthermore, the QTL were recently detected in this population with a very strong effect on resistance to Ae109 and a lower effect on resistance to RB84 (Pilet-Nayel, unpublished data). These results explained the high and low levels of resistance to Ae109 and RB84, respectively, of the subsequent selected RIL 831.08, used as donor parent in this study.

Other QTL with significantly smaller individual effects on resistance in the NILs (*Ae-Ps5.1* from RIL 847.50, *Ae-Ps2.2* from RIL BAP8.195) were also previously detected in RIL populations with lower effects than QTL *Ae-Ps7.6* and *Ae-Ps4.5* (Hamon et al. 2013), and not consistently with the RB84 and Ae109 strains. Alleles from 552 at QTL *Ae-Ps2.2* and *Ae-Ps3.1*, which did not have any significant individual effects in NILs, were previously detected in RILs with low R^2 (<10 %) for resistance to the RB84 and Ae109 strains. Minor-effect QTL are difficult to demonstrate in pathological tests using semi-quantitative scoring scales, all the more so when transferred into new genetic backgrounds in NILs (Falke and Frisch 2011). The scoring scale used for partial resistance evaluation did not allow very large variation to be revealed between donor and recipient lines, limiting the detection of minor differences between NILs. Finer phenotyping methodologies will be required to validate minor-effect QTL.

The effects of several of the QTL could not be validated in the NIL sets produced. In most cases, these QTL were not previously detected in RIL populations with the RB84 or Ae109 strain data under controlled conditions (Hamon et al. 2013). In particular, the effects of PI180693 alleles at QTL *Ae-Ps1.2*, *Ae-Ps3.1* and *Ae-Ps4.1*, not detected in the NILs, were previously only identified for field resistance.

Little variability in the effects of the QTL between sister NILs was observed, as suggested by the highly similar genome composition of each sister NIL pair revealed by the SSR markers tested. Nevertheless, some phenotypic differences were sometimes observed between sister NILs, which were either consistent with their genomic differences (introgression sizes, NIL15-2.2/7.6a-b; residual donor fragments outside target QTL, NIL12-1.2/2.2/3.1a-b) or unrelated to their apparent identical genomic composition (NIL5-7.6a-b; NIL14-7.6a-b). High-density SNP fingerprinting of NILs is of high interest to confirm their genome content (Pea et al. 2013) and is in progress for all the NILs produced in this study (Tayeh et al. 2015).

QTL effects on resistance to *A. euteiches* depending on pea genetic backgrounds

Different QTL $\times$ genetic background interactions were observed for validated QTL in reference genetic backgrounds. The interactions could be attributed to remaining donor fragments in unlinked or flanking QTL regions during the NILs construction which biased the real QTL effect. They also could be due to removed or new epistatic interactions when QTL were transferred into other genetic backgrounds.

In the agronomic genetic backgrounds, the QTL had three different types of effects, when compared to reference backgrounds. No or few QTL $\times$ recipient line interactions were identified for QTL *Ae-Ps4.5*, which may be related to its pronounced effect on resistance to Ae109, as previously observed (Pilet-Nayel Pers. Comm.). Positive QTL $\times$ recipient line interactions were found for QTL *Ae-Ps7.6* from RIL 847.50 or RIL BAP8.70, resulting in an increased effect on resistance in the winter pea cultivar Isard compared to the spring pea cultivars Eden, Baccara or DSP. QTL *Ae-Ps5.1* and *Ae-Ps4.1* showed negative QTL $\times$ recipient line interactions, and displayed, individually or in combination with QTL *Ae-Ps7.6*, no effect on resistance (QTL *Ae-Ps5.1*) or an even increased effect on susceptibility (QTL *Ae-Ps4.1*) in both the winter Isard and spring Eden cultivars compared to the reference backgrounds.

Possible variations in genome content between the different recipient lines introgressed with the same fragments could explain the QTL $\times$ genetic background interactions observed. Particularly, slightly shorter introgression sizes for QTL *Ae-Ps5.1* in Isard and Eden compared to DSP were observed, which is consistent with the absence of an effect of QTL *Ae-Ps5.1* individually or in combination with QTL *Ae-Ps7.6*. In contrast, a larger introgression size for QTL *Ae-Ps4.5* was identified in Isard and Eden than in Puget, which may cause the slightly lower effect of this QTL in the agronomic lines.

Epistatic interactions between the target QTL and other QTL or genomic regions, as identified in Hamon et al. (2011), could also explain the QTL $\times$ genetic background interactions observed. During the generation of the NILs, the loss of parental donor or reference recipient alleles all over the genome, which may interact with the target QTL, would result in a decrease or loss of the QTL effect when transferred into other genetic backgrounds. In our study, QTL *Ae-Ps5.1* lost its effect when introgressed into either Eden or Isard genetic backgrounds. Effect of the PI180693 resistance allele at QTL *Ae-Ps7.6*, which was previously reported to interact with the Baccara allele at QTL *Ae-Ps2.2* for increasing resistance to RB84 strain [Ae-PsE5, $R^2 = 10.6\%$ (Hamon et al. 2013)], was confirmed in the Baccara reference recipient line and was stronger than in Eden. Similar examples of lost QTL effects in introgression lines were reported (Reyna and Sneller 2001; Xue et al. 2009). On the other hand, during NIL construction, new epistatic interactions can also be created between the introgressed QTL fragment and the new genetic background, which may result in higher QTL effects. In our study, the effect of 90-2131 and PI180693 resistance alleles at QTL *Ae-Ps7.6* was enhanced in the winter pea cultivar Isard and confirmed in the winter cultivar Enduro, compared to the spring pea genetic backgrounds. In wheat, Salameh et al. (2011) found that two QTL controlling fusarium head blight resistance had variable effects when transferred into different European winter varieties. Winter plants most likely contain genes involved in tolerance to abiotic stress such as winter frost (Yadav 2010), which may interact with and/or be the same as resistance loci to pathogens. Several studies reported positive interactions between frost and pathogens at the phenotypic level, involving mechanisms based on modification of photosynthetic activity and sugar content (Pociecha et al. 2010) and induction of PR proteins with antifreeze activity (Yu et al. 2001). In pea, common loci were identified between partial resistance to ascochyta and frost tolerance (Giorgetti, unpublished data). Analyzing genetic relationships between *Aphanomyces* resistance and frost tolerance loci in winter pea genetic backgrounds would lead to an understanding of the QTL $\times$ winter vs. spring genetic background interactions observed.

Conclusion

In this study, a novel and valuable plant material resource was developed for further research on QTL mechanisms and their application in breeding programs. We validated the effects of two major and several minor QTL and demonstrated interaction effects between QTL and recipient lines in the NILs created. QTL effects in the NILs will be validated for field resistance in infested conditions,

regarding finer genomic characterization. The NILs will be particularly useful for studying the effect of the QTL on the pathogen life cycle (Chung et al. 2010; Richardson et al. 2006). They will be also valuable for fine mapping of QTL (Balkunde et al. 2013; Ding et al. 2011; Zhong et al. 2014) from heterozygous NILs at each individual QTL that were also produced in this study. NILs will also be used to identify the best QTL combinations for increasing resistance in pyramided lines carrying more than three resistance QTL from different donor lines (Fujita et al. 2010).

Author Contribution statement CL generated the phenotypic and genotypic data, carried out all the statistical and genetic analysis and drafted the manuscript. AL coordinated and participated in the entire MAB program and attended in generating the phenotypic data. CPi and GB participated in PCR and analysis of microsatellite data of the MAB program and the resulted NILs. GLR participated in the pea growings and flower manual crosses in the MAB program. CPo produced all the genotyping data on the GENTYANE platform. AM participated in the first generations of the MAB program. RD co-supervised CL's PhD work and participated in drafting the manuscript. AB participated in elaborating the MAB program and drafting the manuscript. MLPN supervised the MAB and NIL evaluation program, the PhD work of CL and the manuscript writing. All authors approved the final draft of the manuscript.

Acknowledgments This work was supported by a pre-doctoral fellowship (Clément Lavaud) from INRA, Département de Biologie et Amélioration des Plantes (France) and Brittany region (France). The SAMPOIS project from MAP (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Paris, France) and Terres Univia (Paris, France) funded the NIL construction. The PeaMUST project, which received funding from the French Government managed by the Research National Agency (ANR) under the Investments for the Future call 2011 (ANR-11-BTBR-0002), funded the NIL evaluation studies. We acknowledge Solène Coëdel and Berline Fopa-Fomeju for having contributed to the technical work during NIL construction. We thank the genotyping GENTYANE and BIOGENOUEST platforms of Clermont-Ferrand and Rennes, France, for technical assistance.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical standards Authors declare that the described experiments comply with the French laws.

References

- Ahmadi N, Albar L, Pressoir G, Pinel A, Fargette D, Ghesquiere A (2001) Genetic basis and mapping of the resistance to Rice yellow mottle virus. III. Analysis of QTL efficiency in introgressed progenies confirmed the hypothesis of complementary epistasis between two resistance QTLs. *Theor Appl Genet* 103:1084–1092
- Balkunde S, Le HL, Lee HS, Kim DM, Kang JW, Ahn SN (2013) Fine mapping of a QTL for the number of spikelets per panicle by using near-isogenic lines derived from an interspecific cross between *Oryza sativa* and *Oryza minuta*. *Plant Breed* 132:70–76
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S (2014) lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1.1-7. <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>
- Boutet G, Alves-Carvalho S, Falque M, Peterlongo P, Lhuillier E, Bouchez O, Lavaud C, Pilet-Nayel ML, Riviere N, Baranger A (2015) SNP discovery and genetic mapping using Genotyping by Sequencing of whole genome genomic DNA from a pea RIL population. *BMC Genomics*
- Brouwer DJ, St Clair DA (2004) Fine mapping of three quantitative trait loci for late blight resistance in tomato using near isogenic lines (NILs) and sub-NILs. *Theor Appl Genet* 108:628–638
- Castro P, Piston F, Madrid E, Millan T, Gil J, Rubio J (2010) Development of chickpea near-isogenic lines for Fusarium wilt. *Theor Appl Genet* 121:1519–1526
- Chung CL, Longfellow JM, Walsh EK, Kerdieh Z, Van Esbroeck G, Balint-Kurti P, Nelson RJ (2010) Resistance loci affecting distinct stages of fungal pathogenesis: use of introgression lines for QTL mapping and characterization in the maize–*Setosphaeria turcica* pathosystem. *BMC Plant Biol* 10:103
- Collard BC, Mackill DJ (2008) Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philos Trans R Soc B-Biol Sci* 363:557–572
- Delourme R, Piel N, Horvais R, Pouilly N, Domin C, Vallee P, Falentin C, Manzanares-Dauleux MJ, Renard M (2008) Molecular and phenotypic characterization of near isogenic lines at QTL for quantitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 117:1055–1067
- Didelot D, Chaillet I (1995) Relevance and interest of root disease prediction tests for pea crop in France. In: AEP (ed) 2nd Eur Conf Grain Legumes—improving production and utilisation of grain legumes. July 9–13th, Copenhagen- Denmark, p 150
- Ding X, Li X, Xiong L (2011) Evaluation of near-isogenic lines for drought resistance QTL and fine mapping of a locus affecting flag leaf width, spikelet number, and root volume in rice. *Theor Appl Genet* 123:815–826
- Duarte J, Riviere N, Baranger A, Aubert G, Burstin J, Cornet L, Lavaud C, Lejeune-Henaut I, Martinant JP, Pichon JP, Pilet-Nayel ML, Boutet G (2014) Transcriptome sequencing for high throughput SNP development and genetic mapping in Pea. *BMC Genom* 15:126
- Falke KC, Frisch M (2011) Power and false-positive rate in QTL detection with near-isogenic line libraries. *Heredity* 106:576–584
- Fujita D, Yoshimura A, Yasui H (2010) Development of near-isogenic lines and pyramided lines carrying resistance genes to green rice leafhopper (*Nephotettix cincticeps* Uhler) with the Taichung 65 genetic background in rice (*Oryza sativa* L.). *Breed Sci* 60:18–27
- Graves S, Piepho HP, Selzer L, Dorai-Raj S (2012) multcompView: visualizations of paired comparisons. R package version 0.1-5. <http://CRAN.R-project.org/package=multcompView>
- Gritton ET (1990) Registration of 5 root-rot resistant germplasm lines of processing pea. *Crop Sci* 30:1166–1167
- Halekoh U, Højsgaard S (2013) pbkrtest: parametric bootstrap and Kenward Roger based methods for mixed model comparison. R package version 0.3-8. <http://CRAN.R-project.org/package=pbkrtest>
- Hamon C, Baranger A, Coyne CJ, McGee RJ, Le Goff I, L'Anthoene V, Esnault R, Riviere JP, Klein A, Mangin P, McPhee KE, Roux-Duparque M, Porter L, Miteul H, Lesne A, Morin G, Onfroy C, Moussart A, Tivoli B, Delourme R, Pilet-Nayel ML (2011) New consistent QTL in pea associated with partial resistance to

- Aphanomyces euteiches* in multiple French and American environments. Theor Appl Genet 123:261–281
- Hamon C, Coyne CJ, McGee RJ, Lesne A, Esnault R, Mangin P, Herve M, Le Goff I, Deniot G, Roux-Duparque M, Morin G, McPhee KE, Delourme R, Baranger A, Pilet-Nayel ML (2013) QTL meta-analysis provides a comprehensive view of loci controlling partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in four sources of resistance in pea. BMC Plant Biol 13:45
- Hospital F (2003) Marker-assisted breeding. Blackwell Scientific Publishers, London
- Hospital F (2005) Selection in backcross programmes. Philos Trans R Soc B-Biol Sci 360:1503–1511
- Hospital F (2009) Challenges for effective marker-assisted selection in plants. Genetica 136:303–310
- Hospital F, Charcosset A (1997) Marker-assisted introgression of quantitative trait loci. Genetics 147:1469–1485
- John F, Sanford W (2011) An [R] Companion to Applied Regression, second edn. Sage. <http://CRAN.R-project.org/package=car>
- Jones FR, Drechsler C (1925) Root rot of peas in the United States caused by *Aphanomyces euteiches*. J Agric Res 30:293–325
- Kaeppler SM, Phillips RL, Kim TS (1993) Use of near-isogenic lines derived by backcrossing or selfing to map qualitative traits. Theor Appl Genet 87:233–237
- Keller B, Manzanares C, Jara C, Lobaton JD, Studer B, Raatz B (2015) Fine-mapping of a major QTL controlling angular leaf spot resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Theor Appl Genet 128:813–826
- Koester RP, Sisco PH, Stuber CW (1993) Identification of quantitative trait loci controlling days to flowering and plant height in 2 near-isogenic lines of maize. Crop Sci 33:1209–1216
- Kraft JM (1992) Registration of 90-2079, 90-2131, and 90-2322 pea germplasms. Crop Sci 32:1076–1076
- Lenth RV, Herve M (2015) lsmeans: least-squares means. R package version 2.18. <http://CRAN.R-project.org/package=lsmeans>
- Li ZK, Yu SB, Lafitte HR, Huang N, Courtois B, Hittalmani S, Vijayakumar CHM, Liu GF, Wang GC, Shashidhar HE, Zhuang JY, Zheng KL, Singh VP, Sidhu JS, Srivantaneeyakul S, Khush GS (2003) QTL x environment interactions in rice. I. Heading date and plant height. Theor Appl Genet 108:141–153
- Lockwood JL, Ballard JC (1960) Evaluation of pea introductions for resistance to aphanomyces and fusarium root rots. Michigan Quarterly Bulletin 42(4):704–713
- Loridon K, McPhee K, Morin J, Dubreuil P, Pilet-Nayel ML, Aubert G, Rameau C, Baranger A, Coyne C, Lejeune-Henaut I, Burstin J (2005) Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). Theor Appl Genet 111:1022–1031
- Ma J, Yan GJ, Liu CJ (2011) Development of near-isogenic lines for a major QTL on 3BL conferring *Fusarium* crown rot resistance in hexaploid wheat. Euphytica 183:147–152
- Malvick DK, Grau CR, Percich JA (1998) Characterization of *Aphanomyces euteiches* strains based on pathogenicity tests and random amplified polymorphic DNA analyses. Mycol Res 102:465–475
- McGee RJ, Coyne CJ, Pilet-Nayel M-L, Moussart A, Tivoli B, Baranger A, Hamon C, Vandemark G, McPhee K (2012) Registration of pea germplasm lines partially resistant to aphanomyces root rot for breeding fresh or freezer pea and dry pea types. J Plant Regist 6:203
- Moussart A, Wicker E, Duparque M, Rouxel F (2001) Development of an efficient screening test for pea resistance to *Aphanomyces euteiches*. In: AEP (ed) 4th Eur Conf Grain Legumes. July 8–12th, Cracow, Poland, pp 272–273
- Moussart A, Onfroy C, Lesne A, Esquibet M, Grenier E, Tivoli B (2007) Host status and reaction of *Medicago truncatula* accessions to infection by three major pathogens of pea (*Pisum sativum*) and alfalfa (*Medicago sativa*). Eur J Plant Pathol 117:57–69
- Moussart A, Even MN, Tivoli B (2008) Reaction of genotypes from several species of grain and forage legumes to infection with a French pea isolate of the oomycete *Aphanomyces euteiches*. Eur J Plant Pathol 122:321–333
- Onfroy C, Tivoli B, Grünwald NJ, Pilet-Nayel ML, Baranger A, Andrivon D, Moussart A (2015) Aggressiveness and virulence of *Aphanomyces euteiches* isolates recovered from pea nurseries in the United States and France. Plant Pathol
- Papavizas GC, Ayers WA (1974) *Aphanomyces* species and their root diseases in pea and sugarbeet. A review. US Dep Agric Tech Bull 1485:158
- Pea G, Aung HH, Frascaroli E, Landi P, Pe ME (2013) Extensive genomic characterization of a set of near-isogenic lines for heterotic QTL in maize (*Zea mays* L.). BMC Genom 14:61
- Pilet-Nayel ML, Muehlbauer FJ, McGee RJ, Kraft JM, Baranger A, Coyne CJ (2002) Quantitative trait loci for partial resistance to *Aphanomyces* root rot in pea. Theor Appl Genet 106:28–39
- Pilet-Nayel ML, Muehlbauer FJ, McGee RJ, Kraft JM, Baranger A, Coyne CJ (2005) Consistent quantitative trait loci in pea for partial resistance to *Aphanomyces euteiches* isolates from the United States and France. Phytopathology 95:1287–1293
- Pociecha E, Plazek A, Rapacz M, Niemczyk E, Zwierzykowski Z (2010) Photosynthetic activity and soluble carbohydrate content induced by the cold acclimation affect frost tolerance and resistance to microdochium nivale of androgenic festulolium genotypes. J Agron Crop Sci 196:48–54
- R Development Core Team (2014) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Retrieved from <http://www.R-project.org>
- Reyna N, Sneller CH (2001) Evaluation of marker-assisted introgression of yield QTL alleles into adapted soybean. Crop Sci 41:1317–1321
- Richardson KL, Vales MI, Kling JG, Mundt CC, Hayes PM (2006) Pyramiding and dissecting disease resistance QTL to barley stripe rust. Theor Appl Genet 113:485–495
- Salameh A, Buerstmayr M, Steiner B, Neumayer A, Lemmens M, Buerstmayr H (2011) Effects of introgression of two QTL for fusarium head blight resistance from Asian spring wheat by marker-assisted backcrossing into European winter wheat on fusarium head blight resistance, yield and quality traits. Mol Breed 28:485–494
- Schmalenbach I, Korber N, Pillen K (2008) Selecting a set of wild barley introgression lines and verification of QTL effects for resistance to powdery mildew and leaf rust. Theor Appl Genet 117:1093–1106
- Sindhu A, Ramsay L, Sanderson LA, Stonehouse R, Li R, Condie J, Shunmugam ASK, Liu Y, Jha AB, Diapari M, Burstin J, Aubert G, Tar'an B, Bett KE, Warkentin TD, Sharpe AG (2014) Gene-based SNP discovery and genetic mapping in pea. Theor Appl Genet 127:2225–2241
- St Clair DA (2010) Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. Annu Rev Phytopathol 48:247–268
- Tanksley SD, Nelson JC (1996) Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines. Theor Appl Genet 92:191–203
- Tayeh N, Aluome C, Falque M, Jacquin F, Klein A, Chauveau A, Bérard A, Houtin H, Rond C, Kreplak J, Boucherot K, Martin C, Baranger A, Pilet-Nayel M-L, Warkentin T, Brunel D, Marget P, Le Paslier M-C, Aubert G, Burstin J (2015) The GenoPea Infinium® BeadChip allowed the construction of a high-density high-resolution gene-based consensus genetic map in pea and provided an overview on the genome organization. Plant J (submitted)
- Thabuis A, Palloix A, Servin B, Daubeze AM, Signoret P, Hospital F, Lefebvre V (2004) Marker-assisted introgression of 4 Phytophthora capsici resistance QTL alleles into a bell pepper line: validation of additive and epistatic effects. Mol Breed 14:9–20

- Wicker E, Rouxel F (2001) Specific behaviour of French *Aphanomyces euteiches* Drechs. Populations for virulence and aggressiveness on pea, related to isolates from Europe, America and New Zealand. Eur J Plant Pathol 107:919–929
- Wicker E, Moussart A, Duparque M, Rouxel F (2003) Further contributions to the development of a differential set of pea cultivars (*Pisum sativum*) to investigate the virulence of isolates of *Aphanomyces euteiches*. Eur J Plant Pathol 109:47–60
- Xue S, Li G, Jia H, Lin F, Cao Y, Xu F, Tang M, Wang Y, Wu X, Zhang Z, Zhang L, Kong Z, Ma Z (2009) Marker-assisted development and evaluation of near-isogenic lines for scab resistance QTLs of wheat. Mol Breed 25:397–405
- Yadav SK (2010) Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. Agron Sustain Dev 30:515–527
- Yi M, Nwe KT, Vanavichit A, Chai-arree W, Toojinda T (2009) Marker assisted backcross breeding to improve cooking quality traits in Myanmar rice cultivar Manawthukha. Field Crop Res 113:178–186
- Yu ZH, Mackill DJ, Bonman JM, Tanksley SD (1991) Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers. Theor Appl Genet 81:471–476
- Yu XM, Griffith M, Wiseman SB (2001) Ethylene induces antifreeze activity in winter rye leaves. Plant Physiol 126:1232–1240
- Zhong ZZ, Wu WX, Wang HJ, Chen LP, Liu LL, Wang CM, Zhao ZG, Lu GW, Gao H, Wei XJ, Yu CY, Chen MJ, Shen YY, Zhang X, Cheng ZJ, Wang JL, Jiang L, Wan JM (2014) Fine mapping of a minor-effect QTL, DTH12, controlling heading date in rice by up-regulation of florigen genes under long-day conditions. Mol Breed 34:311–322
- Zhou R, Zhu Z, Kong X, Huo N, Tian Q, Li P, Jin C, Dong Y, Jia J (2005) Development of wheat near-isogenic lines for powdery mildew resistance. Theor Appl Genet 110:640–648

CHAPITRE III

*Variabilité des effets des QTL de
résistance à *Aphanomyces euteiches*
dans différents environnements au
champ*

CHAPITRE III : VARIABILITE DES EFFETS DES QTL DE RESISTANCE A *APHANOMYCES EUTEICHES* DANS DIFFERENTS ENVIRONNEMENTS AU CHAMP

1. INTRODUCTION DU CHAPITRE

Les objectifs de cette partie de thèse ont été d'étudier la stabilité des effets des QTL de résistance vis-à-vis de différents environnements au champ et d'identifier des combinaisons de QTL permettant d'augmenter les niveaux de résistance partielle chez le pois. Les travaux ont été réalisés sur le panel de NILs créé et évalué précédemment en conditions contrôlées. Les NILs ont été phénotypées pour la résistance au champ sur deux années au sein d'un réseau multi-local et génotypées finement à l'aide d'une puce SNP afin de pour mieux interpréter les phénotypes observés au regard de la composition génomique des NILs. Cette étude a permis de valider les effets des QTL précédemment identifiés en conditions contrôlées, d'identifier des QTL présentant un effet au champ à un stade plus avancé de développement de la plante que celui observé en conditions contrôlées, mais également d'invalider l'effet d'un QTL dont l'introgression a été perdue dans les NILs étudiées. Les résultats ont permis d'identifier et discuter de combinaisons de QTL d'intérêt pour augmenter la résistance partielle sur racines.

Dans ce chapitre, seule des données de phénotypage au champ obtenues sur parties racinaires sur deux lieux et deux années ont été analysées, car les données sur les parties aériennes pour l'année 2015 n'étaient pas disponibles lors de l'écriture de ce manuscrit. Ces dernières obtenus sur deux années (2014, 2015), seront néanmoins intégrées dans la publication qui sera réalisée après la thèse sur ce chapitre.

Ce chapitre de thèse est présenté sous la forme d'un article qui sera complété et soumis dans la revue *TAG (Theoretical and Applied Genetics)*.

2. ARTICLE EN PREPARATION

IDENTIFICATION DE COMBINAISONS DE QTL POUR LA RESISTANCE A *APHANOMYCES EUTEICHES* AU CHAMP DANS DES LIGNEES QUASI-ISOGENIQUES DE POIS

C. Lavaud¹, J.-P. Riviere^{1,2}, P. Vetel^{1,2}, G. Aubert³, G. Leroy^{1,2}, P. Mangin⁴, R.J. McGee⁵, C.J. Coyne⁶, G. Rouillet⁷, J.F. Herbommez⁸, P. Declerck⁹, G. Furet¹⁰, R. Delourme^{1,2}, M-L. Pilet-Nayel^{1,2,*}

¹ INRA, UMR IGEPP 1349, Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, Domaine de la Motte au Vicomte, BP 35327, 35653 Le Rheu cedex, France

² PISOM, UMT INRA/Terres Inovia, UMR IGEPP 1349, Domaine de la Motte au Vicomte, BP 35327, 35653 Le Rheu cedex, France

³ INRA, UMR 1347 Agroécologie, 17 rue de Sully, 21065 Dijon Cedex, France

⁴ INRA, Domaine Expérimental d'Epoisses, 21110 Bretenières Cedex, France

⁵ USDA, ARS, Grain Legume Genetics and Physiology Research Unit, Pullman, WA 99164-6434, USA

⁶ USDA, ARS, Western Regional Plant Introduction Station, Washington State University, Pullman, WA 99164-6402, USA

⁷ Unisigma, GIE Recherche et Sélection, 2, rue Petit-Sorri, 60 480 Froissy Cedex, France

⁸ KWS-Momont, 7 rue de martinval, 59246 Mons en Pévele Cedex, France

⁹ RAGT2n, Route d'Epincy. 28150 Louville la chenard Cedex, France

¹⁰ Limagrain Europe, 5 rue de l'égalité, 28130 Chartainvilliers Cedex, France

* Corresponding author: marie-laure.pilet@rennes.inra.fr

Mot Clé : NIL, quantitative trait loci, field evaluation, *Pisum sativum* L., SNP fingerprint.

RESUME DE L'ARTICLE

L'étude des interactions QTL x environnement et l'identification de combinaisons de QTL à effets stables dans les régions cultivées est une étape importante et souvent négligée avant l'utilisation des QTL en sélection assistée par marqueurs pour la résistance aux maladies chez les plantes. La pourriture racinaire due à *Aphanomyces euteiches* est l'une des maladies les plus dommageables sur le pois à travers le monde et présente un intérêt majeur pour le développement futur de variétés résistantes. Le but de cette étude est de valider dans différents environnements au champ, les effets individuels ou combinés de différents allèles de résistance à sept principaux QTL de résistance récemment identifiés. Un total de 157 lignées quasi-isogéniques (NILs) de pois, porteuses d'aucun, un, deux ou trois QTL de résistance à *A. euteiches*, a été évaluée pour la résistance sur parties racinaires au champ sur deux années en 2014 et 2015 et deux lieux à Riec-sur-Belon et à Dijon-Epoisses, France. Les NILs ont aussi été génotypées à l'aide de 10.494 marqueurs SNP, ce qui a permis de confirmer la part de variation phénotypique observée due au génotype. Les NILs portant le QTL à effet majeur *Ae-Ps7.6*, seul ou en combinaison avec le QTL *Ae-Ps4.1* ou *Ae-Ps5.1*, ont montré une réduction significative de la sévérité de la maladie au niveau racinaire par rapport aux NILs sans QTL et/ou parents sensibles des NILs, dans différents environnements et fonds génétiques. Les NILs porteuses de la combinaison des trois QTL *Ae-Ps1.2*, *Ae-Ps2.2* et *Ae-Ps3.1* ont montré un effet significatif dans le fond Elite Eden, non identifié précédemment en conditions contrôlées. L'acquisition de données de symptômes aériens (jaunissements) au champ, obtenues sur les NILs au sein d'un réseau multi-local de parcelles infestées en France et aux Etats-Unis, va permettre d'approfondir les résultats de spécificité des QTL vis-à-vis des environnements et variables racinaires et aériennes. L'ensemble des résultats permettra d'identifier des combinaisons de QTL associées à des niveaux accrus de résistance, selon leur spectre large ou étroit d'effets vis-à-vis des environnements et organes de la plante, et de proposer des stratégies de choix de QTL pour la sélection.

INTRODUCTION

Dans l'agriculture d'aujourd'hui, les résistances polygéniques contrôlées par de nombreuses régions du génome ou QTL (Quantitative Trait Loci) confèrent le plus souvent des niveaux de résistance partiels et *à priori* durables aux maladies chez les espèces cultivées (Kou and Wang 2010; Palloix et al. 2009). Pourtant, les mécanismes sous-jacents à la résistance quantitative restent peu connus (Niks et al. 2015) malgré les nombreuses études d'identification de QTL (Quantitative Trait Locus) de résistance publiées chez les plantes (St Clair 2010). Par ailleurs, l'exploitation des QTL en sélection reste difficile, du fait du niveau partiel et de l'instabilité de leurs effets, en partie due à leurs interactions avec le fonds génétique et avec l'environnement (Kou and Wang 2010). La sélection assistée par marqueurs (SAM) a donc été développée pour exploiter et cumuler ces QTL de résistance chez les plantes (St Clair 2010). Les succès de la SAM publiés jusqu'à présent ont été souvent obtenus à partir de la méthode de BAM [Back-cross Assisté par Marqueurs ; (Hospital 2009)], consistant en une succession de rétrocroisements avec une même lignée parentale dite « receveuse » pour réaliser des introgressions de fragments issus d'une lignée dite « donneuse » afin d'obtenir des lignées quasi-isogéniques (NILs). Les NILs se caractérisent donc et ne diffèrent entre elles que par la présence d'un ou plusieurs gène(s) ou QTL(s) à l'état homozygote du parent dit « donneur ». Dans plusieurs études, les NILs ont été utilisées pour valider les QTL et associer l'effet du QTL au segment génétique introgressés, comme chez la tomate (Brouwer and St Clair 2004), le blé (Ma et al. 2012), le riz (Zhang et al. 2006), de l'orge (Schmalenbach et al. 2008), le pois chiche (Castro et al. 2010) et le colza (Delourme et al. 2008). Les NILs sont aussi un matériel intéressant pour l'étude des interactions entre les QTL et l'environnement (Delourme et al. 2014; Steele et al. 2007) ou le fonds génétique « receveur » (Lavaud et al. 2015; Lecomte et al. 2004). Les NILs ont été également utilisées pour démontrer l'action du cumul de QTL multiples pour augmenter l'efficacité de la résistance partielle (Richardson et al. 2006; Wilde et al. 2008). Néanmoins, ces études n'ont pas permis de faire émerger des stratégies générales pour choix de QTL à combiner selon leur spectre d'effets sur les environnements, stades de la plante ou organes affectés. Par ailleurs, le génome des NILs étudiées n'a souvent pas été caractérisé de manière fine, afin d'identifier si les phénotypes attribués aux combinaisons de QTL pouvaient aussi résulter de résidus génomiques donneurs flanquants ou indépendants l(d)es QTL introgressés.

La pourriture racinaire du pois, causée par un oomycète tellurique *Aphanomyces euteiches*, a été décrite pour la première fois dans les années 1920 (Jones and Drechsler 1925). A partir des années 90, cette maladie est devenue l'une des plus nuisibles sur pois dans le monde,

causant des pertes de rendement de 20 à 50 quintaux/ha, allant jusqu'à la perte totale d'une parcelle (Pfender et al. 2001). La maladie s'exprime à un stade très précoce (dès 3 ou 4 feuilles) par des lésions molles et translucides sur les racelles, qui évoluent en pourriture brun-miel affectant tout le système racinaire jusqu'à l'épicotyle. Elle entraîne un jaunissement, puis un nanisme et enfin un dessèchement des plantes sur les parties aériennes. Deux principaux pathotypes d'*A. euteiches* ont été rapportés chez le pois sur la base de leurs réactions différentielles sur un ensemble de six génotypes (Wicker et al. 2003; Wicker and Rouxel 2001). Le pathotype I est prédominant en Europe et a été observée aux USA, en revanche le pathotype III a été observée seulement dans certaines régions aux USA (Onfroy et al. 2015, soumis). Aucune méthode de lutte chimique n'est disponible pour contrôler la maladie. La lutte génétique, en combinaison avec l'usage de méthodes prophylactiques et culturales, est actuellement la solution la plus prometteuse pour gérer la maladie. Chez le pois, la résistance à *A. euteiches* a été montrée comme présentant un niveau partiel à déterminisme polygénique (Pilet-Nayel et al. 2002). Au cours de la dernière décennie, la dissection génétique de la résistance polygénique à *A. euteiches* a été réalisée chez le pois, à partir de quatre populations de lignées recombinantes (RILs) dérivées de croisements bi-parentaux impliquant les quelques meilleures sources de résistance identifiées dans la variabilité naturelle de l'espèce (Hamon et al. 2013). Parmi plus d'une vingtaine de régions du génome ou QTL (Quantitative Trait Loci) associées à la résistance, sept ont été détectées de manière très consistante dans plusieurs populations, plusieurs environnements, et/ou avec différentes souches d'*A. euteiches* (Hamon et al. 2011; 2013; Pilet-Nayel et al. 2005). Récemment, un programme de BAM a été mis en place pour l'introgression simultanée d'allèles de résistance à un, deux ou trois des sept principaux QTL de résistance, à partir de cinq lignées dites « donneuses » dans trois ou quatre lignées dites « receveuses », à l'aide de marqueurs SSR (Simple Sequence Repeats). Ce programme a permis de développer une ressource de 157 lignées quasi-isogéniques (NILs) de pois, porteuses d'aucun, un, deux ou trois QTL de résistance dans différents fonds génétiques (Lavaud et al. 2015). L'évaluation de ces NILs en conditions contrôlées vis-à-vis de deux souches d'*A. euteiches* des pathotypes I et III a permis notamment de valider l'effet de QTL majeurs (*Ae-Ps7.6* et *Ae-Ps4.5*) vis-à-vis de chaque pathotype. Elle a également mis en évidence l'existence d'interactions QTL x fonds génétiques, notamment au QTL majeur *Ae-Ps7.6*. Cependant, l'absence de validation des effets des QTL dans les NILs au champ dans différents environnements infestés, ainsi que l'absence de caractérisation fine du génome des NILs créées, n'ont pas permis l'apport de connaissances suffisantes pour pouvoir élaborer des stratégies de choix de QTL multiples à

combiner pour augmenter le niveau de résistance partielle. Les objectifs de ce chapitre est (i) de valider les effets des QTL au champ dans les NILs précédemment créées (Lavaud et al. 2015) au regard de leur composition génomique fine et (ii) de déterminer les combinaisons de QTL et stratégies de choix de QTL à cumuler pour limiter la sévérité de la maladie au champ. Les NILs ont été phénotypées pour leur niveau de résistance sur parties racinaires et aériennes dans plusieurs environnements pendant deux années, afin de valider les effets des QTL seuls ou en combinaison. Elles ont été génotypées à l'aide d'une puce Illumina Infinium® BeadChip (Tayeh et al. 2015), afin de caractériser finement les zones génomiques à l'intérieur et à l'extérieur des zones introgressées et d'identifier la part du génotype dans la variation des phénotypes observés. L'analyse des résultats a permis de caractériser les QTL pour leur consistance d'effets vs. spécificité vis-à-vis des environnements et organes affectés par la maladie et d'identifier les combinaisons de QTL les plus efficaces pour limiter la sévérité de la maladie.

MATERIEL ET METHODES

L'ensemble des 157 NILs de pois (*Pisum sativum* L.) porteuses d'allèles de résistance à aucun, un, deux ou trois QTL de résistance à *A. euteiches*, décrites dans Lavaud et al. (2015), a été utilisé dans cette étude. Les NILs se sont réparties en 16 sets, chaque set comprenant des NILs sœurs avec ou sans QTL issus de croisement entre une lignée « donneuse » (RIL 831.08, RIL 847.50, RIL BAP 8.70, RIL BAP8.195 ou 552) et une lignée « receveuse » (lignée de « référence », *i.e.* Baccara ou DSP ou Puget ; variété de pois de printemps Eden, variété de pois d'hiver Isard ou Enduro) (Lavaud et al. 2015). Les allèles de résistance aux QTL apportés par les lignées donneuses sont originaires des génotypes 90-2079, 90-2131 (Kraft 1992), PI180693 (Lockwood and Ballard 1960) et 552 (Gritton 1990), utilisés comme parents résistants des populations de cartographie de QTL précédemment analysées (Hamon et al. 2013; Lavaud et al. 2015). Les lignées receveuses de référence sont les parents sensibles des populations de cartographie de QTL précédentes. Les génotypage et phénotypage au champ des NILs ont été réalisés à partir de plantes en générations BC5/6F2/3 et BC5/6F3/4/5, respectivement.

Un total de 14 lignées « Témoins » a été utilisé dans les tests de résistance au champ, incluant les 11 lignées parentales des NILs testées et trois lignées présentant des niveaux élevés de résistance produites dans un programme précédent de sélection phénotypique récurrente pour la résistance conduit par le GSP (Groupement des Sélectionneurs de Protéagineux) entre 1995 et 2005 (Desgroux et al. 2016; Roux-Duparque et al. 2004). Parmi les trois lignées,

AeD99OSW-45-8-7 et AeD99OSW-50-2-5 ont été obtenues à partir de croisement entre trois des quatre lignées parentales résistantes des populations de cartographie de QTL [(90-2131xPI180693) x 552] et AeD99QU-04-9-10-1 a été obtenu à partir du croisement entre 4 lignées [(Baccara x PI180693) x (Capella x MN314)] (Desgroux et al. 2016).

CARACTERISATION MOLECULAIRE DES NILS

L'ADN de l'ensemble des NILs a été extrait à l'aide d'un kit d'extraction NucleoSpin Plant II (Macherey Nagel GmbH & Co., Allemagne), puis quantifié par fluorescence (*PicoGreen*) au PheraStar et enfin normalisé à 100ng/μl. Le génotypage des NILs a été effectué à l'aide de la puce GenoPea Infinium® BeadChip (projet ANR-GenoPea), comportant 13,204 SNPs localisés dans des séquences de gènes et associés à des transcrits distincts (Tayeh et al. 2015). Les SNPs ont été analysés individuellement pour chacun des 16 sets de NIL à l'aide du module v1.9.4 du logiciel Illumina GenomeStudio®. Une carte consensus de 15,079 marqueurs, incluant 12 802 SNPs issus de la puce GenoPea, a été récemment construite à partir de 12 populations de RILs différentes (Tayeh et al. 2015). L'ordonnancement des marqueurs de cette carte consensus et les données de génotypage des NILs ont été utilisés pour réaliser les génotypes graphiques des NILs. Pour chaque NIL, les pourcentages de génome donneur dans les zones à QTL (DGC, Donor Genome Content) et de retour au génome receveur en dehors des zones à QTL (RGC, Recipient Genome Content) ont été calculés d'après leurs génotypes à l'ensemble des marqueurs ordonnés.

EVALUATION PHENOTYPIQUE DES NILS

Les 16 sets de NILs ainsi que les lignées témoins ont été évalués pour la résistance à *A. euteiches* au champ sur un réseau multi-local de sept parcelles infestées. Ce réseau a inclus i) trois pépinières infestées du réseau Aphanomyces international France-USA, décrits par Hamon et al. (2011), localisées sur deux sites en France (Riec-sur-Belon, Finistère; Dijon-Epoisses, Côte d'Or) et un site aux États-Unis (Pullman, Washington) et ii) quatre pépinières infestées du réseau Aphanomyces français du GSP, localisées sur quatre sites (Froissy, Mons en Pévele, Louville la chenard et Chartainvilliers), gérés par les sociétés Unisigma, KWS Momont, RAGT2n et Limagrain Europe, respectivement. Les lignées ont été évaluées pendant deux années (2014 et 2015) sur l'ensemble des sites, sauf à Pullman, WA où l'évaluation n'a été réalisée qu'en 2015.

Les expérimentations au champ ont été effectuées en utilisant un dispositif à trois blocs complets randomisés dans les pépinières du réseau international et à deux blocs complets randomisés dans les pépinières du réseau GSP. Chaque parcelle dans chaque bloc a été

constituée d'une double ligne de deux mètres de long pour les sites en France et une simple ligne de deux mètres pour les sites aux Etats-Unis, chaque ligne contenant 30 graines. Le dispositif a inclus un témoin adjacent sensible (variété Solara) toutes les quatre parcelles, afin de contrôler l'hétérogénéité du potentiel infectieux du sol au sein de la pépinière.

Trois types de notations ont été utilisés pour évaluer la résistance, comme décrit dans Hamon et al. (2011; 2013).

1. La sévérité de la maladie sur racines (root Disease Severity, DS) est mesurée à partir du stade quatre feuilles, sur dix plantes par parcelle. Chaque plante est arrachée en gardant les racines intactes, puis lavée dans l'eau et enfin notée en utilisant une échelle de 0 à 5 (adaptée de (Moussart et al. 2001)); avec 0 pour une plante saine, 1 pour des traces translucides à beiges sur les radicelles, 2 pour des zones beiges à brunâtres, molles, couvrant le quart du système racinaire et l'épicotyle est sain, 3 pour des zones beiges à brunâtres, molles, couvrant au moins la moitié du système racinaire et l'épicotyle peut tourner au beige mais reste ferme, 4 pour un système racinaire attaqué aux trois quart et l'épicotyle de couleur brune est mou et paraît étranglé, et 5 pour une plante morte. Cette échelle est similaire à celle utilisée précédemment par Lavaud et al. (2015) pour l'évaluation des NILs en conditions contrôlées.

2. L'indice de dépérissement aérien (Aerial Decline Index, ADI) a été évalué sur chaque parcelle une, deux voire trois fois tous les 10-15 jours à partir du stade de fin floraison. Une échelle de notation de 1 à 5 décrite par Pilet-Nayel et al. (2002) a été utilisée pour évaluer les NILs dans la pépinière américaine. Une échelle de notation de 1 à 8, décrite dans Hamon et al. (2011) et adaptée de Duparque et Boitel (2001), a été appliquée dans les pépinières françaises. Cette notation prend en compte que le jaunissement de la plante.

3. Le nanisme (Dwarfism, DW) a été représenté pour chaque génotype par un pourcentage de diminution de la taille moyenne dans les parcelles infestées par rapport à la taille dans une parcelle non infestées, comme suivante: $DW_{ij} = (H_{Ni} - H_{Iij}) / H_{Ni}$, avec H_{Iij} représentant la hauteur moyenne des plantes dans les trois parcelles infestées et H_{Ni} représentant la hauteur moyenne de cinq plantes dans la parcelle non infestée.

Pour l'ensemble des NILs, la DS n'a été évaluée que dans les pépinières françaises du réseau international (Riec-sur-Belon et Dijon-Epoisses). En revanche, l'ADI a été mesuré dans toutes les pépinières en France et aux Etats-Unis (Annexe III.1) et le DW a été mesuré dans toutes les pépinières du réseau *Aphanomyces* français, ainsi qu'une pépinière au Rheu (Ille-et-Vilaine) représentant le site sain de la pépinière située à Riec-sur-Belon.

ANALYSE STATISTIQUE

Les analyses statistiques des données phénotypiques de maladie (DS, ADI) et de morphologie/développement (DW) ont été réalisées avec le logiciel R (R Development Core Team 2014). Les analyses ont pris en compte les notes plante-à-plante recueillies pour la variable DS et les notes globales collectées pour les autres variables (ADI, hauteur). Pour chaque variable, deux types d'analyses (analyse globale multi-environnements et analyse individuelle par environnement) ont été réalisés, d'une part sur l'ensemble des lignées évaluées, d'autre part, sur chaque set de NILs. Les deux types d'analyse ont été réalisées avec un modèle linéaire mixte [LMM; Fonction « lmer », package « lme4 » (Bates et al. 2014)] pour chaque variable phénotypique à expliquer (DS, ADI et DW), en utilisant une analyse de déviance (test de Wald, $\alpha=5\%$) pour estimer les effets de variables explicatives (génotype, lieu, année et bloc) avec la fonction « Anova » du package « car » (John and Sanford 2011).

- L'analyse globale effectuée sur l'ensemble des NILs, a pris en compte les génotypes, lieux et années comme des facteurs fixes et les blocs comme un facteur aléatoire, afin d'estimer l'effet d'interaction Génotype x Lieu x Année sur les variations de notation observées. L'analyse globale effectuée sur chaque set de NILs, a uniquement pris en compte les génotypes comme facteur fixe et les lieux, années et blocs en facteurs aléatoires. Pour chaque NIL et chaque variable, elle a permis d'estimer une moyenne ajustée (LSMean) des effets lieux, années et blocs, en utilisant la fonction « lsmeans » du package « lsmeans » (Lenth and Herve 2015). Les valeurs de LSMeans obtenues sur les NILs de chaque set ont été comparées entre elles avec un test de comparaison multiple de Tukey ($\alpha=5\%$), en utilisant la fonction « cld » du package « MultcompView » (Graves et al. 2012).

- L'analyse individuelle par environnement, effectuée sur l'ensemble des NILs ou sur chaque set de NILs, a pris en compte les génotypes en facteur fixe et les blocs en facteur aléatoire. Les moyennes des NILs ajustées des effets blocs (LSMeans) ont été estimées. Dans chaque set de NILs, elles ont été comparées entre elles avec la fonction « cld » (test Tukey, $\alpha=5\%$). L'héritabilité au sens large (h^2) a été calculée selon la formule $h^2 = \sigma^2_g / [\sigma^2_g + (\sigma^2_e / n)]$ avec σ^2_g la variance génétique, σ^2_e la variance résiduelle et n est le nombre de répétitions, à partir d'un test de Wald F prenant en compte l'ensemble des NILs [package « pbkrtest » (Halekoh and Højsgaard 2013)].

RESULTATS

CONSTRUCTION DES GENOTYPES GRAPHIQUES DES NILS

Parmi les 12,802 marqueurs SNPs de la puce GenoPea cartographiés par Tayeh et al. (2015), 10,494 ont été polymorphes dans au moins l'un des 16 sets de NILs étudiés et/ou des quatre couples de lignées parentales des populations de RILs utilisées précédemment pour la détection des QTL (Hamon et al. 2013).

Entre 1,040 à 3,181 marqueurs SNPs polymorphes entre les lignées parentales des RILs ont permis de localiser les régions présentant le même génome que celui des lignées receveuses de référence, dans les RILs donneuses du programme de BAM et les NILs obtenues sur fonds de référence (Figure 1).

Entre 1,726 à 4,795 marqueurs SNP polymorphes entre les lignées parentales de chaque set de NILs ont permis de caractériser le génome des NILs, en dehors des zones de type « receveuses » apportées par les lignées parentales donneuses pour les NILs obtenues sur fonds de référence (Figure 1). Un nombre moins élevé de 200 à 1000 SNPs polymorphes, selon les croisements, a été observé entre les lignées parentales donneuses et la lignée receveuse Eden par rapport à la lignée receveuse Isard. Pour la NIL12-1.2b, aucun résultat de génotypage n'a été obtenu dû à un problème d'ADN. 0,6% des points de génotypage utilisés pour construire les génotypes graphiques des NILs ont révélé des génotypes hétérozygotes, la plupart étant localisés dans les zones flanquant les QTL ou en dehors des zones à QTL (Figure 1).

Génome des NILs dans les zones à QTL

Sur les groupes de liaison porteurs de QTL, les génotypes graphiques révèlent des tailles d'introggression variables des fragments donneurs, dues soit au niveau de retour variable au génome « receveur » dans les régions flanquant les QTL, soit à la perte de segments « donneurs » dans les zones des QTL ciblés (Figure 1).

Figure 1 : Génotypes graphiques des 157 NILs à zéro, un, deux ou trois des sept principaux QTL de résistance à *A. euteiches*, sélectionnés dans le programme de BAM (Lavaud et al. 2015).

Les couleurs blanc, gris foncé, gris clair, rouge et orange indiquent, respectivement, pour chaque NIL : les marqueurs non polymorphes ; les marqueurs polymorphes entre les parents des RIL donneuses et révélant la présence du génome receveur de référence (Baccara, Puget ou DSP) dans les RIL donneuses ; les marqueurs polymorphes entre les parents des NILs montrant un retour au génome receveur ; et les marqueurs polymorphes entre les parents des NILs et révélant un fragment donneur à l'état homozygote ou hétérozygote. Les encadrés bleus montrent les intervalles de confiance des QTL de résistance ciblés pour les introgressions. NA : Donnée manquante.

a- Pour chaque NIL le pourcentage de retour au génome receveur (RGC, Recipient Genome Content) en dehors des QTL cibles, est calculé par le rapport entre le nombre de marqueurs révélant un génotype homozygote receveur et le nombre total de marqueurs testés sur la NIL, en dehors des zones à QTL.

b- Pour chaque NIL, le pourcentage de génome donneur (DGC, Donor Genome Content) dans le(s) QTL cible(s) est calculé par le rapport entre le nombre de marqueurs révélant un génotype homozygote donneur et le nombre total de marqueurs testés, dans l'(es) intervalle(s) de confiance du(es) QTL ciblé(s) pour la NIL.

		Interval of Confidence QTL		Ac-Ps1.2		Ac-Ps2.2		Ac-Ps3.1	
Donor Line	Recipient Line	Code NIL	QTL A Position (cM)	LG I		LG II		LG III	
NIL 531.08	Pugot	NIL1.0a	0 QTL						
		NIL1.0b	0 QTL						
		NIL1.4.5a	Ac-Ps4.5						
		NIL1.4.5b	Ac-Ps4.5						
	Isard	NIL2.0a	0 QTL						
		NIL2.0b	0 QTL						
		NIL2.4.5a	Ac-Ps4.5						
		NIL2.4.5b	Ac-Ps4.5						
	Eiken	NIL3.0a	0 QTL						
		NIL3.0b	0 QTL						
		NIL3.4.5a	Ac-Ps4.5						
NIL 547.50	DSP	NIL4.0a	0 QTL						
		NIL4.0b	0 QTL						
		NIL4.5.1a	Ac-Ps5.1						
		NIL4.5.1b	Ac-Ps5.1						
		NIL4.7.6a	Ac-Ps7.6						
		NIL4.7.6b	Ac-Ps7.6						
		NIL4.5.1/7.6a	Ac-Ps5.1 + Ac-Ps7.6						
		NIL4.5.1/7.6b	Ac-Ps5.1 + Ac-Ps7.6						
	Isard	NIL5.0a	0 QTL						
		NIL5.0b	0 QTL						
		NIL5.5.1a	Ac-Ps5.1						
NIL 549.70	Isard	NIL6.0a	0 QTL						
		NIL6.0b	0 QTL						
		NIL6.5.1a	Ac-Ps5.1						
		NIL6.5.1b	Ac-Ps5.1						
		NIL6.7.6a	Ac-Ps7.6						
		NIL6.7.6b	Ac-Ps7.6						
		NIL6.5.1/7.6a	Ac-Ps5.1 + Ac-Ps7.6						
		NIL6.5.1/7.6b	Ac-Ps5.1 + Ac-Ps7.6						
	Isard	NIL7.0a	0 QTL						
		NIL7.0b	0 QTL						
		NIL7.4.1a	Ac-Ps4.1						
NIL 549.70	Isard	NIL8.0a	0 QTL						
		NIL8.0b	0 QTL						
		NIL8.4.1a	Ac-Ps4.1						
		NIL8.4.1b	Ac-Ps4.1						
		NIL8.7.6a	Ac-Ps7.6						
		NIL8.7.6b	Ac-Ps7.6						
		NIL8.4.1/7.6a	Ac-Ps4.1 + Ac-Ps7.6						
		NIL8.4.1/7.6b	Ac-Ps4.1 + Ac-Ps7.6						
	Isard	NIL9.0a	0 QTL						
		NIL9.0b	0 QTL						
		NIL9.4.1a	Ac-Ps4.1						
NIL 549.70	Isard	NIL10.0a	0 QTL						
		NIL10.0b	0 QTL						
		NIL10.0c	0 QTL						
		NIL10.0d	0 QTL						
		NIL10.1.2a	Ac-Ps1.2						
		NIL10.1.2b	Ac-Ps1.2						
		NIL10.2.2a	Ac-Ps2.2						
		NIL10.2.2b	Ac-Ps2.2						
		NIL10.2.2c	Ac-Ps2.2						
		NIL10.2.2d	Ac-Ps2.2						
		NIL10.3.1a	Ac-Ps3.1						
NIL 549.70	Isard	NIL11.0a	0 QTL						
		NIL11.0b	0 QTL						
		NIL11.1.2a	Ac-Ps1.2						
		NIL11.1.2b	Ac-Ps1.2						
		NIL11.2.2a	Ac-Ps2.2						
		NIL11.2.2b	Ac-Ps2.2						
		NIL11.3.1a	Ac-Ps3.1						
		NIL11.3.1b	Ac-Ps3.1						
		NIL11.1.2/2.2a	Ac-Ps1.2 + Ac-Ps2.2						
		NIL11.1.2/2.2b	Ac-Ps1.2 + Ac-Ps2.2						
		NIL11.1.2/3.1a	Ac-Ps1.2 + Ac-Ps3.1						
NIL 549.70	Isard	NIL12.0a	0 QTL						
		NIL12.0b	0 QTL						
		NIL12.1.2a	Ac-Ps1.2						
		NIL12.1.2b	Ac-Ps1.2						
		NIL12.2.2a	Ac-Ps2.2						
		NIL12.2.2b	Ac-Ps2.2						
		NIL12.3.1a	Ac-Ps3.1						
		NIL12.3.1b	Ac-Ps3.1						
		NIL12.1.2/2.2a	Ac-Ps1.2 + Ac-Ps2.2						
		NIL12.1.2/2.2b	Ac-Ps1.2 + Ac-Ps2.2						
		NIL12.1.2/3.1a	Ac-Ps1.2 + Ac-Ps3.1						
NIL 549.70	Isard	NIL13.0a	0 QTL						
		NIL13.0b	0 QTL						
		NIL13.2.2a	Ac-Ps2.2						
		NIL13.2.2b	Ac-Ps2.2						
		NIL13.3.1a	Ac-Ps3.1						
		NIL13.3.1b	Ac-Ps3.1						
		NIL13.7.6a	Ac-Ps7.6						
		NIL13.7.6b	Ac-Ps7.6						
		NIL13.2.2/7.6a	Ac-Ps2.2 + Ac-Ps7.6						
		NIL13.2.2/7.6b	Ac-Ps2.2 + Ac-Ps7.6						
		NIL13.3.1/7.6a	Ac-Ps3.1 + Ac-Ps7.6						
NIL 549.70	Isard	NIL14.0a	0 QTL						
		NIL14.0b	0 QTL						
		NIL14.2.2a	Ac-Ps2.2						
		NIL14.2.2b	Ac-Ps2.2						
		NIL14.3.1a	Ac-Ps3.1						
		NIL14.3.1b	Ac-Ps3.1						
		NIL14.7.6a	Ac-Ps7.6						
		NIL14.7.6b	Ac-Ps7.6						
		NIL14.2.2/3.1a	Ac-Ps2.2 + Ac-Ps3.1						
		NIL14.2.2/3.1b	Ac-Ps2.2 + Ac-Ps3.1						
		NIL14.2.2/7.6a	Ac-Ps2.2 + Ac-Ps7.6						
NIL 549.70	Isard	NIL15.0a	0 QTL						
		NIL15.0b	0 QTL						
		NIL15.2.2a	Ac-Ps2.2						
		NIL15.2.2b	Ac-Ps2.2						
		NIL15.3.1a	Ac-Ps3.1						
		NIL15.3.1b	Ac-Ps3.1						
		NIL15.7.6a	Ac-Ps7.6						
		NIL15.7.6b	Ac-Ps7.6						
		NIL15.2.2/3.1a	Ac-Ps2.2 + Ac-Ps3.1						
		NIL15.2.2/3.1b	Ac-Ps2.2 + Ac-Ps3.1						
		NIL15.2.2/7.6a	Ac-Ps2.2 + Ac-Ps7.6						
NIL 549.70	Isard	NIL16.0a	0 QTL						
		NIL16.0b	0 QTL						
		NIL16.5.1a	Ac-Ps5.1						
		NIL16.5.1b	Ac-Ps5.1						
		NIL16.7.6a	Ac-Ps7.6						
		NIL16.7.6b	Ac-Ps7.6						
		NIL16.5.1/7.6a	Ac-Ps5.1 + Ac-Ps7.6						
		NIL16.5.1/7.6b	Ac-Ps5.1 + Ac-Ps7.6						
	Isard	NIL17.0a	0 QTL						
		NIL17.0b	0 QTL						
		NIL17.4.1a	Ac-Ps4.1						

<i>Ac-Ps4.1</i>	<i>Ac-Ps4.5</i>	<i>Ac-Ps5.1</i>		<i>Ac-Ps7.6</i>	Nbr TOTAL de SNP polymorphe	RGC %	DGC %
					2830	100	
					2830	100	
					2830	100	100
					4795	100	
					4794	98.4	
					4794	97.6	100
					4795	97.6	100
					4144	100	
					4143	100	
					4144	98.3	100
					4143	98.3	100
					2863	100	
					2863	100	
					2863	97.1	100
					2862	97.1	100
					2862	94.0	100
					2862	93.2	100
					2862	90.8	100
					2862	90.8	100
					4735	100	
					4736	100	
					4730	97.8	100
					4733	97.5	100
					4711	99.1	100
					4734	97.0	100
					4735	96.4	100
					4648	96.4	100
					4338	98.3	
					4337	99.4	
					4334	97.2	100
					4334	95.6	100
					4339	98.2	100
					4337	98.7	100
					4341	95.3	100
					4334	95.5	100
					4484	100	
					4400	99.6	
					4487	93.4	100
					4400	94.4	100
					4483	95.6	100
					4568	93.2	100
					4503	90.9	100
					4575	94.2	100
					4996	100	
					4996	99.9	
					4996	98.9	100
					4996	99.4	100
					4996	98.5	98.6
					4996	98.5	98.6
					4996	97.9	98.5
					4996	97.9	98.5
					3982	99.4	
					3982	100	
					3982	96.1	100
					3982	96.1	100
					3982	96.3	100
					3982	96.8	100
					3982	92.8	100
					3982	92.8	100
					2915	99.1	
					2915	100	
					2915	97.5	100
					2915	95.6	100
					2915	97.4	100
					2915	97.4	100
					2915	94.7	100
					2915	94.7	100
					4850	100	
					4850	100	
					4850	100	
					4848	99.4	
					4850	99.7	100
					4848	98.1	100
					4847	96.5	100
					4849	98.9	100
					4849	98.9	100
					4850	98.7	100
					4847	97.5	100
					4849	97.5	100
					4847	97.8	100
					4850	96.1	100
					4457	98.3	
					4528	97	
					4462	97.9	100
					4462	97.9	100
					4524	97	100
					4468	95.6	100
					4521	98.3	15.2
					4511	98.1	15.2
					4526	94.2	100
					4511	93.6	100
					4526	97.7	41.8
					4525	94.7	41.8
					4527	95.5	37
					4525	93.1	37
					4490	93.2	53.1
					4461	90.6	53.1
					4466	92.6	52.9
					3690	99.2	
					3691	99.2	
					3690	95.9	100
					0	NA	NA
					3691	97	100
					3689	91.9	100
					3678	97.3	100
					3689	96.7	100
					3690	94.5	100
					3691	95.7	100
					3690	94.4	100
					3690	96.9	100
					3689	94	94.3
					3688	94.3	81.1
					3862	100	
					3862	99.7	
					3862	97.9	100
					3862	96.7	100
					3861	96.9	100
					3861	96.6	100
					3862	99.7	59.2
					3862	99.4	98.1
					3862	95.6	66.7
					3862	98.3	98.4
					3861	96.2	87.2
					3861	96.5	99.2
					3860	94.1	84.2
					3861	94.8	99.2
					4750	100	
					4750	100	
					4750	97.6	100
					4750	98	100
					4750	96.9	0
					4749	98.7	0
					4750	98.8	64.9
					4750	96.8	64.9
					4750	94.8	11.2
					4750	92.4	11.2
					4750	96.8	69.9
					4750	96.8	69.9
					4750	93.5	27.5
					4750	95.6	32.7
					4590	99.6	
					4590	97.7	
					4590	96.7	100
					4590	95.6	100
					4590	96.5	6.4
					4590	96.5	6.4
					4590	98.7	90.5
					4590	97.4	90.5
					4590	94.0	19.5
					4590	94.1	19.5
					4590	93.8	91.7
					4590	96.6	91.7
					4590	95	52.3
					4590	96.2	52.3
					4590	92.5	55.6
					4590	93.3	55.6

Ainsi, on constate que la quasi-totalité des sets de NILs possède des introgressions supérieures aux intervalles de confiance (IC) des QTL ciblés. Par exemple, pour le set de NIL 4, les introgressions des deux QTL *Ae-Ps4.5* et *Ae-Ps7.6* sont deux fois plus grandes que l'IC des QTL (Figure 1). A l'inverse, seuls trois sets de NILs (NIL10, 12 et 13) sur les six possèdent réellement le QTL *Ae-Ps3.1*. Les sets de NILs 11, 14 et 15 ont perdu l'introgression en partie centrale du QTL *Ae-Ps3.1* et ont conservé des parties de segments donneurs dans l'une et/ou l'autre des régions flanquant le QTL. Les pourcentages de génome donneur (DGC) des NILs sélectionnées pour ne porter que ce QTL sont de 15.2%, 0% et 6.4%, respectivement (Figure 1).

De la même manière, le segment donneur n'est pas présent au niveau de la partie supérieure du QTL *Ae-Ps7.6*, dans les lignées du set de NIL 14 et dans les NILs (a) du set de NIL 13 (Figure 1). Le DGC de la NIL du set de NIL 14 sélectionnée pour comporter les deux QTL *Ae-Ps3.1* et *Ae-Ps7.6* est faible (27.5%).

Enfin, quelques NILs [NIL12-1.2/2.2/3.1(a et b) et NIL13-3.1/7.6a] présentent des marqueurs hétérozygotes dans les zones à QTL ciblés. Plusieurs NILs sont également hétérozygotes dans les zones flanquant les QTL ciblés (par exemple, les NILs du set 4 au QTL *Ae-Ps5.1*, du set 12 au QTL *Ae-Ps1.2* et du set 13 au QTL *Ae-Ps3.1*) ou dans les zones à QTL des NILs n'ayant pas été sélectionnée pour le QTL ciblée (par exemple, NIL5-5.1(a et b), NIL15-0b et NIL15-2.2b au QTL *Ae-Ps7.6*).

Génome des NILs en dehors des QTL

Les génotypes graphiques des NILs obtenus montrent un niveau de retour du génome au fonds « receveur » en dehors des zones à QTL (Recipient Genome Content, RGC) supérieur à 90 % pour l'ensemble des NILs, pouvant atteindre 100% pour 20 NILs. Certains fragments donneurs, à l'état homozygote ou hétérozygote, restent présents en dehors des zones à QTL, spécialement dans les sets de NILs issus de schémas visant à introgresser simultanément trois QTL. Ainsi, des résidus de fragments donneurs sont présents sur des groupes de liaison (LG, Linkage Group) non porteurs de QTL dans les sets de NIL 14 et 15 sur le LGI et dans le set de NIL 11 sur le LGVII. Le même constat est réalisé sur des LG porteurs de QTL dans des zones voisines ou non des QTL cibles, *i.e.* dans le set de NIL 16 sur le LGVII, le set 10 sur le LGIII et le set 12 sur les LGI, II et III (Figure 1).

Malgré le génotypage dense des NILs, toutes les zones du génome n'ont pas été couvertes par les marqueurs polymorphes (Figure 1). L'absence de polymorphisme entre parents de NILs dans ces zones, de tailles parfois assez larges (65 cM sur LGII, 52 cM sur LGV), se trouve le

plus souvent dans des régions où la lignée parentale donneuse a acquis le génome du parent receveur de référence, ce dernier comportant des allèles souvent similaires à ceux des variétés receveuses.

EVALUATION DES NILS POUR LA RESISTANCE A *A. EUTEICHES* AU CHAMP

Dans cette partie, seuls les résultats d'analyse des données disponibles de sévérité de la maladie sur racines (DS), collectées sur deux lieux (Riec-sur-Belon, Dijon-Epoisses) et deux années (2014, 2015), sont présentés.

L'analyse réalisée sur le témoin adjacent Solara, n'a pas révélé d'hétérogénéité de potentiel infectieux du sol au sein des pépinières dans les quatre expérimentations (Annexe III.2). L'ensemble des analyses a donc été réalisé sur les notes individuelles de pourriture racinaire (DS), non pondérées par rapport à celles des témoins adjacents. L'analyse de déviance, réalisée sur les données de l'ensemble des NILs des quatre expérimentations (sans les témoins), montre une interaction hautement significative entre les génotypes, lieux et années (Tableau 1). L'analyse a donc été poursuivie pour chaque expérimentation, menée sur chaque lieu et chaque année.

Tableau I : Analyse de déviance réalisée sur l'ensemble des 157 NILs et des quatre essais pour la variable DS

	Chisq	Df	P	
Génotype	2553.0231	156	< 2.2e-16	***
Lieu	102.9598	1	< 2.2e-16	***
Année	2.3825	1	0.1226987	
Lieu x Année	14.3840	1	0.0001491	***
Génotype x Lieu	612.0050	156	< 2.2e-16	***
Génotype x Année	564.8976	156	< 2.2e-16	***
Génotype x Lieu x Année	638.4024	153	< 2.2e-16	***

P : *** < 0.001 ; ** < 0.01 ; * < 0.05

Distribution des fréquences de l'ensemble des NILs pour la résistance au champ (DS)

L'analyse LMM des données DS obtenues sur l'ensemble des NILs a montré un effet génotypique hautement significative ($P < 0.001$), dans chacune des quatre expérimentations. L'héritabilité du caractère observé dans les tests a été élevée, soit 0.87 et 0.90 à Riec-sur-Belon et 0.85 et 0.77 à Dijon-Epoisses, en 2014 et 2015, respectivement. Les valeurs de LSMeans des DS et les erreurs standards obtenues pour chaque NIL dans les différentes expérimentations sont détaillées dans l'Annexe III.3.

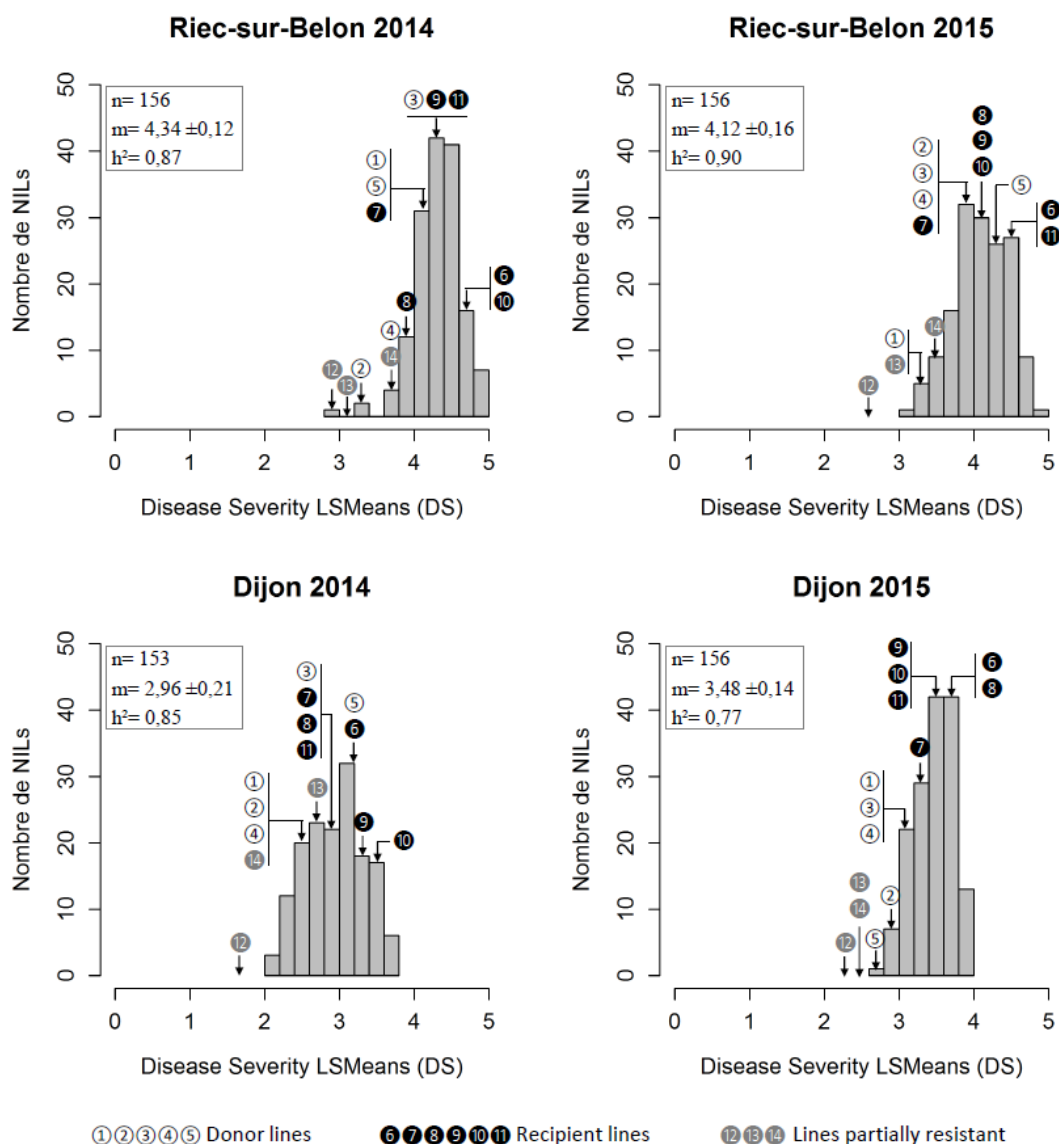


Figure 2 : Distribution de fréquence des notes de sévérité de la pourriture racinaire à *A. euteiches* (DS, moyennes ajustées) obtenues sur l'ensemble des 157 NILs de pois sur deux lieux et deux années.

Les valeurs (LSMeans) de DS (root Disease Severity) des lignées parentales « donneuses » et « receveuses » des NILs, ainsi que celles des témoins résistants issus du programme GSP, sont représentées, respectivement, en blanc, noir et gris : 1-RIL 847.50, 2-RIL BAP8.195, 3-RIL BAP8.70, 4-552 et 5-RIL 831.08 ; 6-Eden, 7-Isard, 8-DSP, 9-Puget, 10 et 11 Baccara-Enduro ; 12-AeD99OSW-45-8-7, 13- AeD99QU-04-9-10-1 et 14- AeD99OSW- 50-2-5. n: nombre total de NILs évaluées, m: moyenne ± écart-type de l'ensemble des NILs, h²: héritabilité.

Tableau II : Bilan des deux types d'analyse LMM (par environnement ou globale) des données de sévérité de la pourriture racinaire à *A. euteiches* obtenues sur deux lieux et deux années, effectués sur chaque set de NILs

Dans chaque set, les valeurs de DS (LSMeans) des NILs porteuses de QTL ont été comparées par rapport à trois témoins, *i.e.* les 2 NIL sœurs dépourvues de QTL (NIL0a, NIL0b) et le parent receveur (Tem.S). La différence significative de DS (Tukey, $P < 0.05$) d'une NIL par rapport à chaque témoin, a été noté par une étoile (*) et indiquée en orange clair, orange foncé ou vert selon qu'elle a été révélée d'après, respectivement, les analyses individuelles dans chaque environnement, l'analyse globale multi-environnements ou l'analyse précédemment réalisée en conditions contrôlées avec la souche RB84 (Lavaud et al. 2015). Le nombre d'environnements dans lesquels une NIL a révélé une différence significative de DS par rapport à au moins l'un des trois témoins est indiqué en rouge lorsque ce nombre est supérieur ou égal à deux. NA : Donnée manquante.

Lignée Donneuse	Lignée Receveuse	Code NIL	QTL	Analyse détaillé par Lieu et Année												Nbre environnements avec effet significatif par rapport à au moins un des trois témoins	Analyse globale (Lieu + Année)			Résultats RB84 Lavaud et al. 2015		
				Riec 2014			Riec 2015			Dijon 2014			Dijon 2015				NIL0a	NIL0b	Tem.S			
				NIL0a	NIL0b	Tem.S	NIL0a	NIL0b	Tem.S	NIL0a	NIL0b	Tem.S	NIL0a	NIL0b	Tem.S							
RIL 831.08	Puget	NIL1-4.5a	Ae-Ps4.5												1							
		NIL1-4.5b	Ae-Ps4.5																			
	Isard	NIL2-4.5a	Ae-Ps4.5																			
		NIL2-4.5b	Ae-Ps4.5																			
	Eden	NIL3-4.5a	Ae-Ps4.5																			
		NIL3-4.5b	Ae-Ps4.5																			
	DSP	NIL4-5.1a	Ae-Ps5.1	*	*											1				*	*	
		NIL4-5.1b	Ae-Ps5.1	*												1				*	*	
NIL4-7.6a		Ae-Ps7.6				*									1			*	*	*		
NIL4-7.6b		Ae-Ps7.6	*	*									*		2			*	*	*		
NIL4-5.1/7.6a		Ae-Ps5.1 + Ae-Ps7.6	*	*		*	*		*					3			*	*	*	*		
NIL4-5.1/7.6b		Ae-Ps5.1 + Ae-Ps7.6	*	*	*		*	*				*		3			*	*	*	*		
Isard	NIL5-5.1a	Ae-Ps5.1																	*	*	*	
	NIL5-5.1b	Ae-Ps5.1																	*	*	*	
	NIL5-7.6a	Ae-Ps7.6																*	*	*		
	NIL5-7.6b	Ae-Ps7.6																*	*	*		
	NIL5-5.1/7.6a	Ae-Ps5.1 + Ae-Ps7.6																*	*	*		
	NIL5-5.1/7.6b	Ae-Ps5.1 + Ae-Ps7.6				*	*		*					1			*	*	*	*		
	Eden	NIL6-5.1a	Ae-Ps5.1																	*	*	*
		NIL6-5.1b	Ae-Ps5.1																	*	*	*
		NIL6-7.6a	Ae-Ps7.6							*	*	*				1			*	*	*	
		NIL6-7.6b	Ae-Ps7.6	*	*					*	*	*				2			*	*	*	
		NIL6-5.1/7.6a	Ae-Ps5.1 + Ae-Ps7.6				*	*	*		*			*		3			*	*	*	
		NIL6-5.1/7.6b	Ae-Ps5.1 + Ae-Ps7.6				*	*	*	*	*	*			2			*	*	*	*	
Enduro	NIL16-5.1a	Ae-Ps5.1							*						1						NA	
	NIL16-5.1b	Ae-Ps5.1																			NA	
	NIL16-7.6a	Ae-Ps7.6							*						1			*	*	*	NA	
	NIL16-7.6b	Ae-Ps7.6							*						1			*	*	*	NA	
	NIL16-5.1/7.6a	Ae-Ps5.1 + Ae-Ps7.6							*						1			*	*	*	NA	
	NIL16-5.1/7.6b	Ae-Ps5.1 + Ae-Ps7.6							*						1			*	*	*	NA	
	RIL BAP8.70	Baccara	NIL7-4.1a	Ae-Ps4.1		*	*				*	*					2			*	*	*
			NIL7-4.1b	Ae-Ps4.1																*	*	*
NIL7-7.6a			Ae-Ps7.6							*	*		*			1			*	*	*	
NIL7-7.6b			Ae-Ps7.6							*	*		*			2			*	*	*	
NIL7-4.1/7.6a			Ae-Ps4.1 + Ae-Ps7.6		*	*	*		*	*		*	*		3			*	*	*	*	
NIL7-4.1/7.6b			Ae-Ps4.1 + Ae-Ps7.6		*	*	*		*	*		*	*	*	3			*	*	*	*	
Isard		NIL8-4.1a	Ae-Ps4.1	*	*											1			*	*	*	*
		NIL8-4.1b	Ae-Ps4.1										*			1			*	*	*	*
		NIL8-7.6a	Ae-Ps7.6	*	*								*			1			*	*	*	*
		NIL8-7.6b	Ae-Ps7.6																*	*	*	*
		NIL8-4.1/7.6a	Ae-Ps4.1 + Ae-Ps7.6				*	*	*		*	*	*	*	1			*	*	*	*	*
		NIL8-4.1/7.6b	Ae-Ps4.1 + Ae-Ps7.6				*	*	*		*	*	*	*	1			*	*	*	*	*
Eden		NIL9-4.1a	Ae-Ps4.1							*												
		NIL9-4.1b	Ae-Ps4.1							*												
		NIL9-7.6a	Ae-Ps7.6							*				*	*	*	3			*	*	*
		NIL9-7.6b	Ae-Ps7.6	*	*		*	*		*			*	*	*	3			*	*	*	*
		NIL9-4.1/7.6a	Ae-Ps4.1 + Ae-Ps7.6	*	*	*				*	*	*	*	*	1			*	*	*	*	*
		NIL9-4.1/7.6b	Ae-Ps4.1 + Ae-Ps7.6	*	*	*				*	*	*	*	*	2			*	*	*	*	*
RIL BAP8.195	Baccara	NIL10-1.2a	Ae-Ps1.2	*	*	*										1						
		NIL10-1.2b	Ae-Ps1.2																			
		NIL10-2.2a	Ae-Ps2.2																			
		NIL10-2.2b	Ae-Ps2.2																			
		NIL10-2.2c	Ae-Ps2.2																			
		NIL10-2.2d	Ae-Ps2.2																			
		NIL10-3.1a	Ae-Ps3.1																			
		NIL10-3.1b	Ae-Ps3.1																			
		NIL10-1.2/2.2a	Ae-Ps1.2 + Ae-Ps2.2	*	*	*										1			*	*	*	
		NIL10-1.2/2.2b	Ae-Ps1.2 + Ae-Ps2.2																			
	Isard	NIL11-1.2a	Ae-Ps1.2								NA	NA	NA									
		NIL11-1.2b	Ae-Ps1.2				*	*			NA	NA	NA			1			*	*	*	*
		NIL11-2.2a	Ae-Ps2.2									NA	NA	NA			1					
		NIL11-2.2b	Ae-Ps2.2																			
		NIL11-3.1a	Ae-Ps3.1									NA	NA	NA								
		NIL11-3.1b	Ae-Ps3.1										NA	NA	NA							
		NIL11-1.2/2.2a	Ae-Ps1.2 + Ae-Ps2.2																	*	*	
		NIL11-1.2/2.2b	Ae-Ps1.2 + Ae-Ps2.2				*	*		*	*	*			2			*	*	*	*	
		NIL11-1.2/3.1a	Ae-Ps1.2 + Ae-Ps3.1									NA	NA	NA								
		NIL11-1.2/3.1b	Ae-Ps1.2 + Ae-Ps3.1										NA	NA	NA							
		NIL11-2.2/3.1a	Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1										NA	NA	NA						*	
		NIL11-2.2/3.1b	Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1											NA	NA	NA					*	
	NIL11-1.2/2.2/3.1a	Ae-Ps1.2 + Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA						*		
	NIL11-1.2/2.2/3.1b	Ae-Ps1.2 + Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1																		*		
	NIL11-1.2/2.2/3.1c	Ae-Ps1.2 + Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1																				
	Eden	NIL12-1.2a	Ae-Ps1.2							*			*	*	*				*	*	*	*
		NIL12-1.2b	Ae-Ps1.2							*			*	*	*				*	*	*	*
		NIL12-2.2a	Ae-Ps2.2																			
NIL12-2.2b		Ae-Ps2.2							*													
NIL12-2.2c		Ae-Ps2.2							*													
NIL12-3.1a		Ae-Ps3.1							*						1							
NIL12-3.1b		Ae-Ps3.1							*						1							
NIL12-1.2/2.2a		Ae-Ps1.2 + Ae-Ps2.2				*	*		*	*	*				1							
NIL12-1.2/2.2b		Ae-Ps1.2 + Ae-Ps2.2				*	*		*	*	*				1			*	*	*		
NIL12-1.2/3.1a		Ae-Ps1.2 + Ae-Ps3.1				*	*		*	*	*				1			*	*	*		
NIL12-2.2/3.1a		Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1							*	*	*	*	*		1			*	*	*		
NIL12-1.2/2.2/3.1a		Ae-Ps1.2 + Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1				*	*		*	*	*	*	*		2			*	*	*		
NIL12-1.2/2.2/3.1b		Ae-Ps1.2 + Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*		3			*	*	*		
552		Baccara	NIL13-2.2a	Ae-Ps2.2																		
			NIL13-2.2b	Ae-Ps2.2																		
			NIL13-3.1a	Ae-Ps3.1																		
	NIL13-3.1b		Ae-Ps3.1			*					NA	NA	NA			1					*	*
	NIL13-7.6a		Ae-Ps7.6																			
	NIL13-7.6b		Ae-Ps7.6																		*	
	NIL13-2.2/7.6a		Ae-Ps2.2 + Ae-Ps7.6																		*	
	NIL13-2.2/7.6b		Ae-Ps2.2 + Ae-Ps7.6																		*	
	NIL13-3.1/7.6a		Ae-Ps3.1 + Ae-Ps7.6			*										1			*	*	*	
	NIL13-3.1/7.6b		Ae-Ps3.1 + Ae-Ps7.6																*	*	*	
	NIL13-2.2/3.1/7.6a		Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1 + Ae-Ps7.6										*			1			*	*	*	
	NIL13-2.2/3.1/7.6b		Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1 + Ae-Ps7.6										*			1			*	*	*	
	Isard	NIL14-2.2a	Ae-Ps2.2										*	*								
		NIL14-2.2b	Ae-Ps2.2										*	*								
		NIL14-3.1a	Ae-Ps3.1																			

La distribution de fréquence des DS (LSMeans) obtenues sur l'ensemble des NILs dans chaque expérimentation a présenté une allure continue et gaussienne (Figure 2). Le niveau moyen de sévérité de la maladie sur racines a été plus élevé à Riec-sur-Belon qu'à Dijon, sur les deux années. Le classement des témoins a été conforme à celui attendu, avec les lignées parentales « donneuses » des NILs présentant des niveaux moyens à élevés de résistance partielle et les témoins (Roux-Duparque et al. 2004) présentant les meilleurs niveaux de résistance partielle. La lignée « donneuse » RIL831.08, résistante aux souches du pathotype III non identifié à ce jour en France, a présenté un niveau de résistance élevé à Dijon en 2015. Des NILs transgressives, *i.e.* plus sensibles ou plus résistantes que les lignées parentales, ont été identifiées dans les différentes expérimentations. Néanmoins, aucune NIL ne s'est avérée plus résistante que le témoin AeD99OSW-45-8-7.

Effet des QTL, seul ou en combinaison, sur la résistance au champ dans chaque set de NILs

Le test de comparaison multiple des valeurs de DS (LSMeans) effectué par set de NILs dans chaque environnement (analyse détaillée) ou sur les quatre environnements (analyse globale), a permis de mettre en évidence des différences significatives consistantes entre NILs avec et sans QTL, dans les sets ayant introgressé des allèles de résistance d'origine « 90-2131 » (lignée « donneuse » RIL 847.50) ou « PI180693 » (lignées « donneuses » RIL BAP8-70 et RIL BAP8-195) (Tableau II).

Dans les sets de NILs dérivés de la lignée parentale « donneuse » RIL 847.50, un effet variable du QTL *Ae-Ps7.6*, seul ou en combinaison avec le QTL *Ae-Ps5.1*, a été observé selon le fonds génétique « receveur », dans les deux types d'analyse. Dans les fonds « printemps » (DSP et Eden), les NILs porteuses du QTL *Ae-Ps7.6* ont montré des différences hautement significatives par rapport aux témoins dépourvus du QTL. Dans les fonds « hiver » (Isard et Enduro), ces différences ont été moins fréquemment observées et spécifiques de Riec-sur-Belon 2015, à l'inverse des observations réalisées en conditions contrôlées (Lavaud et al. 2015). Les NIL possédant la combinaison des deux QTL *Ae-Ps7.6* et *Ae-Ps5.1* ont eu un effet sur la résistance plus élevée dans le fonds « référence » et plus fréquemment observé dans les fonds « Elite » supérieur par rapport à celui du QTL *Ae-Ps7.6* seul, malgré l'absence d'effet significatif du QTL *Ae-Ps5.1* seul par rapport aux témoins (sauf à Riec-sur-Belon 2014 et 2015 dans les fonds, respectivement, DSP et Enduro).

Dans les sets de NILs dérivés de la lignée « donneuse » RIL BAP8.70, l'effet significatif du QTL *Ae-Ps7.6* seul a été de nouveau observé dans les trois fonds génétiques, et sur plusieurs

environnements dans les fonds « printemps » (Baccara et Eden). Un effet significatif d'une NIL porteuse du QTL individuel *Ae-Ps4.1* a également été identifié dans les trois fonds, spécifiquement d'un ou deux environnements. Cet effet du QTL *Ae-Ps4.1* n'avait pas été observé en conditions contrôlées (Lavaud et al. 2015). L'effet de la combinaison des QTL *Ae-Ps7.6* et *Ae-Ps4.1* a été significatif dans les trois fonds, notamment sur plusieurs environnements dans le fonds Baccara.

Dans les sets de NILs dérivés de la lignée « donneuse » RIL BAP8.195, les QTL *Ae-Ps1.2* et *Ae-Ps2.2*, seuls ou en combinaison, ont présenté des effets significatifs dans un ou deux environnements et au moins deux fonds receveurs. L'effet du QTL *Ae-Ps2.2*, seul ou en combinaison avec le QTL *Ae-Ps1.2*, avaient été observés de manière mineure en conditions contrôlées dans les fonds Baccara et Isard (Lavaud et al. 2015). La combinaison des trois QTL *Ae-Ps1.2*, *Ae-Ps2.2* et *Ae-Ps3.1* a présenté un effet significatif consistant spécifiquement dans le fonds Eden, qui n'avait pas été précédemment observé en conditions contrôlées.

Dans les sets de NILs possédant les allèles du donneur 552, les trois QTL *Ae-Ps2.2*, *Ae-Ps3.1* et *Ae-Ps7.6* en combinaison ont présenté un effet significatif de manière environnement-spécifique dans chacun des trois fonds. Néanmoins, leurs effets individuels ou en combinaisons deux à deux n'ont pas été significatifs, sauf dans quelques exceptions (NIL14-2.2b, NIL13-3.1b et NIL13-3.1/7.6a). La combinaison des trois QTL avait également été identifiée pour son effet mineur en conditions contrôlées (Lavaud et al. 2015), dans les fonds Baccara et Isard.

Les NILs issus de la lignée donneuse RIL 831.08 n'ont pas permis de mettre en évidence d'effet significatif du QTL *Ae-Ps4.5* sur la résistance au champ, sauf à Dijon en 2014, ce qui est cohérent avec les résultats en condition contrôlée d'effet de ce QTL sur les souches du pathotype III non identifié en France.

En résumé, sur l'ensemble des résultats obtenus, les NILs présentant des niveaux de résistance sur racines au champ significativement supérieures aux autres NILs et témoins sensibles ont été:

- Avec des effets consistants, les NILs porteuses des allèles de résistance PI180693 ou 90-2131 au QTL *Ae-Ps7.6*, seul ou en combinaison avec le QTL *Ae-Ps4.1* ou *Ae-Ps5.1*, respectivement.
- Avec des effets moins consistants, (i) les NILs porteuses des allèles de résistance PI180693 au QTL *Ae-Ps2.2* ou *Ae-Ps1.2*, seuls ou en combinaison entre elles ou avec le

QTL *Ae-Ps3.1* et (ii) les NILs porteuses des allèles de résistance 552 à la combinaison des trois QTL *Ae-Ps2.2*, *Ae-Ps3.1* et *Ae-Ps7.6*.

L'ensemble de ces effets observés des QTL sur le DS au champ l'ont été également en conditions contrôlées avec la souche RB84 (Lavaud et al. 2015), sauf pour les QTL *AePs1.2*, *Ae-Ps3.1* et *Ae-Ps4.1* (allèles PI180693) qui n'avaient pas présenté d'effets seuls et/ou en combinaison. Les NILs possédant les mêmes introgressions ont pu présenter des niveaux de résistance différents, selon les fonds d'introgression de type hiver ou printemps.

DISCUSSION

Les objectifs du chapitre présenté ont consisté à valider les effets des principaux QTL de résistance à *A. euteiches* au champ et identifier les combinaisons de QTL permettant de limiter la sévérité de la maladie. Des NILs porteuses ou non d'allèles de résistance un, deux ou trois QTL, issues du programme de BAM précédemment décrit par Lavaud et al. (2015), ont été génotypées à l'aide d'une puce SNP Illumina Infinium et phénotypées en pépinières infestées sur un réseau multi-local pour la résistance sur parties racinaires et aériennes. Dans ce chapitre, seules les données de phénotypage obtenues sur parties racinaires sur deux lieux (Riec-sur-Belon, Dijon-Epoisses) et deux années (2014, 2015) ont été exploitées, par manque de disponibilité des données complètes sur parties aériennes au moment de l'écriture du manuscrit. Dans cette partie, les principaux résultats obtenus sont rappelés et discutés au regard des objectifs visés.

CARACTERISATION GENOMIQUE DES NILS

Le génotypage des 157 NILs à l'aide de 10,494 SNPs, dont 27 à 48% a été exploité pour caractériser chaque NIL, a permis (i) de confirmer la présence des segments introgressés, avec des tailles variables selon les NILs, sauf aux QTL *Ae-Ps3.1* (allèles 552 et PI180693) et *Ae-Ps7.6* (allèle PI180693), respectivement, dans trois et deux sets de NILs et (ii) d'identifier des zones génomiques en dehors des QTL qui présentent des résidus de fragments donneurs, spécialement dans les zones flanking les QTL, ou qui restent non assignées aux génomes parentaux par manque de marqueurs polymorphes. Par rapport à la description précédente du génome des NILs (Lavaud et al. 2015), ce génotypage dense a permis d'apporter davantage de précision pour confirmer le contenu génomique des NILs et pour révéler de nouvelles informations (taille des introgressions, perte de fragments introgressés, résidus de fragments donneurs en dehors des zones à QTL).

Dans la majorité des NILs, la taille des fragments introgressés a été estimée plus élevée que celle de l'IC des QTL précédemment détectés (Hamon et al. 2011; 2013; Pilet-Nayel et al.

2002, 2005). D'une part, le faible nombre de marqueurs disponibles (SSRs) au moment de la construction des NILs a conduit à une sélection moins stringente et moins précise d'individus aux QTL ainsi que dans les zones flanquantes. D'autre part, les effectifs de plantes utilisés à chaque génération de SAM lors de la production des NILs [45 à 91 plantes, selon le nombre d'introgessions simultanées, (Lavaud et al. 2015)] n'a pas permis d'exercer une pression de sélection forte sur les zones flanquant les QTL, comme discuté dans Lavaud et al. (2015). Ainsi, dans le schéma ayant visé la seule introgression du QTL *Ae-Ps4.5* dans les fonds « receveurs » Puget et Eden, les effectifs de plantes (45) et le nombre de marqueurs aux QTL et aux zones flanquantes (3 et 5, respectivement) ont permis d'obtenir des introgressions de tailles proches de celle de l'IC du QTL initialement ciblé [NIL1-4.5(a et b) ; NIL3-4.5(a et b)]. Les larges tailles de fragments introgressés ont résulté de la validation des allèles donneurs dans les IC des QTL (DGC>94%) dans 12 des 16 sets de NILs.

Des pertes de fragments donneurs dans les zones des QTL ont été observées dans quatre sets de NILs. Ainsi, les valeurs de DGC ont varié de 6.4% à 84.2% dans les NILs ayant perdu un(des) segment(s) du parent « donneur » à un, deux ou trois QTL. L'introgession du parent « donneur » a été perdue au QTL *Ae-Ps3.1* comme suggéré par Lavaud et al. (2015), ainsi qu'une partie d'introgession au QTL *Ae-Ps7.6*. Ces fragments perdus sont essentiellement dû au manque de marqueurs polymorphes qui ont été disponibles pour tracer les introgressions sur toutes leurs longueurs. Ainsi, un seul marqueur SSR polymorphe a pu être utilisé pour tracer l'introgession «552 » au QTL *Ae-Ps3.1* dans la construction des sets de NILs 14 et 15, ayant résulté en la seule introgression de la région flanquante inférieure du QTL. Trois marqueurs SSR flanquant l'IC du QTL ont été utilisés pour tracer l'introgession « PI108693 » au QTL *Ae-Ps3.1*, résultant en la perte du fragment « donneur » central par double recombinaison dans le set de NILs 11. La perte du fragment « donneur » au QTL *Ae-Ps3.1* peut expliquer l'absence d'effet du QTL *Ae-Ps3.1*, seul ou en combinaison avec les QTL *Ae-Ps1.2* et/ou *Ae-Ps2.2*, dans les sets de NILs 11, 14 et 15 dépourvus de l'introgession, alors que cet effet a été détecté dans les sets de NILs 12 et 13 porteuses de l'introgession. Au total, 23 NILs dépourvues de l'introgession au QTL *Ae-Ps3.1*, sont donc non éligibles à la validation de QTL, seuls ou en combinaison. Au QTL *Ae-Ps7.6*, une partie de l'introgession a été perdue dans les sets de NIL 13, 14 et 15, mais ne semble pas avoir conduit à l'observation de différences d'effet phénotypique par rapport à certaines NILs porteuses de l'introgession complète dans le set de NILs 13. Hospital et al. (2005) a

préconisé l'usage d'au moins trois marqueurs par IC d'un QTL (deux flanquants et un au milieu) pour pouvoir introgresser le QTL avec succès lors de la SAM.

Le niveau de retour au fonds génétique « receveur » hors des zones d'introgression peut biaiser l'estimation de l'effet des QTL introgressés, dans le cas où des fragments donneurs à effet sur la résistance subsisteraient en dehors des zones d'introgression. Dans cette étude, nous avons montré un très bon retour au parent « receveur » (RGC > 90%) après cinq ou six générations de Backcross pour les fonds « Reference » ou « Elite », respectivement. Néanmoins, quelques résidus de fragments de génome « donneur » ont été identifiés sur les LGI, II, III en dehors des zones à QTL et de leurs régions flanquantes, spécialement dans les sets de NILs issus de schémas d'introgression simultanée de trois QTL. Dans ces schémas, les effectifs de plante testées à chaque génération (91) n'ont en effet pas permis d'exercer un taux de sélection fort en dehors des zones à QTL. Les zones présentant des résidus de génome « donneur » ne sont pas localisées dans les régions de QTL de résistance non ciblés pour les introgressions, sauf au QTL *Ae-Ps7.6* dans certaines NILs du set 11. Dans ce set de NIL 11, la NIL11-2.2a ne présente pas de résidu « donneur », alors que la NIL sœur NIL11-2.2b présente un résidu « hétérozygote » au QTL *Ae-Ps7.6*, néanmoins, les deux NILs sœurs ont présenté des effets significatifs au champ à Riec-sur-Belon en 2015. De plus, la RIL BAP8.195, possède l'allèle « Baccara » à ce QTL *Ae-Ps7.6*, dont l'effet n'a pas été validé, seul l'effet des allèles « PI180693, 552 et 90-2131 » a été validé au champ ou en conditions contrôlées.

Dans la littérature, peu d'études ont caractérisé finement le génome de NILs produites pour valider l'effet de QTL ou analyser leurs mécanismes sous-jacents (Ando et al. 2008; Badis et al. 2015; Ding et al. 2011; Navara and Smith 2014; Schmalenbach et al. 2008). Pourtant, dans un couple de NILs dont les génomes ne diffèrent théoriquement que par un QTL, les phénotypes sont censés être directement attribués au QTL. La qualité du processus de BAM pour la construction des NILs est donc primordiale afin d'obtenir des lignées épurées du fonds génétique « donneur » en dehors du QTL introgressé. L'utilisation de lignées HIF (Heterogeneous Inbred Families) est également une autre méthode d'obtention de NILs, qui a été plus largement utilisée chez les espèces modèles et de grande culture (Chung et al. 2011; Djebali et al. 2009; Gravot et al. 2011; Lemarié et al. 2015; Liu et al. 2011; Loudet et al. 2005). Elle présente l'avantage de permettre l'obtention, en une génération d'autofécondation, de lignées ne différant que par la région cible, si celles-ci dérivent effectivement d'une RIL ne présentant pas de résidus d'hétérozygotie dans d'autres zones que celle ciblée. Les NILs

dérivées de lignées HIF présentent néanmoins un fonds génétique hétérogène, hérité des deux parents de la lignée HIF utilisée.

EFFETS INDIVIDUELS DES QTL DANS DIFFERENTS ENVIRONNEMENTS

Les données de phénotypage des NILs obtenues sur parties racinaires dans quatre environnements au champ (deux lieux en France, deux années) ont permis de valider, dans plusieurs fonds « receveurs » et/ou environnements, l'effet individuel (i) de l'un des deux QTL à effets majeurs décrits précédemment, le QTL *Ae-Ps7.6* et (ii) de deux nouveaux QTL à effets non validés en conditions contrôlée, les QTL *Ae-Ps1.2* et *Ae-Ps4.1*. Les résultats ont également permis de confirmer l'effet individuel des QTL *Ae-Ps2.2* et *Ae-Ps5.1*, précédemment observés dans les NILs en conditions contrôlées, plus spécifiquement dans quelques fonds « receveurs » et environnements.

Le QTL *Ae-Ps7.6* qui a été détecté en conditions contrôlées avec un fort effet sur la résistance au niveau racinaire, a aussi été détecté au champ avec cependant une tendance de spécificité selon l'allèle introgressé. L'effet de l'allèle 90-2131, a été plus détecté significativement à partir des données de Riec-sur-Belon alors que celui de l'allèle PI180693 a été significativement mis en évidence dans les deux lieux, pour les deux années d'expérimentation. L'effet de l'allèle 552 au QTL *Ae-Ps7.6* n'as pas été significatif pour réduire la sévérité de la maladie sur racines, alors qu'il avait été relevé en conditions contrôlées. Ces observations au champ sont en accord avec les données précédentes de détection de QTL (Hamon et al. 2011), qui avait qualifié l'effet du QTL *Ae-Ps7.6* de généraliste sur les différents sols et années d'expérimentation. Néanmoins, l'effet de l'allèle 90-2131 sur la résistance au niveau racinaire [variable RRI dans, Hamon et al. (2013)], détecté dans trois environnements, avait été plus élevé à Riec-sur-Belon ($R^2=25.6\%$) ; celui de l'allèle PI180693, observé dans cinq environnements, a été le plus élevé à Dijon ($R^2=13.7\%$). Par ailleurs, on peut noter que l'effet du QTL *Ae-Ps7.6* a été plus consistant dans les fonds « receveurs » de printemps que dans les fonds hiver, à l'inverse des observations réalisées en conditions contrôlées par Lavaud et al. (2015).

Le QTL *Ae-Ps4.5*, dont l'effet majeur avait été détecté en conditions contrôlées par Lavaud et al. (2015) avec la souche Ae109 (représentative de pathotype III - USA), a présenté un effet significatif à Dijon en 2014. Ce constat n'était pas attendu car aucune souche du pathotype III n'a été identifiée en France à ce jour. Onfroy et al. (2015, soumis) ont caractérisé le pouvoir pathogène de 10 souches isolées de pois sur les parcelles infestées de Dijon et ont montré qu'elles appartenaient toutes au pathotype I. Les auteurs ont effectué la même observation sur

des souches isolées dans les pépinières de Riec-sur-Belon et de Pullman (WA, USA). Pilet-Nayel et al. (2002) ont détecté ce QTL à partir de notations réalisées à Pullman sur la population de RIL Puget x 90-2079, suggérant que le QTL n'est pas spécifique du pathotype III.

Les allèles de résistance PI180693 aux QTL *Ae-Ps1.2* et *Ae-Ps4.1* ont montré des effets significatifs dans les deux lieux d'expérimentation, alors que ceux-ci n'avaient pas été identifiés précédemment en conditions contrôlées. Hamon et al. (2011) n'ont également détecté ces QTL qu'à partir de données de notations racinaires et aériennes au champ dans la population de RILs « Baccara x PI180693 ». A l'inverse, l'effet significatif du QTL *Ae-Ps5.1* n'a été détecté que dans un environnement (Riec-sur-Belon) alors qu'il avait été identifié en conditions contrôlées dans le fonds DSP. Hamon et al. (2013) ont également identifiés le QTL *Ae-Ps5.1*, mais essentiellement dans la population de RILs « DSP x 90-2131 » à partir de notations en conditions contrôlées et avec plusieurs souches des deux pathotypes. L'hypothèse de l'expression du QTL *Ae-Ps5.1* à un stade précoce de développement de la plante (2 semaines en conditions contrôlées) et de celle des QTL *Ae-Ps1.2* et *Ae-Ps4.1* à un stade plus avancé (6-8 semaines au champ) peut être suggérée. Wang et al. (2010) ont déterminé trois QTL, dans le cas du pathosystème rouille brune/orge, l'un agissant au stade plantule, un autre uniquement à partir du stade tallage et le troisième à tous les stades de développement de la plante.

L'effet du QTL *Ae-Ps3.1* a été difficile à confirmer ou infirmer dans les NILs, du fait des introgressions perdues à ce QTL dans différents sets de NILs, sauf dans le set de NILs 13 qui a montré un effet de l'allèle PI180693 au QTL dans un environnement.

L'analyse des données de jaunissement et de nanisme sur parties aériennes pourra ainsi confirmer ou non l'effet des QTL observé sur le compartiment racinaire et leur spécificité ou non vis-à-vis de stades, d'organes et d'environnements. Afin de mieux caractériser les environnements, une analyse plus précise de la diversité (pouvoir pathogène, génétique) d'*A. euteiches* et des complexes d'agents pathogènes dans les pépinières infestées devraient contribuer à une meilleure compréhension de la stabilité de l'expression des QTL dans les différents environnements.

COMBINAISON DE QTL LIMITANT LA SEVERITE DE LA POURRITURE SUR RACINES

Un total de quatre combinaisons d'allèles de résistance à deux ou trois QTL a été validé dans plusieurs environnements et/ou fonds « receveurs ». Ces combinaisons sont : (i) QTL *Ae-*

Ps7.6 + Ae-Ps5.1 (allèles 90-2131), (ii) QTL *Ae-Ps7.6 + Ae-Ps4.1* (allèles PI180693), (iii) QTL *Ae-Ps7.6 + Ae-Ps2.2 ± Ae-Ps3.1* (allèles 552), et (iv) QTL *Ae-Ps1.2 + Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1* (allèles PI180693). Les trois premières ont été identifiées précédemment en conditions contrôlées (Lavaud et al. 2015). La combinaison des deux allèles 90-2131 aux QTL *Ae-Ps5.1* et *Ae-Ps7.6* a présenté un effet significatif plus important à Riec-sur-Belon quelle que soit l'année d'expérimentation ou le fonds génétique. Celle des allèles PI180693 aux QTL *Ae-Ps4.1* et *Ae-Ps7.6*, a présenté un effet moins spécifique d'un lieu ou d'une année. La combinaison des allèles 552 aux QTL *Ae-Ps7.6*, *Ae-Ps2.2* et *Ae-Ps3.1* a montré un effet significatif spécifique de Dijon dans les trois fonds « receveurs », malgré l'absence de l'introggression au QTL *Ae-Ps3.1* dans les fonds Isard et Eden. La combinaison des allèles PI180693 à deux ou trois des QTL (*Ae-Ps1.2*, *Ae-Ps2.2* et/ou *Ae-Ps3.1*) non identifiée précédemment, a présenté un effet significatif dans plusieurs environnements et dans le seul fonds « receveurs » Eden portant effectivement les introgressions. Les effets individuels de ces trois QTL ont tous été identifiés significativement dans au moins l'un des trois fonds receveurs et des quatre environnements. Néanmoins, Hamon et al. (2013) ont identifié des allèles de tardiveté associés aux allèles de résistance aux QTL *Ae-Ps2.2* et *Ae-Ps3.1* dans la lignée PI180693. L'effet de la tardiveté sur la résistance apporté par ces allèles sera à approfondir à partir des notations de jaunissement et nanisme sur parties aériennes.

L'ensemble de ces résultats montrent que le cumul de QTL à effets fort et faibles, ainsi que celui de différents QTL à effets faibles s'exprimant à différents stades de développement de la plante, peuvent constituer des stratégies d'intérêt pour limiter la sévérité de la pourriture sur racines. Ces résultats montrent également que les stratégies de choix des QTL peuvent être orientées par la région de culture du génotype à développer. Ainsi, pour un effet du cumul de QTL souhaité dans des régions aussi variées que les deux sites étudiés dans cette étude (Riec-sur-Belon et Dijon), les combinaisons des QTL (*Ae-Ps7.6* et *Ae-Ps4.1*) et/ou (*Ae-Ps1.2*, *Ae-Ps2.2* et *Ae-Ps3.1*) pourrait être pertinentes. Néanmoins, l'association d'allèles de morphologie/développement défavorables à la résistance sera à valider et si possible à rompre, avant d'exploiter ces combinaisons en sélection.

L'ensemble de cette étude a permis d'identifier des combinaisons de QTL à effets validés au champ pour limiter la maladie au niveau racinaire, dans des NILs caractérisées pour leurs introgressions et leur génome en dehors des QTL. La validation de ces effets sur la maladie sera nécessaire au niveau du compartiment aérien et dans des environnements élargis, pour confirmer un choix de QTL pertinents et une stratégie de cumul de QTL en sélection.

CHAPITRE IV

*Mode d'action des QTL de
résistance sur les étapes du cycle
d'*Aphanomyces euteiches* en
conditions contrôlées*

CHAPITRE IV : MODE D'ACTION DES QTL DE RESISTANCE SUR LES ETAPES DU CYCLE D'*APHANOMYCES EUTEICHES* EN CONDITIONS CONTROLEES.

1. INTRODUCTION DU CHAPITRE

Les résultats présentés dans le chapitre II, ont indiqué que deux QTL (*Ae-Ps4.5* et *Ae-Ps7.6*) présentaient des effets majeurs sur la résistance et deux autres QTL (*Ae-Ps2.2*, *Ae-Ps5.1*) étaient associés à des effets mineurs. Le chapitre III a montré que les effets des QTL identifiés vis-à-vis du pathotype I d'*A. euteiches*, présent en France, avaient été confirmés au champ.

Dans ce chapitre de thèse, nous avons étudié les modes d'action des QTL de résistance sur certaines étapes du cycle d'*A. euteiches* en conditions contrôlées, à partir d'une sélection de NILs créées précédemment. Deux étapes ont principalement été observées dans ce chapitre, incluant l'infection et la colonisation des racines. Les NILs ont été évaluées dans un test pathologique destructeur couplé à l'usage de la Q-PCR, mis au point pour permettre d'observer la cinétique de progression des symptômes et de l'agent pathogène dans les racines. Une comparaison des effets des QTL individuels et de combinaisons de QTL a été effectuée, afin d'évaluer l'effet du cumul de QTL à modes d'action différents ou similaires sur le niveau de résistance.

Les résultats, obtenus dans ce chapitre, ont permis de démontrer que des QTL individuels pouvaient agir sur l'une ou les deux étapes du cycle étudiées et que la combinaison de QTL agissant individuellement sur des étapes similaires pouvait augmenter le niveau de résistance partielle.

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article soumis le 21 Décembre 2015 dans la revue *BMC Plant Biology*.

2. ARTICLE ASSOCIE

SINGLE AND MULTIPLE RESISTANCE QTL REDUCE *APHANOMYCES EUTEICHES* INFECTION AND COLONIZATION IN ROOTS OF PEA NEAR ISOGENIC LINES

C. Lavaud^(1,2), M. Baviere⁽¹⁾, G. Le Roy^(1,2), M. R. Hervé⁽¹⁾, A. Moussart^(2,3), R. Delourme⁽¹⁾, M-L. Pilet-Nayel^(1,2*)

¹ INRA, UMR IGEPP 1349, Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, Domaine de la Motte au Vicomte, BP 35327, 35653 Le Rheu cedex, France

² PISOM, UMT INRA/Terres Inovia, UMR IGEPP 1349, Domaine de la Motte au Vicomte, BP 35327, 35653 Le Rheu cedex, France

³ Terres Inovia, 11 rue de Monceau, CS 60003, 75378 Paris cedex 08, France

* Corresponding author: marie-laure.pilet@rennes.inra.fr

Email addresses:

CL: clement.lavaud@rennes.inra.fr

MB: morganebaviere@gmail.com

GLR: Gwenola.Leroy@rennes.inra.fr

MH: mx.herve@gmail.com

AM: Anne.Moussard@rennes.inra.fr

RD: regine.delourme@rennes.inra.fr

MLPN: marie-laure.pilet@rennes.inra.fr

Keywords: (3 à 10 mots)

Pisum sativum, Root rot, Near Isogenic Lines (NILs), Quantitative Trait Loci (QTL), partial resistance, infection, root colonization speed, Q-PCR.

ABSTRACT

Background

Understanding the effects of resistance QTL on pathogen life history traits or cycle steps is an important issue for the development of QTL combination strategies to durably increase disease resistance in plants. The oomycete pathogen *Aphanomyces euteiches*, causing root rot disease, is one of the major factors limiting the pea crop in the main producing countries. No resistant varieties are currently available. Resistance alleles at seven main QTL were recently identified and introgressed into pea agronomic lines, resulting in the creation of Near Isogenic Lines (NILs) at the QTL. This study aimed to determine the effect of main *A. euteiches* resistance QTL in NILs on different steps of the pathogen life cycle.

Results

NILs carrying resistance alleles at zero, one, two or three QTL in susceptible genetic backgrounds were evaluated in a destructive test under controlled conditions. The evolution of root rot disease severity and pathogen DNA levels in the roots was measured during ten days after inoculation. Significant effects of several resistance alleles at the two major QTL *Ae-Ps7.6* and *Ae-Ps4.5* were observed on the *A. euteiches* infection and colonization in the roots. Some resistance alleles at three other minor-effect QTL (*Ae-Ps2.2*, *Ae-Ps3.1* and *Ae-Ps5.1*) significantly decreased root colonization. The combination of resistance alleles at two or three QTL including the major QTL *Ae-Ps7.6* (*Ae-Ps5.1/Ae-Ps7.6* or *Ae-Ps2.2/Ae-Ps3.1/Ae-Ps7.6*) had an increased effect on slowing down root infection and/or colonization by *A. euteiches* and on plant resistance levels, compared to the effects of individual or no resistance alleles.

Conclusions

This study demonstrated the effects of single or multiple resistance QTL on reducing *A. euteiches* infection and/or colonization in pea roots, using original plant material and a precise pathogen quantification method. Our findings suggest that single resistance QTL can act on multiple or specific steps of the pathogen life cycle and that their actions could be pyramided to increase partial resistance in future pea varieties. Further studies are needed to investigate QTL effects on other steps of the pathogen life cycle, as well as the efficiency and durability of pyramiding strategies using QTL which appear to act on the same stage of the pathogen cycle.

BACKGROUND

Genetic resistance is a major approach for sustainable plant disease management. Although polygenic partial resistance is considered more durable than monogenic complete resistance, little is known about the mechanisms involved in this type of resistance [1, 2]. Only a few studies identified genes underlying resistance quantitative trait loci (QTL) [2-4]. These studies suggested that a large diversity of gene functions is involved in polygenic plant resistance [5]. This diversity in resistance QTL mechanisms suggests that resistance QTL target various steps in the pathogen life cycle, and, indeed, partial resistance has been reported to act on different stages of pathogen development. Pyramiding of resistance QTL targeting different steps in the pathogen life cycle would have a better chance of blocking disease development and should increase resistance levels. It may also make it more difficult for pathogens to adapt and thus be a way to improve the potential for resistance durability [6-8]. Few studies have identified the pathogen life history traits or life cycle steps that resistance QTL target, which is all the more complicated since QTL are difficult to mendelize and individually attribute to a phenotype. The approaches used in previous studies included QTL detection in bi-parental populations for plant resistance at specific steps of the pathogen life cycle and evaluation of Near-Isogenic Lines (NILs) differing from each other for resistance QTL introgressed into susceptible genetic backgrounds [9, 10]. Using NILs, two QTL were shown to act specifically on different stages of *Setosphaeria turcica* infection (leaf penetration and colonization) in maize [7]. In contrast, in the *Puccinia striiformis*/barley interaction, three QTL were reported to act individually on several components of resistance (latent period, infection efficiency, lesion size and pustule density; [11]).

Aphanomyces root rot, caused by the soilborne oomycete *Aphanomyces euteiches* Drechs. [12], is a major limitation of pea, cultivated for its protein content and ability to fix atmospheric nitrogen. The disease causes translucent lesions on the rootlets, which evolve into brown rot affecting the entire root system and epicotyl [13]. Above ground, the disease causes yellow leaves and even death. Two main *A. euteiches* pathotypes have been reported in pea [14]. Pathotype I is dominant in Europe and was observed in the United States. Pathotype III is specific to some locations in the United States [15]. The primary inoculum consists of oospores that can persist for up to 10 years in the soil [16]. Epidemics spread primarily from the rapid dispersal of bi-flagellate mobile zoospores released by germinated oospores in the soil. When host root or root exudates are detected, zoospores germinate and penetrate into the roots. The roots are then colonized by mycelium which differentiates into haploid antheridia

and oogonia. After sexual reproduction, new diploid oospores are produced. Long-distance dissemination of oospores is mediated by transportation of contaminated soil or materials, or infected plants. In pea plots, crop losses can reach 100% in disease favorable conditions [17]. Currently the only method of disease management is a soil inoculum potential test to avoid highly infested fields [18].

The generation of *A. euteiches* resistant pea varieties is thus a key factor in integrated strategies for root rot management. However, pea sources of resistance are scarce [19], polygenically inherited and provide only partial resistance levels [20, 21]. Recombinant inbred lines (RILs) populations, obtained from four partially resistant lines, were used for the detection of resistance QTL [22-25]. Meta-QTL analysis identified 23 genomic regions associated with pea resistance to *A. euteiches*, including seven main resistance QTL among which two were major-effect QTL [20]. These QTL were detected consistently across various environments (years, localizations), *A. euteiches* strains and for different scoring criteria. Each of the seven QTL was detected in at least two RIL populations, suggesting a common genetic basis between partial resistance sources. A Marker-Assisted Backcrossing (MAB) program was then conducted to obtain NILs carrying resistance alleles at zero, one, two or three of the seven QTL in several pea lines [26]. Evaluation of the NILs for resistance to *A. euteiches* in controlled conditions allowed major-effect and some minor-effect QTL to be validated, based on a routinely used disease severity test [13, 26, 27]. However, no knowledge is available about the effect of the main resistance QTL on the *A. euteiches* life cycle, which could be used to support recommendations in QTL pyramiding strategies to durably increase partial resistance. Kraft and Boge [28] reported that partial resistance to *A. euteiches* in pea breeding lines and germplasm was associated with reduced oospore production, pathogen multiplication, zoospore germination and slower lesion development. The genetic components of partial resistance targeting these pathogen life cycle steps were not identified. Precise *A. euteiches* quantification methods were developed for finer evaluation of pea resistance during pathogen development, including enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA; [28, 29]), specific fatty acids analysis [30] or, more recently, *A. euteiches* DNA quantification using quantitative PCR (Q-PCR; [31, 32]). Due to its high sensitivity, specificity and reproducibility, Q-PCR is an ideal method for detecting minor changes in host resistance [33] and commonly used for resistance evaluation in different pathosystems [1, 7].

The aim of this study was to identify the effect of the main resistance QTL, individually or in combination, on two major steps of the *A. euteiches* life cycle, including infection and root

colonization. A selection of previously developed NILs [26], carrying individual or selected combinations of resistance QTL, were evaluated over time in destructive kinetic assays. The root rot disease severity and quantity of *A. euteiches* DNA in the plant were assessed in inoculated plants under controlled conditions. The effects of each QTL in limiting *A. euteiches* development were attributed to one or two of the steps in its life cycle. Effects of combined compared to individual QTL were analyzed and used to determine whether pyramided QTL with similar or different individual effects could enhance partial resistance levels.

METHODS

PLANT AND PATHOGEN MATERIAL

Among the 157 NILs described by Lavaud et al. [26], a total of 23 NILs was used in this study, each carrying resistance allele at zero, one, two or three of the seven main *A. euteiches* resistance QTL in the susceptible reference genetic backgrounds used for QTL detection (Table 1). The lines included were: i) Three NILs carrying no resistance alleles, *i.e.* with similar genomes to the recipient lines, as susceptible controls. ii) Twelve NILs, each carrying a resistance allele at one QTL, for testing individual QTL effects. The twelve NILs represented all the introgressions targeted in the previous MAB scheme. iii) Eight NILs carrying resistance alleles at two or three QTL for testing effects of selected QTL combinations, depending on individual QTL results. Based on genotyping data, each NIL with zero or one QTL was chosen among sister NILs [26] as that with a better return to the recipient genome outside the QTL and a smaller heterozygosity level (data not shown). All available sister NILs with the chosen combinations of two or three QTL were kept in this study.

Five parental lines of NILs and/or RILs previously used for QTL detection were included as partial resistance controls in the experiments [26] (Table 1). Resistance conferred by the NIL parental lines RIL 831.08, RIL 847.50, as well as RIL BAP8.70 and RIL BAP8.195, was derived from the breeding or germplasm lines 90-2079, 90-2131 and PI180693, respectively, used as parents of the RIL populations previously studied [20]. Pathogen material included the *A. euteiches* strains RB84 and Ae109, belonging to pea pathotypes I and III, respectively. The two strains were both previously used for NILs resistance evaluation in Lavaud et al. [26].

Table 1: Description of the NILs and controls used.

NILs carrying resistance alleles at zero, one, two or three of the seven *A. euteiches* resistance QTL in pea [26].

NIL ^a	Donor line ^b	Recipient line ^c	Generation	Introgressed QTL ^d	Experiment
0-QTL					
NIL1-0b	RIL831.08	Puget	BC ₅ F ₃	-	2
NIL4-0b	RIL847.50	DSP	BC ₅ F ₃	-	1,3
NIL7-0b	RIL BAP8.70	Baccara	BC ₅ F ₃	-	1,4
Single-QTL					
NIL1-4.5b	RIL831.08	Puget	BC ₅ F ₃	<i>Ae-Ps4.5</i>	2
NIL4-5.1a	RIL847.50	DSP	BC ₅ F ₃	<i>Ae-Ps5.1</i>	3
NIL4-5.1b	RIL847.50	DSP	BC ₅ F ₃	<i>Ae-Ps5.1</i>	1
NIL4-7.6a	RIL847.50	DSP	BC ₅ F ₃	<i>Ae-Ps7.6</i>	1,3
NIL7-4.1a	RIL BAP8.70	Baccara	BC ₅ F ₃	<i>Ae-Ps4.1</i>	1
NIL7-7.6a	RIL BAP8.70	Baccara	BC ₅ F ₃	<i>Ae-Ps7.6</i>	1
NIL10-1.2a	RIL BAP8.195	Baccara	BC ₅ F _{3/4}	<i>Ae-Ps1.2</i>	1
NIL10-2.2c	RIL BAP8.195	Baccara	BC ₅ F ₃	<i>Ae-Ps2.2</i>	1
NIL10-3.1b	RIL BAP8.195	Baccara	BC ₅ F ₃	<i>Ae-Ps3.1</i>	1
NIL13-2.2a	552	Baccara	BC ₆ F ₄	<i>Ae-Ps2.2</i>	1,4
NIL13-3.1a	552	Baccara	BC ₆ F _{3/4}	<i>Ae-Ps3.1</i>	1,4
NIL13-7.6b	552	Baccara	BC ₆ F ₄	<i>Ae-Ps7.6</i>	1,4
QTL combination					
NIL4-5.1/7.6a	RIL847.50	DSP	BC ₅ F ₃	<i>Ae-Ps5.1</i> + <i>Ae-Ps7.6</i>	3
NIL4-5.1/7.6b	RIL847.50	DSP	BC ₅ F _{3/4}	<i>Ae-Ps5.1</i> + <i>Ae-Ps7.6</i>	3
NIL13-2.2/7.6a	552	Baccara	BC ₆ F ₃	<i>Ae-Ps2.2</i> + <i>Ae-Ps7.6</i>	4
NIL13-2.2/7.6b	552	Baccara	BC ₆ F ₃	<i>Ae-Ps2.2</i> + <i>Ae-Ps7.6</i>	4
NIL13-3.1/7.6a	552	Baccara	BC ₆ F ₄	<i>Ae-Ps3.1</i> + <i>Ae-Ps7.6</i>	4
NIL13-3.1/7.6b	552	Baccara	BC ₆ F ₄	<i>Ae-Ps3.1</i> + <i>Ae-Ps7.6</i>	4
NIL13-2.2/3.1/7.6a	552	Baccara	BC ₆ F ₃	<i>Ae-Ps2.2</i> + <i>Ae-Ps3.1</i> + <i>Ae-Ps7.6</i>	4
NIL13-2.2/3.1/7.6b	552	Baccara	BC ₆ F ₄	<i>Ae-Ps2.2</i> + <i>Ae-Ps3.1</i> + <i>Ae-Ps7.6</i>	4
Control lines					
90-2131	-	-	-	-	1,3
PI180693	-	-	-	-	1
552	-	-	-	-	1,4
RIL831.08	-	-	-	-	2
RIL847.50	-	-	-	-	3

^a NILs are coded as follow: NIL“NIL set number”-“0 for zero QTL or QTL number(s)” “sister NIL letter (a or b)” [26]. ^b Lines used as donors of resistance alleles at one to three QTL in the Marker-Assisted Backcrossing (MAB) scheme [26]. ^c Susceptible parents of the RIL populations in which the QTL were detected, used as reference recipient parents in the MAB scheme [20]. ^d QTL introgressed from the donor lines in the MAB scheme [26].

DISEASE EXPERIMENTS UNDER CONTROLLED CONDITIONS

Two experiments were performed under controlled conditions to study the effects of individual QTL on resistance to each of the two strains, respectively. Experiment #1 included two and ten NILs carrying zero and one resistance QTL, respectively, as well as three resistant controls (Table 1) and was inoculated with the RB84 strain. Experiment #2 included the NIL pair with or without the major-effect resistance allele to pathotype III at QTL *Ae-Ps4.5* [26] as well as the resistant control RIL 831.08 (Table 1), and was inoculated with the Ae109 strain. Two other experiments were conducted to evaluate the effects of a selection of QTL combinations on resistance to the RB84 strain. Experiment #3 and #4 included two NILs carrying two resistance QTL from the DSP x RIL 847.50 cross and six NILs carrying two or three resistance QTL from the Baccara x 552 cross, respectively. Both experiments also included the corresponding zero and single QTL NILs and resistance allele donors, as controls (Table 1).

In each experiment, all the lines were evaluated in a randomized complete block design with four blocks and five plants per line per block. The plants were harvested at each of the seven time points studied after inoculation in a destructive test. Each experiment was repeated twice. Disease resistance tests were carried out in a growth chamber on seven-day old seedlings grown in vermiculite and inoculated with a 200 zoospores per ml inoculum of pure culture strain, as described in Lavaud et al. [26]. The tests were performed at 20°C for 16 h of day and 18°C for 8 h of night. The Disease Severity (DS) was scored on each seedling at two, three, four, five, six, seven and ten days after inoculation, on the different plants of each line at each scoring day, using a 0 (no symptoms) to 5 (dead plant) scoring scale as in Lavaud et al. [26]. After scoring, all the vermiculite was removed from plant roots. Two tissue samples from bulked five plant roots from two blocks were retained for DNA extraction and *A. euteiches* DNA quantification. At each scoring day, roots were harvested by cutting at the seed level. Roots from five plants were then pooled per pot in 50 ml Sarstedt conical tubes containing 5 ml of 3 mm glass beads for grinding later and placed at -80°C for at least 24 h. Roots were then lyophilized (3 days, -24°C) and ground (9 min). Ten mg of powdered roots was placed in each well of a 96-well plate. Each plate also included two empty wells as negative controls. DNA was extracted with an automated DNA extraction robot oKtopure[®] (LGC Genomics, Germany) and DNA concentrations were normalized at 20 ng/μl.

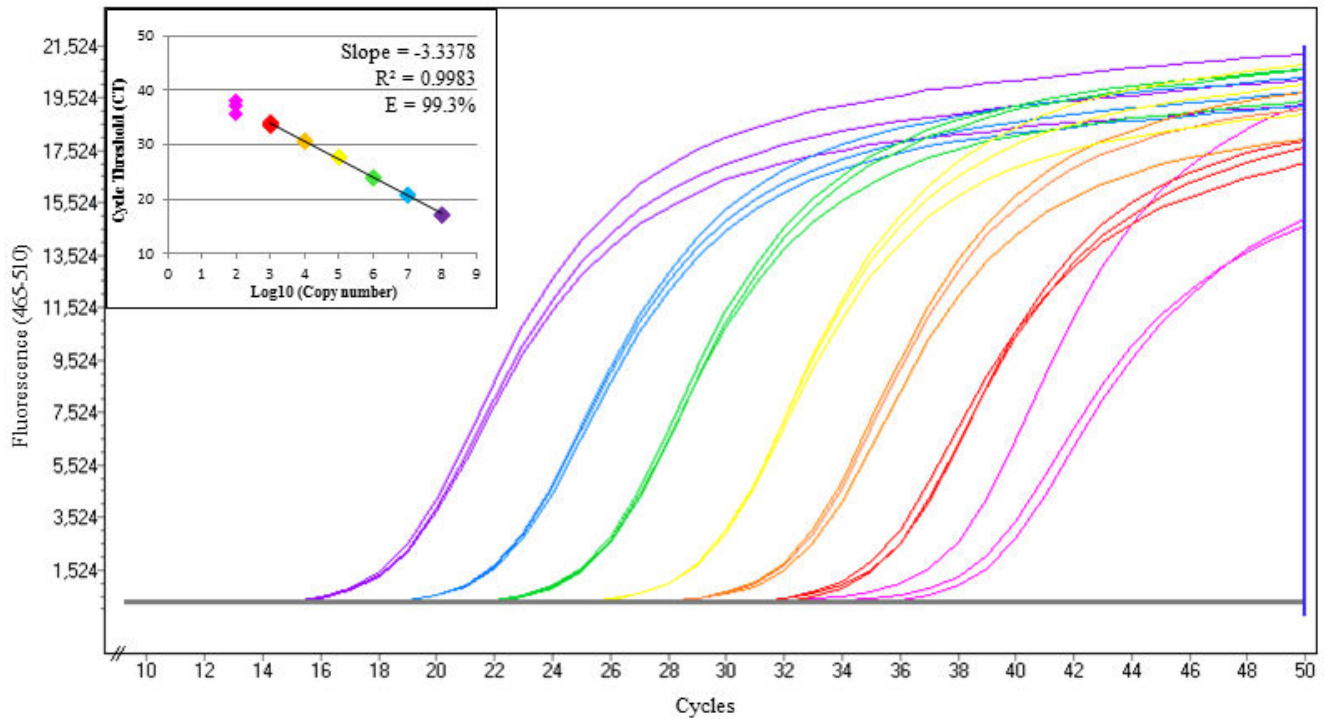


Figure 1: Standard curve and associated linear regression equation for one example Q-PCR reaction.

The curve was constructed using known quantities (10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 and 10^8 copies) of the 76-bp fragment of *A. euteiches* RB84 strain purified DNA [31]. Three replicated polymerase chain reactions were performed for each quantity.

QUANTITATIVE PCR (Q-PCR) FOR *A. EUTEICHES* DNA QUANTIFICATION

Q-PCR reactions were performed using the primer/probe set 136F-161T-211R amplifying a 76-bp fragment specific to *A. euteiches*, developed by Vandemark et al. [32]. Primers were synthesized by Sigma Life Science (USA). The probe was labeled with 6-FAM (6-carboxyfluorescein) at its 5' -terminus and with MGB-NFQ (Minor Groove Binder - Non Fluorescent Quencher) at its 3' -terminus (Applied Biosystems®, USA). Optimal primer/probe concentrations and amplification cycling conditions were determined in optimization tests. For each DNA sample, triplicate reactions were run in 20µl reactions containing 40ng of DNA, 400nM primer 136F, 400nM primer 211R, 200nM probe 161T, 2µl of ddH₂O and 10µl of 2X TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems®, USA). Amplification and detection of fluorescence were carried out on a LightCycler® 480 Instrument II real-time PCR system (Roche Life Science, Germany). PCR reactions consisted of a cycle at 95°C for 10 min, followed by 50 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 45 s. Each analysis also included three control reactions, in which DNA was substituted for ddH₂O. The amount of *A. euteiches* DNA was estimated using a calibration scale (10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ and 10⁸ copies of the 76-bp fragment of *A. euteiches* RB84 strain purified DNA; 3 replicates). Q-PCR data were analyzed with LightCycler® 480 software 1.5 (Roche Life Science, Germany) using the same parameters for all reactions. For each Q-PCR reaction, the threshold cycle number (CT), which corresponds to the PCR cycle number at which the fluorescence signal exceeds the detection threshold, was plotted against each of the log₁₀ for the 76-bp fragment copy number (Figure 1). The reaction efficiency (E) was calculated as follow: $E=(10^{(-1/b)})-1$ with *b* corresponding to the slope of the linear regression equation of standard curves (Figure 1). Samples with CT standard deviation values between replicates exceeding 0.5 were removed from the analysis.

DATA ANALYSIS

Statistical analyses were performed using R software version 3.1.2 [34].

For each experiment and scoring day, correlations between replicate or block data, were assessed on genotype means of DS scores and DNA quantification values, using Pearson coefficients ($\alpha=5\%$). Correlations between different experimental data were also estimated from genotype mean values over all the blocks in the two replicates, based on common lines. Statistical analysis of DS scores and DNA quantification data was performed for each experiment and scoring day. Analysis was also performed for three variables derived from DS and DNA amount values, including (i) the infection probability corresponding to the

Table 2: Disease Severity lsmeans scores in single-QTL NIL experiments.

Experiment (Strain)	Cross ^a	Genotype	QTL ^b	Day after inoculation ^c						
				2 ^d	3 ^d	4	5	6	7	10
1 (RB84)	DSP * RIL847.50	NIL4-0b	-	NA	NA	2,0	-1,6	-2,3	-4,1	-3,3
		NIL4-5.1b	<i>Ae-Ps5.1</i>	NA	NA	3,9*	-0,5	-1,0	-3,7	-2,4
		NIL4-7.6a	<i>Ae-Ps7.6</i>	NA	NA	4,1*	1,7***	0,4***	-0,8***	-0,6***
		90-2131	-	NA	NA	3,1	-1,3	-1,1	-4,2	-2,9
	Baccara * RIL BAP8.70	NIL7-0b	-	NA	NA	2,6	-2,5	-3,7	-1,0	-1,9
		NIL7-4.1a	<i>Ae-Ps4.1</i>	NA	NA	2,0	-2,6	-3,7	-0,7	-2,2
		NIL7-7.6a	<i>Ae-Ps7.6</i>	NA	NA	4,0	1,6***	-0,1***	1,4**	0,2**
		PI180693	-	NA	NA	4,5	1,4***	0,9***	3,0***	2,3***
	Baccara * RIL BAP8.195	NIL7-0b	-	NA	NA	0,8	-2,4	-3,2	-1,0	-2,3
		NIL10-1.2a	<i>Ae-Ps1.2</i>	NA	NA	1,3	-1,4	-2,8	-1,6	-3,2
		NIL10-2.2c	<i>Ae-Ps2.2</i>	NA	NA	0,7	-2,6	-2,5	-0,5	-1,9
		NIL10-3.1b	<i>Ae-Ps3.1</i>	NA	NA	1,1	-2,4	-3,0	-0,8	-2,3
		PI180693	-	NA	NA	2,6	1,3***	0,7***	2,8***	2,5***
		NIL7-0b	-	NA	NA	0,8	-1,9	-3,9	-1,7	-2,9
	Baccara * 552	NIL13-2.2a	<i>Ae-Ps2.2</i>	NA	NA	0,5	-1,2	-2,7	-1,9	-3,4
		NIL13-3.1a	<i>Ae-Ps3.1</i>	NA	NA	2,6	-1,1	-2,8	-1,1	-1,9
		NIL13-7.6b	<i>Ae-Ps7.6</i>	NA	NA	1,9	0,1*	-0,3***	-0,3	-2,2
		552	-	NA	NA	2,6	1,2***	0,4***	0,6**	0,0**
		NIL1-0b	-	NA	NA	1,6	1,6	-0,9	-2,2	-2,7
2 (Ae109)	Puget * RIL831.08	NIL1-4.5b	<i>Ae-Ps4.5</i>	NA	NA	3,6	2,5	2,1***	1,4***	1,2***
		RIL831.08	-	NA	NA	3,7	4,8***	2,6***	1,6	1,6***

^a "Recipient x donor" cross lines from which each NIL was produced in the previous MAB scheme [26]. ^b QTL introgressed in each NIL from the previous MAB scheme [26]. ^c LSMeans disease severity (DS) scores between the single-QTL NILs or the resistant control, and the control-NIL without QTL, obtained on each genotype and scoring day from the CLMM analysis of each NIL set in experiments #1 and #2. Significant differences between LSMeans values are indicated by * (0.01 < P < 0.05), ** (0.001 < P < 0.01) and *** (P < 0.001). LSmeans scores were obtained from the DS score probabilities for each genotype and scoring day represented in Additional File 1. ^d At two and three days after inoculation, LSMeans DS scores could not be estimated from CLMM since some lines did not have symptoms.

percentage of plants with symptoms at each scoring day, (ii) the root colonization speed, corresponding to the slope of the curve of the changing amount of DNA from the scoring day at which more than 10,000 copies of pathogen DNA were detected and (iii) the area under the curve progression of the disease (AUDPC), calculated from the DNA quantification values of the pathogen, according to the formula proposed by Shaner and Finney [35]. The pea line values for these three variables were calculated in each block and experiment.

DS scores, as ordinal qualitative data, were analyzed using a cumulative linked mixed model [CLMM; 'clmm' function, 'ordinal' package [36, 37]]. DNA quantification values, root colonization speed and AUDPC, as quantitative data, were analyzed using a linear mixed model [LMM; 'lmer' function, 'lme4' package [38]]. Probability of infection values were analyzed using a Generalized Linear Mixed Model (GLMM; 'glmer' function, 'lme4' package [38]).

For each model, we considered the genotype as fixed factor, the blocks of the two replicates and/or the pot as random factors. A Likelihood Ratio test (LR) ($\alpha=5\%$) and a Wald test ($\alpha=5\%$) were applied for evaluating the genotypic effect in the CLMM model and in the GLMM or LMM model, respectively.

Least Square Means (LSMeans) were estimated for all the variables on each genotype, using the 'lsmeans' function of the 'lsmeans' package [39]. For the DS variable, LSMeans were calculated on the scale of the latent variable implied by the CLMM, for each genotype and day [40, 41]. For each variable, multiple comparisons of LSMeans between genotypes of each NIL set were performed with the Tukey test ($\alpha=5\%$), using the 'cld' function of the 'lsmeans' package.

RESULTS

EFFECT OF SINGLE RESISTANCE QTL ON *A. EUTEICHES* DEVELOPMENT

Disease severity scores

DS scores for all the lines were significantly correlated between the two replicates at each scoring date in experiments #1 and #2 ($r>0.82$, $P<0.05$ and $r>0.90$ $P<0.05$, respectively), except for one replicate on the fourth day in experiment #2, which was removed from the analysis.

A total of five NILs carrying single QTL showed significant differences in LSMeans scores compared to their control NIL without the QTL, for at least one scoring day (Table 2, Additional file 1A). In experiment #1, the level of partial resistance to the RB84 strain

Table 3: *A. euteiches* DNA amounts in roots in single-QTL NIL experiments.All data are presented in thousands (10³).

Experiment (Strain)	Cross ^a	Genotype	QTL ^b	Day after inoculation ^c												
				2	3	4	5	6	7	10						
1 (RB84)	DSP * RIL847.50	NIL4-0b	-	NA	3,0 ±0,5	44,9 ±4,3		201,8 ±21,7	387,0 ±35,0	576,8 ±46,8	1110,8 ±69,2					
		NIL4-5.1b	<i>Ae-Ps5.1</i>	NA	2,5 ±0,5	11,2 ±4,3	***	117,8 ±21,7	***	325,4 ±33,5	*	425,7 ±45,7	***	839,4 ±69,2	***	
		NIL4-7.6a	<i>Ae-Ps7.6</i>	NA	2,0 ±0,5	15,5 ±4,3	***	81,6 ±22,6	***	155,4 ±35,0	***	351,9 ±45,3	***	699,5 ±70,6	***	
		90-2131	-	NA	5,3 ±0,4	31,6 ±4,3	*	162,0 ±21,7	*	297,7 ±34,8	**	348,5 ±45,3	***	858,8 ±69,2	**	
	Baccara * RIL BAP8.70	NIL7-0b	-	NA	5,3 ±0,3	43,9 ±4,0		294,9 ±16,6		523,2 ±17,1		679,7 ±29,1		1721,5 ±80,9		
		NIL7-4.1a	<i>Ae-Ps4.1</i>	NA	6,0 ±0,3	67,4 ±4,0		260,0 ±16,6		421,9 ±17,1	**	650,2 ±29,1		1478,2 ±80,9		
		NIL7-7.6a	<i>Ae-Ps7.6</i>	NA	1,6 ±0,6	***	17,0 ±4,0	***	58,8 ±16,6	***	251,0 ±17,1	***	437,4 ±26,1	***	882,4 ±80,9	***
		PI180693	-	NA	2,0 ±0,5	***	17,3 ±4,0	***	53,7 ±16,6	***	81,6 ±26,4	***	167,5 ±26,1	***	401,7 ±80,9	***
	Baccara * RIL BAP8.195	NIL7-0b	-	NA	5,3 ±0,8	43,9 ±12,3		294,9 ±22,5		523,2 ±23,8		652,1 ±73,9		1721,5 ±127,2		
		NIL10-1.2a	<i>Ae-Ps1.2</i>	NA	4,4 ±0,8	43,3 ±12,3		180,9 ±22,5	***	362,0 ±23,8	***	827,9 ±67,0		1450,7 ±127,2		
		NIL10-2.2c	<i>Ae-Ps2.2</i>	NA	3,3 ±0,9	*	48,1 ±12,3		229,4 ±22,5	**	407,7 ±23,8	**	527,7 ±73,9		1360,2 ±127,2	*
		NIL10-3.1b	<i>Ae-Ps3.1</i>	NA	5,6 ±0,8	47,8 ±12,3		177,5 ±22,5	***	377,2 ±27,6	***	652,5 ±73,9		1478,4 ±127,2		
		PI180693	-	NA	0,9 ±1,0	***	17,3 ±12,3	***	53,7 ±22,5	***	88,1 ±33,8	***	167,5 ±67,0	***	401,7 ±127,2	***
	Baccara * 552	NIL7-0b	-	NA	5,3 ±0,6	43,9 ±7,0		294,9 ±19,6		523,2 ±21,4		694,8 ±36,6		1721,5 ±116,2		
		NIL13-2.2a	<i>Ae-Ps2.2</i>	NA	6,0 ±0,6	77,5 ±7,0		186,8 ±21,5	***	344,9 ±21,4	***	549,2 ±32,9	**	1117,6 ±143,0	**	
		NIL13-3.1a	<i>Ae-Ps3.1</i>	NA	5,1 ±0,6	43,7 ±7,0		168,4 ±19,6	***	247,7 ±21,4	***	451,5 ±32,9	***	991,5 ±116,2	***	
		NIL13-7.6b	<i>Ae-Ps7.6</i>	NA	1,7 ±0,6	***	19,9 ±7,0	*	76,9 ±19,6	***	178,9 ±29,7	***	341,5 ±38,1	***	681,7 ±116,2	***
		552	-	NA	NA	4,2 ±8,3	***	14,0 ±19,6	***	82,8 ±21,4	***	177,0 ±32,9	***	428,6 ±116,2	***	
2 (Ae109)	Puget * RIL831 .08	NIL1-0b	-	NA	2,6 ±0,4	32,6 ±7,7		91,8 ±26,3		293,5 ±7,9		535,0 ±35,0		1349,9 ±158,7		
		NIL1-4.5b	<i>Ae-Ps4.5</i>	NA	NA	NA		NA		7,3 ±7,6	***	27,8 ±35,0	***	88,2 ±158,7	***	
		RIL831.08	-	NA	NA	NA		30,6 ±27,1	**	26,4 ±9,1	***	92,1 ±39,6	***	304,5 ±166,6	***	

^a “Recipient x donor” cross lines from which each NIL was produced in the previous MAB scheme [26]. ^b QTL introgressed in each NIL from the previous MAB scheme [26]. ^c Pathogen DNA amount obtained on each genotype and scoring day, from the LMM analysis of each NILs set in experiments #1 and #2. In each set of lines, significant differences of LSMeans DNA amount between the single-QTL NILs or the resistant control, and the control- NIL without QTL are indicated by * (0.01<P<0.05), ** (0.001<P<0.01) and *** (P<0.001). NA: Not Available data due to copy number <10³.

increased significantly ($P < 0.001$) in all the NILs carrying the single QTL *AePs7.6* from the different donors (NIL4-7.6a, NIL7-7.6a and NIL13-7.6b), compared to their corresponding control NILs without the QTL (NIL4-0b or NIL7-0b). NIL4-5.1b, carrying the single QTL *Ae-Ps5.1*, showed a significantly smaller effect only at the fourth day after inoculation ($P < 0.05$). In experiment #2, significantly lower ($P < 0.001$) DS scores were obtained for the NILs carrying the major QTL *Ae-Ps4.5* (NIL1-4.5b) compared to the control NIL, from the sixth to tenth day, for the Ae109 strain (Table 2, Additional file 1A). Higher levels of partial resistance in the resistant donor lines were confirmed to be significant between five and ten days after inoculation in each NIL set compared to each susceptible control NIL ($P < 0.001$), except for 90-2131 (Table 2).

Quantification of A. euteiches DNA

The efficiency of the Q-PCR reactions ranged from 93.6% to 100.1% for the 16 plates (*e.g.* in Figure 1; $E = 99.3\%$ for plate 12). These results are in agreement with Schena et al. [42] who recommended efficiencies as close as possible to 100%. Two days after inoculation, DNA amount values could not be considered for all the lines due to the small amount of pathogen DNA in the roots and the limit of detection for less than 1,000 DNA copies. Similarly, the amount of DNA could not be quantified for 552, RIL 831.08 and NIL1-4.5b before four, five and six days after inoculation, respectively (Table 3). Six percent of the block data for DNA quantity was removed from the analysis because of CT standard deviations exceeding 0.5 between technical triplicates for more than two plants per block. The amount of pathogen DNA in all the lines correlated significantly between the two biological replicates at each scoring date in experiments #1 and #2 ($r > 0.95$, $P < 0.05$ and $r > 0.73$ $P < 0.06$, respectively), except at the fourth day in experiments #1 and #2, for which one replicate was removed from the analysis.

All the NILs carrying single QTL showed a significant decrease in pathogen DNA in the roots at the sixth day after inoculation ($P < 0.05$), compared to the NIL controls without QTL (Table 3). In experiment #1, all the NILs carrying resistance alleles at the single major QTL *AePs7.6*, regardless of the resistance donor of origin (NIL4-7.6a, NIL7-7.6a and NIL13-7.6b), had the highest and most consistently significant effects over five or six scoring days ($P < 0.05$). The NIL carrying the 90-2131 resistance allele at *Ae-Ps5.1*, had a smaller but still significant effect on the amount of pathogen DNA over five time points ($P < 0.05$). NILs with resistance alleles from 552 at *AePs2.2* and *AePs3.1* significantly reduced ($P < 0.01$) the amount of *A. euteiches* DNA over four days. The four remaining NILs (NIL7-4.1b, NIL10-1.2a, NIL10-

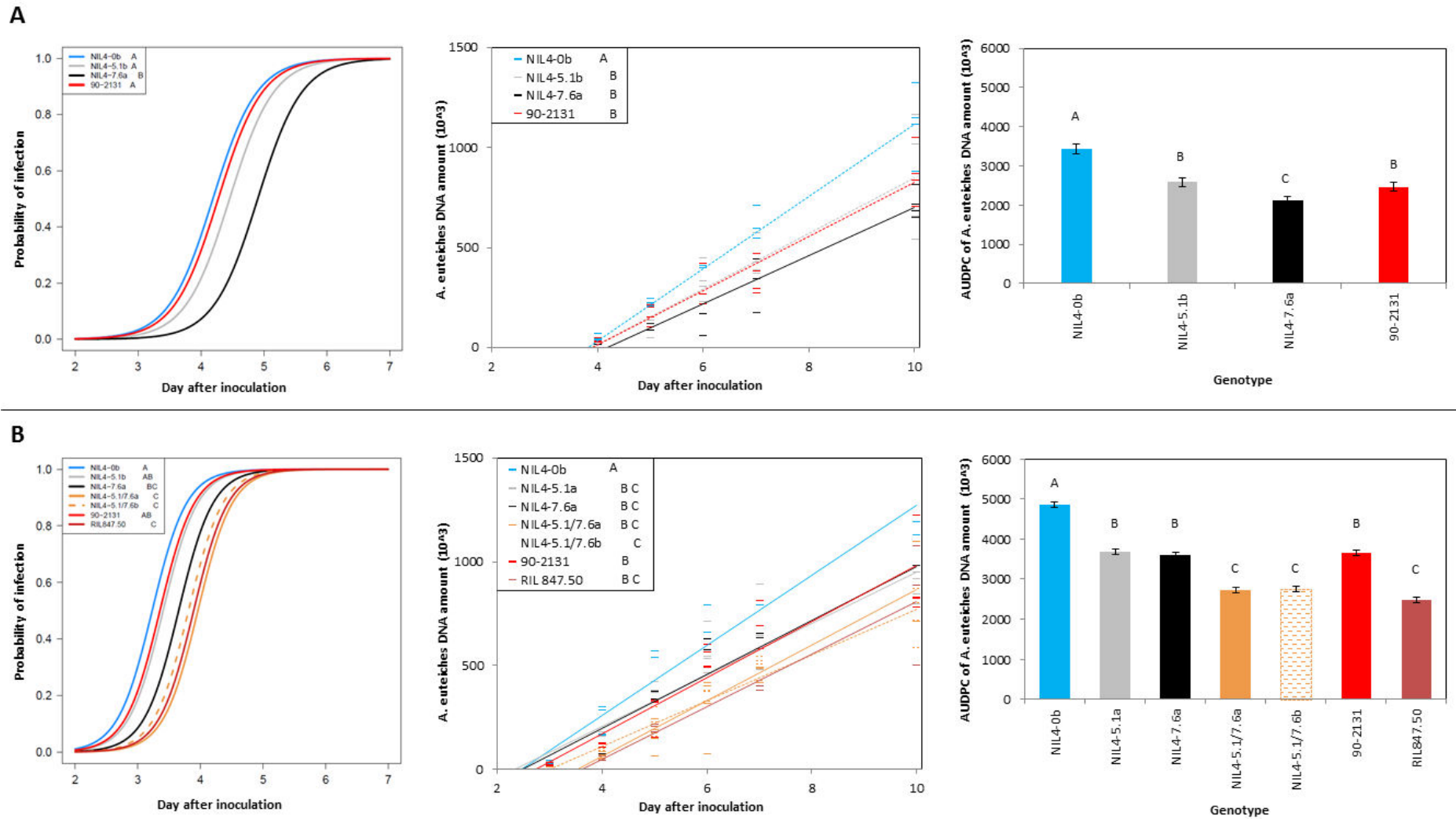


Figure 2: Effects of NILs carrying single or combined resistance QTL *Ae-Ps5.1* and *Ae-Ps7.6* on variables of the *A. euteiches* life cycle.

A/ Single QTL NIL experiment #1; **B/** Combined and single QTL NIL experiment #3. The first graph represents the evolution of the probability of infection for seven days after inoculation, for each line. It corresponds to the percentage of plants with symptoms per block for each scoring day. The second graph shows for each line the root colonization speed, corresponding to the slope of the curve of pathogen DNA amounts per block, until 10 days after inoculation, from 10^4 DNA copies detected. In the third graph the AUDPC was calculated from the pathogen DNA quantification data over the ten days after inoculation. Bars represent standard errors. Attribution of each line to LSMeans group(s) is indicated by letter(s), according to the Tukey test ($P < 0.05$). Blue and red lines indicate the NIL without QTL and the donor or resistant control lines, respectively.

2.2c and NIL10-3.1b) had smaller and/or less consistently significant effects at one to four scoring days ($P < 0.05$). In experiment #2, the NIL carrying the major resistance QTL *Ae-Ps4.5* (NIL1-4.5b) had a very small quantity of *A. euteiches* in its roots until ten days after inoculation, which was significantly different from the high DNA quantity observed in the NIL control free of the QTL ($P < 0.001$) (Table 3).

Pathogen life cycle variables

The probability that *A. euteiches* could infect the NILs was calculated from DS scores data over time, to estimate the effects of resistance QTL in the early stages of root infection (pathogen penetration into the roots and development until symptoms appeared). The infection probability curves obtained for each set of NILs in both experiments (Figure 2A, Additional file 2) showed that symptoms appeared significantly later for NILs carrying the major resistance QTL *Ae-Ps7.6* (NIL4-7.6a, NIL7-7.6a) or *Ae-Ps4.5* (NIL1-4.5b) than for their corresponding NILs without QTL. The same effect was observed for the donor lines PI180693, 552 and RIL 831.08 compared to the susceptible control NILs.

Two traits were used to measure NIL root colonization by *A. euteiches*: colonization speed and the quantity of pathogen having colonized the roots. The two traits were estimated from the slope and the AUDPC of the pathogen DNA progression curve over ten days after inoculation, respectively. In the two experiments, curves for all the NILs, except three ones (NIL7-4.1a, NIL10-1.2a and NIL10-3.1b), and the four donor lines (90-2131, PI180693, 552 and RIL 831.08), had significantly lower slopes and AUDPC values than control NILs (Figure 2A and Additional file 2). In particular, the four NILs carrying the single major QTL *Ae-Ps7.6* or *Ae-Ps4.5* had the lowest AUDPC values among all the NILs. Significantly more gentle slopes were observed for NILs with significantly lower DNA levels at more than two scoring days, compared to susceptible control NILs.

Overall, two NIL sets (n°4 and n°13) carrying combinations of QTL which all showed significant individual effects on the infection and/or colonization (speed and quantity), were selected for studying multiple QTL effects. In these two NIL sets, combinations of resistance alleles from 90-2131 at *Ae-Ps5.1* and *Ae-Ps7.6*, and from 552 at *Ae-Ps2.2*, *Ae-Ps3.1* and *Ae-Ps7.6*, were tested with the RB84 strain in experiments #3 and #4.

EFFECTS OF MULTIPLE RESISTANCE QTL ON *A. EUTEICHES* DEVELOPMENT

Symptoms developed faster in experiments #3 and #4 than in experiment #1, mainly due to temperature variation between experiments in the growth chamber. A more rapid disease

Table 4: Disease severity lsmeans scores and A. euteiches DNA amounts in roots, in multiple-QTL NIL experiments.

A/ NIL set from the DSP x RIL 847-50 cross, including lines carrying single or combined QTL Ae-Ps5.1 and Ae-Ps7.6; **B/** NIL set from the Baccara x 552 cross, including lines carrying single or combined QTL Ae-Ps2.2, Ae-Ps3.1 and Ae-Ps7.6. All data for A. euteiches DNA quantities are presented in thousands (10^3).

Genotype	Symptom scoring ^a							A. euteiches DNA amount ^c						
	Day after inoculation							Day after inoculation						
	2 ^b	3 ^b	4	5	6	7	10	2	3	4	5	6	7	10
A NIL4-0b	NA	NA	-1,6	-2,9	-1,2	-4,6	-5,0	NA	23,8 ± 2,5	226,5 ± 14,1	522,6 ± 23,8	696,1 ± 36,8	817,6 ± 41,7	1142,9 ± 59,4
NIL4-5.1a	NA	NA	-0,7	-1,5	-0,1	-2,4 ***	-4,6	NA	18,1 ± 2,5	131,8 ± 14,1 ***	368 ± 21,3 ***	558,4 ± 33,8 **	668,1 ± 35,1 *	871,7 ± 59,4 ***
NIL4-7.6a	NA	NA	0,5 *	0,0 ***	1,0 **	-1,5 ***	-3,8	NA	11,9 ± 3,1 **	98,1 ± 17,2 ***	339,3 ± 28,1 ***	561,8 ± 42 *	633,1 ± 41,7 *	855,8 ± 71,8 ***
NIL4-5.1/7.6a	NA	NA	1,9 ***	0,9 ***	3,5 ***	0,5 ***	-0,1 ***	NA	7 ± 2,5 ***	73,8 ± 15,2 ***	155,7 ± 21,3 ***	297,9 ± 33,8 ***	477,9 ± 31,5 ***	826,2 ± 59,4 ***
NIL4-5.1/7.6b	NA	NA	1,2 ***	0,8 ***	3,4 ***	1,3 ***	-1,4 **	NA	9,1 ± 2,5 ***	71,1 ± 14,1 ***	210,6 ± 21,3 ***	363,3 ± 36,7 ***	495,1 ± 31,5 ***	739,1 ± 59,4 ***
90-2131	NA	NA	-0,3	-1,7	-0,8	-3,3	-4,3	NA	15,3 ± 2,5 *	101,5 ± 14,1 ***	279,4 ± 21,3 ***	533,8 ± 33,8 ***	675,2 ± 35,4	911 ± 59,4 ***
RIL847.50	NA	NA	1,2 ***	1,0 ***	2,5 ***	-0,2 ***	-2,0 *	NA	7,6 ± 2,5 ***	45,4 ± 14,1 ***	170,1 ± 21,3 ***	NA	380 ± 35,4 ***	758,3 ± 59,4 ***
B NIL7-0b	NA	NA	0,6	2,0	2,8	5,0	2,7	1,3 ± 0,3	6,9 ± 0,9	70,5 ± 7,9	295,3 ± 38,3	634,7 ± 52,9	806,1 ± 56,1	1948 ± 156,1
NIL13-2.2a	NA	NA	-0,9	0,9	2,3	4,5	2,0	1,6 ± 0,2	12,3 ± 0,9	86,7 ± 7,7	309 ± 36	798,5 ± 50,3	970,4 ± 64,3	2095,5 ± 156,1
NIL13-3.1a	NA	NA	-1,3 *	0,1 *	1,0	3,2	1,7	3,6 ± 0,6	6 ± 1,1	42,5 ± 7,7 *	270 ± 35,5	455,6 ± 43,8	761,6 ± 56,1	1384,5 ± 167,9
NIL13-7.6b	NA	NA	-2,0 ***	-0,4 ***	1,4	2,9 *	3,1	NA	3,3 ± 1,3 ***	28,9 ± 7,7 ***	239,1 ± 35,5	476,2 ± 53	709,9 ± 56,1	1544,2 ± 156,1
NIL13-2.2/7.6a	NA	NA	-1,2 **	0,6	1,4	3,1	3,0	NA	4,7 ± 0,9	55,8 ± 7,9	314,6 ± 35,5	566,9 ± 45,5	805,5 ± 64,3	1573,8 ± 156,1
NIL13-2.2/7.6b	NA	NA	-1,1	0,7	1,8	3,5	2,0	NA	6,8 ± 0,9	66,3 ± 7,9	346,7 ± 37,4	651,1 ± 43,8	901,2 ± 58,3	1416,7 ± 167,9
NIL13-3.1/7.6a	NA	NA	-1,8 ***	-0,8 ***	0,8	2,3 **	1,5	1,1 ± 0,7	3 ± 1 ***	35,7 ± 7,9 **	166,5 ± 36 **	431,1 ± 45,5 **	694,5 ± 56,1	1254,7 ± 156,1 **
NIL13-3.1/7.6b	NA	NA	-2,1 ***	-0,4 **	0,9	2,4 **	2,5	1,1 ± 0,6	3,4 ± 0,9	46,7 ± 7,9 *	259,3 ± 35,5	494 ± 43,8	680 ± 56,1	1522 ± 156,1
NIL13-2.2/3.1/7.6a	NA	NA	-2,0 ***	-0,8 ***	0,9	2,8 *	0,9	1,1 ± 0,7	3,1 ± 1,1 **	30,9 ± 7,7 ***	181,8 ± 36 *	428,4 ± 43,8 *	576,2 ± 64,3 *	1231 ± 156,1 **
NIL13-2.2/3.1/7.6b	NA	NA	-1,2 **	-0,1 *	0,6	3,0	2,9	NA	3,8 ± 0,9 **	42,3 ± 7,7 *	221,4 ± 36	403,7 ± 43,8 **	646,9 ± 64,3	1258,8 ± 161,6 *
552	NA	NA	-2,9 ***	-2,7 ***	-2,5 ***	-1,9 ***	0,3 *	NA	1,1 ± 1,5 ***	3,7 ± 8,5 ***	41,4 ± 35,5 ***	127,5 ± 43,8 ***	286,7 ± 56,1 ***	703,7 ± 156,1 ***

^a LSMeans disease severity (DS) scores between the single-QTL NILs or the resistant control, and the control-NIL without QTL, obtained on each genotype and scoring day from the CLMM analysis of each NIL set in experiments #3 and #4. Significant differences between LSMeans values are indicated by *(0.01<P<0.05), **(0.001<P<0.01) and *** (P<0.001). Lsmeans scores were obtained from the DS score probabilities for each genotype and scoring day represented in Additional File 1B. b At two and three days after inoculation, LSMeans DS scores could not be estimated from CLMM since some lines did not have symptoms. ^c Pathogen DNA amount obtained on each genotype and scoring day, from the LMM analysis of each NILs set in experiments #3 and #4. In each set of lines, significant differences of LSMeans DNA amount between the single-QTL NILs or the resistant control, and the control- NIL without QTL are indicated by * (0.01<P<0.05), ** (0.001<P<0.01) and *** (P<0.001). NA: Not Available data due to copy number <103. In bold, significant differences of LSMeans DS scores or DNA amounts between the multiple-QTL NILs and the single-QTL NIL NIL4-7.6a for experiment #3 or NIL13-7.6b for experiment #4 (P<0.05).

initiation and less discrimination between genotypes was thus observed, especially in experiment #4. However, based on common genotypes, DS scores and *A. euteiches* DNA quantification data were highly correlated between experiments #3 and #1 ($r>0.98$, $P<0.001$) as well as #4 and #1 ($r>0.84$, $P<0.001$). In both experiments #3 and #4, DS scores and pathogen DNA data were highly correlated between the two replicates at each scoring date ($r>0.95$ $P<0.05$), except at the fourth day in experiments #3 and #4 for DS scores as well as at the tenth day in experiment #3 and the seventh day in experiment #4 for the amount of pathogen DNA, for which data from one replicate were removed from the analysis. In addition, pathogen DNA data from one and the two replicates were removed from the analysis for NIL4-7.6a at all days and RIL 847.50 at the 6th day, respectively, due to incoherence in data between replicates or days.

In experiment #3, the significant effects of the two single QTL NILs and the RIL 847.50 parental line were confirmed for both DS scores and Q-PCR data, at a later scoring day than in experiment #1 for the NIL with QTL *Ae-Ps5.1* (Table 4A, Additional file 1B). The effect of single QTL to decrease the infection probability (*Ae-Ps7.6*) and root colonization (*Ae-Ps7.6* and *Ae-Ps5.1*) was also confirmed. DS scores and the amount of *A. euteiches* DNA for the two sister NIL carrying both *Ae-Ps5.1* and *Ae-Ps7.6*, and for the RIL 847.50 resistant parental line, were highly significantly different ($P<0.001$) from the control NIL at all the scoring days (Table 4A). These lines were even significantly different from NILs carrying the single QTL *Ae-Ps7.6* at several scoring days (Table 4A). The three lines also had significantly increased effects for reducing the early infection probability and the AUDPC compared to the single and/or free QTL NILs and for slowing down root colonization speed compared to the control NIL without QTL (Figure 2B).

In experiment #4, the significant effect ($P<0.001$) of the single QTL NIL carrying QTL *Ae-Ps7.6* was confirmed at earlier scoring days than in experiment #1 for both DS scores and DNA amount, compared to the control NIL without QTL (Table 4B, Additional file 1B and 2). The significant effect of the 552 resistant parental line was also confirmed for both variables at almost all scoring dates ($P<0.001$) and for the three pathogen life cycle variables, compared to both NILs with the single QTL *Ae-Ps7.6* and without QTL. However in contrast to experiment #1, (i) the single resistance QTL NIL with *Ae-Ps3.1* had a low but significant effect ($P<0.05$) on DS scores and pathogen DNA amount at only early time points; (ii) the NIL with resistance QTL *Ae-Ps2.2* had more DNA in its roots than the control NIL without QTL from the fifth scoring stage, and thus did not show any significant effect; (iii) the three

single QTL NILs did not show significant differences compared to the control NIL for root colonization speed and AUDPC and (iv) the NIL carrying QTL *Ae-Ps7.6* significantly reduced the infection probability. The two sister NILs carrying the two QTL *Ae-Ps2.2* and *Ae-Ps7.6* showed no effect on DS scores and *A. euteiches* DNA levels compared to the control NIL without QTL, except the NIL13-2.2/7.6a for DS scores at the fourth day after inoculation. The sister NILs carrying either the two QTL *Ae-Ps3.1* and *Ae-Ps7.6* or the three QTL *Ae-Ps2.2*, *Ae-Ps3.1* and *Ae-Ps7.6*, showed significant effects ($P < 0.05$) on DS scores and pathogen DNA levels at several time points, compared to the NIL without QTL but not compared to the single QTL NIL carrying *Ae-Ps7.6*. Consistently, these bi- or tri-QTL NILs had significantly delayed curves of infection probability compared to the control NIL without QTL. No bi- or tri-QTL NILs significantly decreased the root colonisation speed. Only the two tri-QTL NILs had lower AUDPC values than the NIL without QTL but not from the NILs carrying single QTL.

DISCUSSION

This study used NILs as original plant material and Q-PCR as a precise quantification method to study the effects of single and multiple resistance QTL on *A. euteiches* infection and colonization in pea roots. Our results demonstrated significant single effects of resistance alleles at two major QTL (*Ae-Ps7.6* and *Ae-Ps4.5*) on two steps of the pathogen life cycle and at several minor QTL (*Ae-Ps2.2*, *Ae-Ps3.1* and *Ae-Ps5.1*) on *A. euteiches* colonization speed and quantity. Selected combinations of two or three of the most significant single effect-QTL, including QTL *Ae-Ps7.6*, were subsequently tested. The NILs carrying QTL combinations showed significantly increased or similar effects on pathogen infection delay and colonization compared to single QTL NILs, depending on the experiment. Our findings validate previous QTL effects [26] and also point out the relevance of Q-PCR for accurately quantifying *A. euteiches* in pea roots at distinct stages of fungal pathogenesis.

DISEASE SEVERITY KINETICS AND *A. EUTEICHES* DNA QUANTIFICATION ALLOWED TWO OF THE COMPONENTS OF THE PATHOGEN LIFE CYCLE TO BE EVALUATED

In this study, we used a kinetic pathology test to measure *Aphanomyces* root rot development in young pea roots for ten days after inoculation. This test was destructive, as plants were uprooted at each scoring day to evaluate disease severity and to sample roots for pathogen DNA quantification. However, for each pea line, scores obtained for different plants at the different scoring days were assumed to be comparable since the NILs were self-pollinated for three or four generations (BC5/6F3/4) and individuals from each NIL were expected to have

identical genomes. Non-destructive methods have been reported for measuring *Aphanomyces* root rot development over time. Although pathogen DNA could not be quantified using these methods, they had the advantage that symptom evolution could be observed on the same plant. The “Rolled Towel assay” developed by Malvick et al. [43] used pre-germinated plants in paper towels placed at 20°C to measure the evolution of root rot symptoms on the same plants for 21 days. However, secondary disease infections developed in the towels with this method [44]. An *in vitro* test was also designed to evaluate the development of *Aphanomyces* root rot symptoms on *M. truncatula* roots at three, 15 and/or 21 days after inoculation [45, 46].

Quantitative-PCR is a development of the original PCR technique that allows accurate quantification of a target amplicon based on dye fluorescence included in the reaction. This assay has been commonly used as a rapid and efficient tool for the accurate and specific detection and quantification of pathogens in plants, such as *Sclerospora graminicola* [47] in pear millet, *Fusarium solani* in soybean [48] or *Thielaviopsis basicola* in cotton [49]. It was used by Vandemark et al. [32] to specifically quantify *A. euteiches* DNA, based on a 76 bp amplicon, and successfully applied for pathogen quantification in pea roots even if the quantity of pathogen DNA was not always correlated with disease severity.

In our study, two of the pathogen life cycle phases, infection and root colonization, were observed using kinetic pathology test and Q-PCR. Infection is one of the early steps in the pathogen life cycle. When non-destructive tests are used, it is usually measured by the latent or incubation periods, especially for aerial pathogens. Here, the date at which the first symptoms appeared on the roots, corresponding to the incubation period, was difficult to measure. We would have needed to increase the number of time points observed in the first days after inoculation to, for example, every six hours. We could have also slowed down disease development by reducing the test temperature to 15-18°C for example, to better discriminate between genotypes. Instead, we calculated a probability of infection based on DS symptoms detected in the roots at different time points, which allowed NILs carrying major effect-QTL to be significantly differentiated at the early steps of the interaction. The probability of infection was not estimated from pathogen DNA levels since Q-PCR did not reliably detect less than 1,000 copies of the amplified DNA fragment. Pathogen colonization of the plant roots could be accurately measured by quantifying pathogen DNA at the different time points, which was successful in discriminating the genotypes. In other root pathosystems,

such as barley/*Verticillium chlamydosporium*, the use of low temperature scanning electron microscopy (LTSEM) revealed details of the colonization process [50].

Other steps of the pathogen life cycle would have been important to evaluate but could not be observed in this study due to a lack of adapted methodologies. Sporulation, measurable as oospore number, is a key life history trait, essential for pathogen multiplication. Kraft and Boge [28] measured sporulation by counting oospores on a Hawksley nematode-counting slide, from samples previously macerated in a Sorval microblender. Kjølner and Rosendahl [51] used stained roots with trypan blue and a microscope to evaluate oospore quantity in the roots. In our study, we attempted to extract oospores from the roots at seven and ten days after inoculation, for all the NILs in two blocks of experiment #3 (data not shown). Roots from five plants per pot were ground in a blender containing enzymes [52], then after maceration overnight, the suspension was vacuum filtrated and finally the oospores were counted on a Malassez blade. The results showed a low efficiency of oospore extraction. However, a positive relationship was found between the number of oospores extracted and the quantity of pathogen DNA and DS scores. Thus further optimisation is required to improve the oospore extraction yield. Oospores viability, using a germination test, [53] or zoospores attraction to root exudates [28] are also key pathogen life history traits that would be interesting to measure.

SINGLE QTL CAN ACT ON ONE OR BOTH STEPS OF THE *A. EUTEICHES* LIFE CYCLE STUDIED

To our knowledge, this is the first report of the effect of single resistance QTL on the life cycle of a root pathogen using NILs. Previously QTL effects were only described on aerial pathogen development [7, 9, 54]. In our study, significant effects of single major QTL on disease severity were consistent with those reported previously for controlled conditions using the same NILs and strains [26]. Significantly smaller QTL effects were also revealed using *A. euteiches* DNA quantification by Q-PCR. (i) The major-effect QTL *Ae-Ps7.6* (with PI180693 and 90-2131 resistance alleles) and *Ae-Ps4.5* (with 90-2079 resistance allele) significantly delayed infection and reduced root colonization from the early stages even before symptoms appeared. The QTL *Ae-Ps7.6* (with 90-2131 resistance allele) also limited the number of oospores formed in the plant at the seventh and tenth scoring date, as a result of its effect on reducing root colonization (data not shown). The resistance allele originating from 552 at QTL *Ae-Ps7.6* only had a significant effect on root colonization. Effects of resistance alleles at the two major QTL observed in the NILs were mostly consistent with their level of

contribution to resistance as previously reported in RIL populations [20, 22]. (ii) The minor effect QTL *Ae-Ps2.2* (with PI180693 and 552 resistance alleles), *Ae-Ps3.1* (with 552 resistance allele) and *Ae-Ps5.1* (with 90-2131 resistance allele) significantly slowed down root colonization by *A. euteiches*, especially at later stages for QTL *Ae-Ps2.2* and *Ae-Ps3.1*. Resistance alleles from 552 at QTL *Ae-Ps2.2* and *Ae-Ps3.1*, as well as from 90-2131 at QTL *Ae-Ps5.1*, were previously detected with low effects for resistance to RB84 in RIL populations ($R^2=6.4-9.4\%$; [20, 22]). In our study, infection delay and colonization speed were expected to be independent, *i.e.* partial resistance could delay infection but not decrease colonization speed or inversely, as previously observed [55]. However, we did not observe any pea lines that had an impact on delaying infection without decreasing colonization. In some pathosystems, specific QTL with high effects on a single step of pathogen cycle, like the latency period [6, 9] or sporulation [10], were identified. However, several examples of individual QTL acting on several steps of pathogen life cycles [7, 8, 54, 56] have also been reported.

COMBINATIONS OF RESISTANCE QTL ACTING INDIVIDUALLY ON SIMILAR STEPS OF THE PATHOGEN LIFE CYCLE CAN INCREASE LEVELS OF PARTIAL RESISTANCE

Results from this study suggest that resistance QTL acting on similar steps of the pathogen life cycle could be pyramided to increase partial resistance efficiency. NILs carrying resistance alleles from 90-2131 at QTL *Ae-Ps5.1* and *Ae-Ps7.6*, both of which acted individually to limit *A. euteiches* root colonization, showed a significantly increased effect on limiting the pathogen levels in roots and the disease severity, compared to NILs carrying each single QTL, particularly the major QTL *Ae-Ps7.6*. Cumulative QTL effects on limiting colonization could also be observed for NILs carrying combinations of 552 resistance alleles at *Ae-Ps2.2*, *Ae-Ps3.1* and *Ae-Ps7.6*, but with a lower and non-significant level compared to single QTL effects. The resistant control lines, RIL 847.50 and 552, had significantly higher effects on reducing infection, colonization and disease severity compared to single QTL NILs. Similarly, a highly resistant pea line recently identified [21], AeD990SW45-8-7, was also evaluated and expressed much stronger effects than the multiple QTL NILs tested ($P<0.001$; data not shown). Desgroux et al. [21] showed that the three lines AeD990SW45-8-7, 552 and RIL 847-50, cumulated 12, nine and five of the best haplotypes, respectively, at 14 consistent *Aphanomyces* resistance loci detected by association genetics, including loci co-localizing with QTL *Ae-Ps1.2*, *Ae-Ps2.2*, *Ae-Ps3.1* and *Ae-Ps7.6* (Additional File 14 and Figure 2 in [21]). In our study, these four QTL all individually contributed to reduce the amount of pathogen DNA at one or more of the scoring dates. We thus hypothesize that pyramiding

resistance alleles at these four QTL, which appear to act especially by reducing *A. euteiches* root colonization, could lead to increased partial resistance levels.

However, this hypothesis does not exclude the possibility that the involvement of these QTL in other steps of the pathogen life cycle also contributes to increase resistance efficiency. Indeed, Kraft and Boge [28] showed that partial resistance to *A. euteiches* in the resistant germplasm PI180693 was associated with a slower development of symptoms and multiplication of the pathogen as revealed by ELISA. The authors also found reduced numbers of oospores and germinated zoospores in exudates from roots of PI180693. Thus, resistance QTL apparently acting on similar steps of the pathogen life cycle could be involved in different steps or molecular mechanisms controlling pathogenesis. Chung et al. [7] showed that a QTL controlling resistance to *Setosphaeria turcica* in maize enhanced the accumulation of callose and phenolics surrounding infection sites, reduced hyphal growth into the vascular bundle and impaired the subsequent necrotrophic colonization in the leaves.

CONCLUSION

This study used NILs and Q-PCR-based pathogen DNA quantification to demonstrate that previously identified individual and combined resistance QTL delay infection and reduce colonization of pea roots by *A. euteiches*. Further method development is required to investigate QTL effects on other steps of the pathogen life cycle, such as sporulation. Further work will also be necessary to validate whether the QTL effects observed on the pathogen life cycle under controlled conditions are also observed in infested fields. The durability of QTL combinations acting on similar steps of the pathogen life cycle will also have to be validated, as the pressure exerted by several QTL on a same pathogen life trait may induce the appearance and/or the selection of isolates developing alternative infectious strategies [57, 58].

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

CL coordinated and participated in the entire study as well as drafting the manuscript. MB generated the phenotypic and genotypic data, carried out all the statistical analysis and participated in drafting the manuscript. GLR conducted experiments to produce the phenotypic data. MH supported all the statistical analysis. AM developed the protocol for the kinetic pathological test. RD co-supervised CL PhD work and participated in revising the manuscript. MLPN supervised the NIL evaluation program, the PhD work of CL and the manuscript writing. All authors approved the final draft of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a pre-doctoral fellowship (Clément LAVAUD) from INRA, Département de Biologie et Amélioration des Plantes (France) and Brittany region (France). The PeaMUST project, which received funding from the French Government managed by the Research National Agency (ANR) under the Investments for the Future call 2011 (ANR-11-BTBR-0002), funded the experiments. We acknowledge ‘Estelle BILLARD’ for having initiated the development of the oospore extraction method in the roots, ‘Gildas LE BAIL’ and ‘Agnès GAREIL’ for having greatly supported technical aspects of data production. We thank the GENTYANE platform of Clermont-Ferrand, France, and more particularly ‘Anthony THERON’ for technical assistance on root DNA extractions. We thank Leigh Gebbie for having revised the English written style of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

ETHICAL STANDARDS

Authors declare that the described experiments comply with the French laws.

REFERENCES

1. Fukuoka S, Saka N, Mizukami Y, Koga H, Yamanouchi U, Yoshioka Y, Hayashi N, Ebana K, Mizobuchi R, Yano M: **Gene pyramiding enhances durable blast disease resistance in rice.** *Sci Rep* 2015, **5**(7773).
2. Poland JA, Balint-Kurti PJ, Wisser RJ, Pratt RC, Nelson RJ: **Shades of gray: the world of quantitative disease resistance.** *Trends in plant science* 2009, **14**(1):21-29.
3. Niks RE, Qi X, Marcel TC: **Quantitative Resistance to Biotrophic Filamentous Plant Pathogens: Concepts, Misconceptions, and Mechanisms.** *Annual review of phytopathology* 2015, **53**:445-470.
4. Cook DE, Lee TG, Guo XL, Melito S, Wang K, Bayless AM, Wang JP, Hughes TJ, Willis DK, Clemente TE *et al*: **Copy Number Variation of Multiple Genes at Rhg1 Mediates Nematode Resistance in Soybean.** *Science* 2012, **338**(6111):1206-1209.
5. Azzimonti G, Marcel TC, Robert O, Paillard S, Lannou C, Goyeau H: **Diversity, specificity and impacts on field epidemics of QTLs involved in components of quantitative resistance in the wheat leaf rust pathosystem.** *Molecular Breeding* 2014, **34**(2):549-567.
6. Wang LJ, Wang YJ, Wang Z, Marcel TC, Niks RE, Qi XQ: **The phenotypic expression of QTLs for partial resistance to barley leaf rust during plant development.** *Theor Appl Genet* 2010, **121**(5):857-864.
7. Chung CL, Longfellow JM, Walsh EK, Kerdieh Z, Van Esbroeck G, Balint-Kurti P, Nelson RJ: **Resistance loci affecting distinct stages of fungal pathogenesis: use of introgression lines for QTL mapping and characterization in the maize - *Setosphaeria turcica* pathosystem.** *BMC plant biology* 2010, **10**(103).
8. Talukder ZI, Tharreau D, Price AH: **Quantitative trait loci analysis suggests that partial resistance to rice blast is mostly determined by race-specific interactions.** *New Phytol* 2004, **162**(1):197-209.
9. Marcel TC, Gorguet B, Ta MT, Kohutova Z, Vels A, Niks RE: **Isolate specificity of quantitative trait loci for partial resistance of barley to *Puccinia hordei* confirmed in mapping populations and near-isogenic lines.** *New Phytol* 2008, **177**(3):743-755.

10. Calenge F, Faure A, Goerre M, Gebhardt C, Van de Weg WE, Parisi L, Durel CE: **Quantitative trait loci (QTL) analysis reveals both broad-spectrum and isolate-specific QTL for scab resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis*.** *Phytopathology* 2004, **94**(4):370-379.
11. Richardson KL, Vales MI, Kling JG, Mundt CC, Hayes PM: **Pyramiding and dissecting disease resistance QTL to barley stripe rust.** *Theor Appl Genet* 2006, **113**(3):485-495.
12. Jones FR, Drechsler C: **Root rot of peas in the United States caused by *Aphanomyces euteiches*.** *J Agric Res* 1925, **30**:293-325.
13. Moussart A, Even MN, Tivoli B: **Reaction of genotypes from several species of grain and forage legumes to infection with a French pea isolate of the oomycete *Aphanomyces euteiches*.** *Eur J Plant Pathol* 2008, **122**(3):321-333.
14. Wicker E, Rouxel F: **Specific behaviour of French *Aphanomyces euteiches* Drechs. Populations for virulence and aggressiveness on pea, related to isolates from Europe, America and New Zealand.** *Eur J Plant Pathol* 2001, **107**(9):919-929.
15. Onfroy C, Tivoli B, Grünwald NJ, Pilet-Nayel ML, Baranger A, Andrivon D, Moussart A: **Aggressiveness and virulence of *Aphanomyces euteiches* isolates recovered from pea nurseries in the United States and France.** *Plant Pathol* 2015, submitted.
16. Papavizas GC, Ayers WA: ***Aphanomyces* species and their root diseases in pea and sugarbeet. A review.** *US Dep Agric Tech Bull* 1974, **1485**:158.
17. Hughes TJ, Grau CR: ***Aphanomyces* root rot or common root rot of legumes.** *The Plant Health Instructor* 2007, DOI: [10.1094/PHI-I-2007-0418-01](https://doi.org/10.1094/PHI-I-2007-0418-01)
18. Moussart A, Lemarchand E, Tivoli B: **Description, validation and possible uses of a soil infectivity test for soils infested by *Aphanomyces euteiches*.** In: *8ème Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes; Tours, France*: Edited by AFPP. 5-6 Decembre 2006.
19. Pilet-Nayel ML, Coyne C, Hamon C, Lesne A, Le Goff I, Esnault R, Lecointe R, Roux-Duparque M, Mangin P, McPhee K *et al*: **Understanding genetics of partial resistance to *Aphanomyces* root rot in pea for new breeding prospects.** In: *International Workshop on *Aphanomyces* in Legumes: 07-09 November 2007; Rennes, France*: Edited by 3d P. 2007: 34-39.
20. Hamon C, Coyne CJ, McGee RJ, Lesne A, Esnault R, Mangin P, Herve M, Le Goff I, Deniot G, Roux-Duparque M *et al*: **QTL meta-analysis provides a comprehensive view of loci controlling partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in four sources of resistance in pea.** *BMC plant biology* 2013, **13**(45).
21. Desgroux A, L'Anthoëne V, Roux-Duparque M, Rivière JP, Aubert G, Tayeh N, Moussart A, Mangin P, Vetel P, Piriou C *et al*: **Genome-wide association mapping of partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in pea.** *BMC Genomics* 2015, accepted.
22. Hamon C, Baranger A, Coyne CJ, McGee RJ, Le Goff I, L'Anthoëne V, Esnault R, Riviere JP, Klein A, Mangin P *et al*: **New consistent QTL in pea associated with partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in multiple French and American environments.** *Theor Appl Genet* 2011, **123**(2):261-281.
23. Hamon C, Baranger A, Miteul H, Lecointe R, Le Goff I, Deniot G, Onfroy C, Moussart A, Prosperi JM, Tivoli B *et al*: **A complex genetic network involving a broad-spectrum locus and strain-specific loci controls resistance to different pathotypes of *Aphanomyces euteiches* in *Medicago truncatula*.** *Theor Appl Genet* 2010, **120**(5):955-970.
24. Pilet-Nayel ML, Muehlbauer FJ, McGee RJ, Kraft JM, Baranger A, Coyne CJ: **Quantitative trait loci for partial resistance to *Aphanomyces* root rot in pea.** *Theor Appl Genet* 2002, **106**(1):28-39.
25. Pilet-Nayel ML, Muehlbauer FJ, McGee RJ, Kraft JM, Baranger A, Coyne CJ: **Consistent quantitative trait loci in pea for partial resistance to *Aphanomyces euteiches* isolates from the United States and France.** *Phytopathology* 2005, **95**(11):1287-1293.

26. Lavaud C, Lesné A, Piriou C, Le Roy G, Boutet G, Moussart A, Poncet C, Delourme R, Baranger A, Pilet-Nayel ML: **Validation of QTL for resistance to *Aphanomyces euteiches* in different pea genetic backgrounds using near-isogenic lines.** *Theor Appl Genet* 2015, **128**:2273-2288.
27. Moussart A, Wicker E, Duparque M, Rouxel F: **Development of an efficient screening test for pea resistance to *Aphanomyces euteiches*.** In: *4th Eur Conf Grain Legumes; Cracow, Poland*: Edited by AEP. July 8-12th 2001.
28. Kraft JM, Boge WL: **Identification of characteristics associated with resistance to root rot caused by *Aphanomyces euteiches* in pea.** *Plant Dis* 1996, **80**(12):1383-1386.
29. Kraft JM, Boge WL: **Development of an antiserum to quantify aphanomyces-euteiches in resistant pea lines.** *Plant Dis* 1994, **78**(2):179-183.
30. Larsen J, Mansfeld-Giese K, Bodker L: **Quantification of *Aphanomyces euteiches* in pea roots using specific fatty acids.** *Mycological Research* 2000, **104**:858-864.
31. Vandemark G, Grunwald NJ: **Use of real-time PCR to examine the relationship between disease severity in pea and *Aphanomyces euteiches* DNA content in roots.** *European Journal of Plant Pathology* 2005, **111**(4):309-316.
32. Vandemark GJ, Barker BM, Gritsenko MA: **Quantifying *Aphanomyces euteiches* in alfalfa with a fluorescent polymerase chain reaction assay.** *Phytopathology* 2002, **92**(3):265-272.
33. Schena L, Nigro F, Ippolito A, Gallitelli D: **Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi.** *European Journal of Plant Pathology* 2004, **110**(9):893-908.
34. R Development Core Team: **R: A language and environment for statistical computing.** In. Vienna, Austria. Retrieved from <http://www.R-project.org>; R Foundation for Statistical Computing; 2014.
35. Shaner G, Finney RE: **Effect of nitrogen-fertilization on expression of slow-mildewing resistance in knox wheat.** *Phytopathology* 1977, **67**(8):1051-1056.
36. Christensen RHB: **ordinal---Regression Models for Ordinal Data.** In. <http://www.cran.r-project.org/package=ordinal>; R package version 2015.1-21; 2015.
37. Herve M: **RVAideMemoire: Diverse Basic Statistical and Graphical Functions.** In. <http://CRAN.R-project.org/package=RVAideMemoire>; R package version 0.9-45-2; 2015.
38. Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S: **lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4.** In. <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>; R package version 1.1-7; 2014.
39. Lenth RV, Herve M: **lsmeans: Least-Squares Means.** In. <http://CRAN.R-project.org/package=lsmeans>; R package version 2.18; 2015.
40. Agresti A: **An introduction to categorical data analysis**, vol. Second Edition. 372: Wiley; 2002.
41. McCullagh P: **Regression-models for ordinal data.** *J R Stat Soc Ser B-Methodol* 1980, **42**(2):109-142.
42. Schena L, Nicosia M, Sanzani SM, Faedda R, Ippolito A, Cacciola SO: **Development of quantitative pcr detection methods for phytopathogenic fungi and oomycetes.** *J Plant Pathol* 2013, **95**(1):7-24.
43. Malvick DK, Percich JA, Pflieger FL, Givens J, Williams JL: **Evaluation of methods for estimating inoculum potential of *aphanomyces-euteiches* in soil.** *Plant Dis* 1994, **78**(4):361-365.
44. Williams-Woodward JL, Pflieger FL, Allmaras RR, Fritz VA: ***Aphanomyces euteiches* inoculum potential: A rolled-towel bioassay suitable for fine-textured soils.** *Plant Dis* 1998, **82**(4):386-390.
45. Djebali N, Jauneau A, Ameline-Torregrosa C, Chardon F, Jaulneau V, Mathe C, Bottin A, Cazaux M, Pilet-Nayel ML, Baranger A *et al*: **Partial Resistance of *Medicago truncatula* to *Aphanomyces euteiches* Is Associated with Protection of the Root Stele and Is Controlled by a Major QTL Rich in Proteasome-Related Genes.** *Mol Plant-Microbe Interact* 2009, **22**(9):1043-1055.
46. Bonhomme M, Andre O, Badis Y, Ronfort J, Burgarella C, Chantret N, Prosperi JM, Briskine R, Mudge J, Debelle F *et al*: **High-density genome-wide association mapping implicates an F-**

- box encoding gene in *Medicago truncatula* resistance to *Aphanomyces euteiches*.** *New Phytol* 2014, **201**(4):1328-1342.
47. Babu BK, Sharma R: **TaqMan real-time PCR assay for the detection and quantification of *Sclerospora graminicola*, the causal agent of pearl millet downy mildew.** *European Journal of Plant Pathology* 2015, **142**(1):149-158.
 48. Li S, Hartman GL, Domier LL, Boykin D: **Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* isolates in soybean roots by colony-forming unit assays and real-time quantitative PCR.** *Theor Appl Genet* 2008, **117**(3):343-352.
 49. Schoina C, Stringlis IA, Pantelides IS, Tjamos SE, Paplomatas EJ: **Evaluation of application methods and biocontrol efficacy of *Paenibacillus alvei* strain K-165, against the cotton black root rot pathogen *Thielaviopsis basicola*.** *Biological Control* 2011, **58**(1):68-73.
 50. Lopez-Llorca LV, Bordallo JJ, Salinas J, Monfort E, Lopez-Serna ML: **Use of light and scanning electron microscopy to examine colonisation of barley rhizosphere by the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium*.** *Micron* 2002, **33**(1):61-67.
 51. Kjoller R, Rosendahl S: **Enzymatic activity of the mycelium compared with oospore development during infection of pea roots by *Aphanomyces euteiches*.** *Phytopathology* 1998, **88**(9):992-996.
 52. Hord MJ, Ristaino JB: **Effects of physical and chemical factors on the germination of oospores of *Phytophthora capsici* invitro.** *Phytopathology* 1991, **81**(12):1541-1546.
 53. Campbell AM, Duncan JM, Malcolmson JF: **Production of oospores invitro by self fertilization in single isolates of a1 mating types of *Phytophthora infestans*.** *Transactions of the British Mycological Society* 1985, **84**:533-535.
 54. Azzimonti G, Lannou C, Sache I, Goyeau H: **Components of quantitative resistance to leaf rust in wheat cultivars: diversity, variability and specificity.** *Plant Pathol* 2013, **62**(5):970-981.
 55. Pilet-Nayel ML, Hamon C, Moussart A, Roux-Duparque M, Onfroy C, Le May C, Tivoli B, Baranger A: **Diversité et stabilité des facteurs génétiques de résistance aux principales maladies fongiques du pois protéagineux.** In: *Innovations Agronomiques* vol. 35; 2014: 27-38.
 56. Jorge V, Dowkiw A, Faivre-Rampant P, Bastien C: **Genetic architecture of qualitative and quantitative *Melampsora larici-populina* leaf rust resistance in hybrid poplar: genetic mapping and QTL detection.** *New Phytol* 2005, **167**(1):113-127.
 57. Villareal L, Lannou C: **Selection for increased spore efficacy by host genetic background in a wheat powdery mildew population.** *Phytopathology* 2000, **90**(12):1300-1306.
 58. Pariaud B, Ravigne V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, Lannou C: **Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens.** *Plant Pathol* 2009, **58**(3):409-424.

CHAPITRE V

*Discussion Générale
et perspectives*

CHAPITRE V : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La compréhension des bases génétiques et des mécanismes des résistances partielles sous contrôle polygénique aux maladies chez les plantes, représentent un enjeu scientifique majeur pour mieux gérer à terme les locus de résistance de manière efficace et durable en amélioration des plantes. C'est particulièrement le cas pour le pathosystème *Aphanomyces euteiches*/Pois. L'amélioration génétique de la résistance partielle polygénique à *A. euteiches* est un objectif prioritaire dans les programmes de sélection du pois. En effet, l'utilisation de variétés présentant une résistance efficace, associée à des pratiques culturales limitant l'extension de l'agent pathogène, s'avère indispensable pour lutter contre la maladie et contribuer à re-développer la culture du pois en France mais aussi en Europe.

Dans ce double contexte scientifique et socio-économique, l'acquisition de connaissances plus approfondies dans le pathosystème pois/*A. euteiches* sur i) les effets des locus de résistance partielle polygénique (QTL) à *A. euteiches* dans différents fonds génétiques et environnements, ii) leurs modes d'actions vis-à-vis de différentes étapes du cycle infectieux ainsi que iii) les combinaisons de QTL qui permettent d'augmenter les niveaux de résistance partielle, représente un enjeu de recherche majeur.

Dans le cadre de ce travail de thèse, j'ai contribué à cet enjeu de recherche en tentant de répondre aux deux questions de recherche suivante : i) quelle est la diversité des effets et modes d'action des principaux QTL de résistance à *A. euteiches* chez le pois, et ii) quelles combinaisons d'effets et modes d'action des QTL permettent d'augmenter l'efficacité de la résistance à *A. euteiches*?

Ce chapitre résume tout d'abord les principaux résultats acquis au cours de ma thèse qui ont permis de répondre ou apporter des éléments de réponse aux questions de recherche posées. Puis, il discute les applications en **recherche et sélection**, des connaissances acquises sur l'identification des modes d'action des QTL de résistance et la compréhension de leurs effets dans différent(e)s conditions et fonds génétiques ainsi que l'identification de stratégies de combinaison de QTL afin de créer des variétés de pois résistantes à *A. euteiches*. Enfin, il propose des perspectives et nouvelles pistes de recherche pour progresser dans la connaissance des effets et combinaisons efficaces de QTL, et des mécanismes sous-jacents en vue de leur exploitation pour l'amélioration génétique de la résistance à *A. euteiches* du pois.

Tableau 1: Synthèse des résultats acquis durant la thèse

QTL	Allèle de résistance	Génotypage SNP (DGC % - Min / Max) ^a				Validation des effets des QTL ^b				Mode d'action des QTL			
		Reference (R)	Elite			Conditions contrôlées		Champ		Probabilité d'infection		Colonisation ^c	
		Puget/DSP/Baccara	Isard (I)	Eden (E)	Enduro (En)	Souche RB84	Souche Ae109	Riec-sur-Belon	Dijon	Exp. #1 et #2	Exp. #3 et #4	Exp. #1 et #2	Exp. #3 et #4
<i>Ae-Ps1.2</i>	PI180693	100	100	100	-			R E	E		-		-
<i>Ae-Ps2.2</i>	PI180693	100	100	100	-	R	R	I E			-	R	-
<i>Ae-Ps2.2</i>	552	100	100	100	-				I			R	
<i>Ae-Ps3.1</i>	PI180693	100	15,2	100	-			E			-		-
<i>Ae-Ps3.1</i>	552	100	0	6,4	-							R	
<i>Ae-Ps4.1</i>	PI180693	100	100	100	-			R I	R I E		-	R	-
<i>Ae-Ps4.5</i>	90-2079	100	100	100	-		R I E		R	R	-	R	-
<i>Ae-Ps5.1</i>	90-2131	100	100	100	100	R		R				R	R
<i>Ae-Ps7.6</i>	PI180693	98,6	100	100	-	R I	I	I E	R E	R	-	R	-
<i>Ae-Ps7.6</i>	90-2131	100	100	100	100	R I E En		R E	E	R	R	R	R
<i>Ae-Ps7.6</i>	552	59,2/98,1	64,9	90,5	-						R	R	
<i>Ae-Ps1.2 + Ae-Ps2.2</i>	PI180693	100	100	100	-			R I E		-	-	-	-
<i>Ae-Ps1.2 + Ae-Ps3.1</i>	PI180693	-	41,8	100	-			E		-	-	-	-
<i>Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1</i>	PI180693	-	37	100	-				E	-	-	-	-
<i>Ae-Ps1.2 + Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1</i>	PI180693	-	52,9/53,1	81,1/94,3	-			E	E	-	-	-	-
<i>Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1</i>	552	-	11,2	19,5	-					-	-	-	-
<i>Ae-Ps2.2 + Ae-Ps7.6</i>	552	66,7/98,4	69,9	91,7	-					-		-	
<i>Ae-Ps3.1 + Ae-Ps7.6</i>	552	57,2/99,2	27,5	52,3	-					-	R	-	
<i>Ae-Ps2.2 + Ae-Ps3.1 + Ae-Ps7.6</i>	552	84,2/99,2	32,7	55,6	-		I		R I E	-	R	-	R
<i>Ae-Ps4.1 + Ae-Ps7.6</i>	PI180693	98,9	100	100	-	R I E		R I E	R E	-	-	-	-
<i>Ae-Ps5.1 + Ae-Ps7.6</i>	90-2131	100	100	100	100	R I E En		R I E	E	-	R	-	R

^a : Pourcentages minimum et maximum de retour au génome donneur (DGC) obtenus pour chaque set de NILs sœurs.

^b : Effet significatif pour au moins l'une des NIL sœur possédant un ou plusieurs QTL, par rapport à au moins l'une des NIL sans QTL du même set, pour au moins une année dans chaque lieu au champ. R, I, E et En : fonds « receveur » de Reference (DSP/Puget/Baccara), Isard, Eden et Enduro. En Gris : QTL détecté par Hamon et al. (2011 et 2013) dans au moins l'une des quatre populations de RILs.

^c : La colonisation prend en compte les données de quantification totale (AUDPC) et de pente d'augmentation d'ADN d'*A. euteiches* dans la plante.

- : NIL non testée pour les modes d'action ou non créée pendant la SAM.

1. SYNTHÈSE DES RESULTATS OBTENUS

1.1. DIVERSITÉ DES EFFETS ET MODES D'ACTION DES QTL DE RÉSISTANCE

Afin de valider la stabilité des déterminants génétiques de la résistance à *A. euteiches* chez le pois en terme de positions génomiques et effets alléliques, dans différents fonds génétiques, des NILs contenant aucun, un, deux ou trois allèles de résistance au sept principaux QTL (Hamon et al. 2011; 2013), ont été créés par BAM dans trois fonds génétiques « receveurs ».

L'approche de BAM conduite précédemment et pendant cette thèse a permis de créer un total de 157 NILs jusqu'à la génération BC5 ou BC6, selon le fonds génétique « Référence » ou « Agronomique », respectivement. Le génotypage de l'ensemble de ces NILs avec 10,494 marqueurs SNP a permis de montrer un très bon retour au génome receveur mais aussi la perte du QTL *Ae-Ps3.1* dans trois sets de NILs et l'introgression réduite de l'allèle « 552 » au QTL *Ae-Ps7.6* dans les trois fonds génétiques (Tableau 1). A la suite de ce génotypage « SNPs », des tests pathologiques sur les 157 NILs, ont été réalisés en conditions contrôlées et au champ, au cours de la thèse.

Le phénotypage des NILs en conditions contrôlées avec deux souches (RB84, pathotype I et Ae109, pathotype III) et au champ sur deux lieux en France (Riec-sur-Belon, Bretagne ; Dijon-Epoisses, Côtes d'Or) et deux années, a permis de confirmer les effets individuels de deux QTL à effets majeurs, *Ae-Ps7.6* et *Ae-Ps4.5*, mais également de QTL à effets mineurs sur la limitation des symptômes au niveau racinaire.

- Les allèles PI180693 et 90-2131 au QTL *Ae-Ps7.6* ont présenté de forts effets individuels sur la sévérité de la maladie, tels qu'identifiés par Hamon et al. (2011; 2013), à la fois en conditions contrôlées plus spécialement vis-à-vis de la souche du pathotype I, et au champ dans les différents environnements testés. Ces effets n'ont pas été spécifiques des fonds d'introgression, mais ont été plus accrus dans le fonds génétique « hiver », en conditions contrôlées et moins accrus au champ. Dans le fonds de référence, ces QTLs agissent sur le ralentissement de l'infection et de la colonisation de la plante par l'agent pathogène. L'allèle 552 au QTL *Ae-Ps7.6* a présenté de tels effets, uniquement dans la NIL possédant la quasi-intégralité du segment donneur sur fonds de référence utilisée pour l'étude des modes d'action des QTL. Ce constat peut être expliqué par l'introgression partielle de l'allèle 552 dans la plupart des NILs utilisées et/ou la plus faible contribution attendue de cet allèle à la résistance ($R^2 < 20\%$, contre $R^2 < 59.8\%$ respectivement, pour l'allèle 90-2131 ; Hamon et al. (2011; 2013). La question de

l'identité ou non des trois allèles de résistance identifiés au QTL *Ae-Ps-7.6* reste entière depuis leur identification par Hamon et al. (2011; 2013). L'hypothèse d'identité des allèles PI180693 et 90-2131, suggérée par leur lien d'apparentement direct (Kraft 1992), et de non identité de l'allèle 552 aux deux autres, est confortée dans cette étude par la différence d'effets observés de l'allèle 552 par rapport aux deux autres.

- L'allèle 90-2079 au QTL *Ae-Ps4.5* a présenté un effet individuel très élevé sur la sévérité de la maladie en conditions contrôlées quel que soit le fonds génétique et nous avons montré qu'il agit à la fois sur le ralentissement de l'infection et de la colonisation par *A. euteiches* dans le fonds de référence. Cet effet a été très spécifique de la souche Ae109 (pathotype III) puisque toutes les NILs porteuses de ce QTL ont été sensibles à la souche RB84, en accord avec les résultats de détection de QTL précédents. Compte-tenu de l'absence de souches du pathotype III révélée au champ et dans les pépinières infestées utilisées en France à ce jour, l'effet observé d'une NIL porteuse du QTL à Dijon en 2014 interroge sur la diversité des souches d'*A. euteiches* présentes dans la pépinière infestée de Dijon. Une étude récente du pouvoir pathogène de 10 souches isolées dans la pépinière utilisée à Dijon a montré que l'ensemble des souches appartenait au pathotype I (Onfroy et al. 2015, soumis). Cependant, des données en cours d'acquisition sur la diversité génétique des populations d'*A. euteiches* présentes en France ont identifié des souches isolées de la pépinière de Dijon présentant des profils de génotypage différents de ceux des souches du pathotype I (Quillévéré-Hamard et al. 2014).
- Les QTL à effets mineurs *Ae-Ps2.2* (essentiellement allèle PI180693) et *Ae-Ps5.1* (allèle 90-2131) ont présenté des effets significatifs sur la sévérité de la maladie en conditions contrôlées, essentiellement dans les fonds « receveurs » de référence. Ils agissent sur la limitation de la colonisation par l'agent pathogène. L'effet sur la sévérité de la maladie ont également été observés sur racines au champ, à l'inverse des observations précédentes (Hamon et al. 2013), plus spécifiquement à Riec-sur-Belon mais de manière peu consistante selon les différents fonds « receveurs ». L'effet du QTL *Ae-Ps5.1*, qui semble plus spécifique du fonds génétique de détection de QTL et de stades de développement précoces de la plante, en accord avec les résultats précédents (Hamon et al. 2013), sera à confirmer avec les notations sur parties aériennes au champ.
- Les allèles PI180693 aux QTL à effets mineurs *Ae-Ps1.2* et *Ae-Ps4.1* ont montré des effets significatifs sur la sévérité de la maladie au champ dans divers environnements et fonds génétiques. Ces effets n'ont pas été observés en conditions contrôlées sur plantules, sauf pour le QTL *Ae-Ps4.1* qui a révélé un petit effet sur la limitation de la quantité

d'agent pathogène ayant colonisé la racine grâce à la précision de la méthode Q-PCR. Ces QTL semblent agir à des stades plus tardifs de développement de la plante, tel que suggéré par Hamon et al. (2013) qui n'ont pas détecté ces QTL pour des variables de résistance en conditions contrôlées.

- Les allèles de résistance PI180693 et 552 au QTL à effet mineur *Ae-Ps3.1* n'ont pas montré d'effet dans les NILs testées, sauf, respectivement, au champ dans un fonds génétique et un environnement et en conditions contrôlées sur la vitesse et la quantité d'ADN d'*A. euteiches* ayant colonisé la plante. Trois des six sets de NILs porteurs du QTL n'ont pas permis de valider son effet, du fait de la perte de l'introgession à ce QTL dans ces sets. Ce QTL avait été détecté essentiellement à partir de notations au champ dans Hamon et al. (2013). L'effet des allèles de résistance au QTL *Ae-Ps3.1* sera à confirmer dans les trois sets de NILs restants, dont deux sur fonds de référence, à partir des données supplémentaires acquises sur parties aériennes au champ.

1.2. EFFICACITE DES COMBINAISONS DE QTL DE RESISTANCE

Le phénotypage des NILs en conditions contrôlées et au champ a également permis de tester l'effet de combinaisons de QTL par rapport aux NILs sans QTL et aux NILs porteuses de QTL individuels. Trois types de combinaisons de QTL ont présenté des effets significatifs et sont présentées ci-dessous par ordre décroissant de niveau d'effets et de consistance dans les différentes conditions et environnements de test étudiés.

Un effet accru des combinaisons du QTL *Ae-Ps7.6* avec les QTL *Ae-Ps4.1* ou *Ae-Ps5.1* a été mis en évidence par rapport aux NILs sans QTL dans les différents fonds « receveurs » à la fois en conditions contrôlées vis-à-vis de la souche RB84 et au champ dans plusieurs environnements. L'effet de QTL mineurs en combinaison avec des QTL majeurs n'est pas toujours évident à révéler, dû à l'effet « masquant » des QTL majeurs. Dans notre étude, nous avons mis en évidence dans certaines NILs que l'effet des combinaisons de QTL n'était pas seulement dû à celui du QTL *Ae-Ps7.6*. Ainsi, dans les NILs sur fonds de référence, l'effet de la combinaison « QTL *Ae-Ps-7.6* + *Ae-Ps5.1* » (allèles 90-2131) sur la limitation des symptômes racinaires, de l'infection et de la colonisation par *A. euteiches* a été accru par rapport à celui du QTL *Ae-Ps7.6* seul en conditions contrôlées. De même, la combinaison « QTL *Ae-Ps-7.6* + *Ae-Ps4.1* » (allèles PI180693) a présenté un effet au champ plus consistant selon les environnements et fonds « receveurs ».

L'effet significatif du QTL *Ae-Ps1.2*, en combinaison avec les QTL *Ae-Ps2.2* et/ou *Ae-Ps3.1* (allèles PI180693), a également été démontré uniquement au champ et plus spécialement à

Riec-sur-Belon. La comparaison de cette combinaison trois QTL avec les effets individuels de chaque QTL, a permis de montrer un effet significatif de la combinaison par rapport aux effets individuels, spécifiquement dans le fonds « Eden » qui possèdent réellement les trois QTL. Dans le fonds « Isard », l'effet de la combinaison des deux QTL *Ae-Ps1.2* et *Ae-Ps2.2* a surtout été apporté par le QTL *Ae-Ps2.2* et dans une moindre mesure le QTL *Ae-Ps1.2*.

Un effet significatif de la combinaison d'allèles de résistance issus de « 552 » aux trois QTL *Ae-Ps2.2*, *Ae-Ps3.1* et *Ae-Ps7.6* a été mis en évidence, d'une part, en conditions contrôlées, vis-à-vis de la souche RB84 dans le fonds de référence pour limiter l'infection et la colonisation par *A. euteiches* et de la souche Ae109 dans le fonds « Isard », et d'autre part, au champ spécifiquement à Dijon dans les trois fonds « receveurs ». Comparativement aux effets individuels des trois QTL, il a été suggéré dans le chapitre précédent que les QTL *Ae-Ps3.1* et *Ae-Ps7.6* semblaient contribuer davantage à l'effet de la combinaison tri-QTL sur la résistance à la souche RB84 dans le fonds de référence. Cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée dans les fonds « Isard » et « Eden » qui ont perdu l'introgession au QTL *Ae-Ps3.1*. Dans ces fonds, le comportement de la combinaison peut être davantage dû aux QTL *Ae-Ps7.6* et *Ae-Ps2.2*, dont les effets individuels ont été notés, respectivement, en conditions contrôlées vis-à-vis de la souche Ae109 et au champ à Dijon.

2. DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS ; RETOMBEES EN RECHERCHE ET SELECTION

Ce travail de thèse a confirmé l'architecture génétique de la résistance partielle du pois à *A. euteiches*, qui inclut des composantes génétiques ou QTL à effets majeurs et d'autres à effets mineurs, tel que souvent observé pour les résistances polygéniques chez les plantes (Calenge et al. 2004; Delourme et al. 2014; Ding et al. 2011; Li et al. 2003; Richardson et al. 2006; Wang et al. 1999; 2010). Cette étude a approfondi les effets et modes d'action des QTL de résistance dans différents fonds génétiques, environnements et sur différentes étapes du cycle de l'agent pathogène, pour l'identification de stratégies de combinaison des QTL contribuant à augmenter les niveaux de résistance.

Les résultats obtenus permettent d'apporter des connaissances sur :

- L'effet des QTL de résistance dans différents fonds génétiques.
- L'effet des QTL de résistance à différents stades de développement de la plante et dans différentes conditions environnementales
- Les modes d'action des QTL sur différentes étapes du cycle de l'agent pathogène
- Les combinaisons de QTL permettant d'augmenter les niveaux de résistance partielle

Ces connaissances sont primordiales pour l'exploitation des QTL en sélection, puisque peu de références sont disponibles sur ce sujet concernant les résistances polygéniques (St Clair 2010). Les résultats apportent également des éléments de discussion sur les fonctions sous-jacentes aux QTL de résistance.

2.1. VALIDATION DES EFFETS DES QTL DE RESISTANCE DANS DIFFERENTS FONDS GENETIQUES

Dans notre étude, les effets de l'ensemble des QTL de résistance apportés par les lignées PI180693 et 90-2079 ont été re-déTECTés dans les NILs sur fonds de référence dans les mêmes conditions où ils avaient précédemment été identifiés (Hamon et al. 2013). Ce constat a été effectué pour les QTL dont les allèles de résistance étaient apportés par 90-2131, sauf avec la souche Ae109 en conditions contrôlées. Néanmoins, il n'a pas été confirmé pour les QTL étudiés dont l'allèle de résistance était apporté par 552. Outre le fait que l'introggression soit partielle à l'un des trois QTL étudiés (*Ae-Ps7.6*), l'absence d'effet de l'allèle 552 aux deux autres QTL (*Ae-Ps2.2*, *Ae-Ps3.1*) dans les NILs sur fonds de référence peut être dû à leurs effets mineurs [$R^2 < 15\%$, Hamon et al. (2011)].

Dans les NILs sur fonds génétiques agronomiques, les effets des QTL majeurs *Ae-Ps7.6* et *Ae-Ps4.5* ont été validés dans les différents fonds en conditions contrôlées et concernant *Ae-Ps7.6*, dans au moins l'un des fonds agronomiques au champ. L'effet du QTL *Ae-Ps7.6* a été accru dans le fonds « Isard » en conditions contrôlées, potentiellement dû à la base génétique des fonds « hiver » plus adaptée à la réponse aux stress que celle des fonds « printemps ». En effet, les lignées sur fonds « hiver » contiennent des gènes impliqués dans la tolérance aux stress abiotiques, tels que le gel (Yadav 2010). Plusieurs études ont rapporté des interactions positives entre le gel et les agents pathogènes au niveau phénotypique, impliquant des mécanismes basés sur la modification de l'activité photosynthétique (Pociecha et al. 2010) et l'induction de protéines PR (Yu et al. 2001). A l'inverse, cet effet a été réduit au champ où les fonds « hiver » expriment habituellement une moindre sensibilité et où le positionnement de la notation est souvent réalisé à un stade moins discriminant qu'en conditions contrôlées.

Les effets des QTL mineurs *Ae-Ps1.2* et *Ae-Ps4.1* [$R^2 < 12\%$ et 25% , respectivement, Hamon et al. (2011)] ont également été validés dans au moins un des deux fonds génétiques agronomiques dans chaque environnement testé au champ. Ceux du QTL *Ae-Ps2.2* ($R^2 < 27\%$, Hamon et al. 2011) n'ont été validés dans ces fonds que dans certains environnements. L'effet du QTL *Ae-Ps5.1* [$R^2 < 27\%$, Hamon et al. (2011)] a été spécifique du fonds de référence. La perte d'effet des QTL de résistance une fois transférés dans les autres fonds génétiques a pu

être due i) à une surestimation de l'effet lors de la détection de QTL dans les populations de RIL (Hospital 2009; St Clair 2010), ii) à des interactions épistatiques avec le fonds génétique qui ne sont plus présentes dans les NILs (Eshed and Zamir 1995), iii) à la précision du test pathologique pour permettre de re-détecter les effets plus faibles des QTL de résistance, et enfin iv) la pureté génétique des lignées donneuses, notamment 552 dans notre étude, car le génotypage SNP a permis de mettre en évidence des zones d'hétérozygotie dans cette lignée « donneuse » qui ont pu biaiser la détection de QTL dans la population de RILs précédente.

2.2. VALIDATION DES EFFETS DES QTL DE RESISTANCE DANS DIFFERENTES CONDITIONS

Nos résultats, nous ont aussi permis d'observer que le QTL majeur *Ae-Ps7.6*, ainsi que certains QTL mineurs (notamment *Ae-Ps2.2*) présentaient des effets dès le stade plantule en conditions contrôlées, et restaient efficaces au stade 8/10 feuilles de la plante au champ. En revanche, certains QTL (*Ae-Ps1.2* et *Ae-Ps4.1*) ont présenté des effets seulement au champ et non en conditions contrôlées. Ces QTL contribueraient à la mise en place d'une résistance exprimée à un âge plus tardif des racines, dite résistance ontogénique. Sur le pois semé en hiver, un plus faible impact de la maladie sur le rendement a été observé. Il serait en partie dû à la moindre sensibilité de la plante au moment des premières attaques, ce qui permettrait au pois d'hiver d'échapper partiellement à la maladie (Carrouée and Moussart 2011). Dans un système de test en serre développé récemment pour évaluer la nuisibilité de la maladie à différents stades d'infection de la plante, Moussart et al. (2014) ont montré que la nuisibilité de la pourriture racinaire due à *A. euteiches* était d'autant plus importante que la plante était attaquée à un stade jeune. Une attaque très tardive, aux stades 12 feuilles et début floraison, ne semblaient avoir aucune conséquence sur la croissance et le développement végétatif des plantes. Les auteurs ont suggéré l'hypothèse d'une moindre réceptivité des tissus racinaires liée à leur âge et/ou au fait que le système racinaire était plus développé au moment de l'inoculation. Dans notre test en conditions contrôlées, les plantes étaient âgées de 14 jours et ont subi la présence d'*A. euteiches* pendant seulement 7 jours en conditions favorables à son développement (humidité, T°=23-25°C). A l'inverse, au champ les plantes ont été notées à un stade minimum de 6 semaines (8/10 feuilles) en présence constante de l'agent pathogène, dans des conditions naturelles plus ou moins favorables à la maladie. Afin de confirmer la contribution des QTL *Ae-Ps1.2* et *Ae-Ps4.1*, il serait intéressant d'évaluer les couples de NILs porteuses ou non de ces QTL individuels dans le système de test de nuisibilité de la maladie développé en serre. Le rôle du stade de développement de la plante sur la résistance a également été montré dans d'autres pathosystèmes, avec un effet parfois inverse [tissus âgés

plus sensibles, (Giorgetti 2013)]. Dans l'étude des pathogènes aériennes, des QTL spécifiques du stade de développement de la plante ont été également mis en évidence chez l'orge (Wang et al. 2010) et le blé (Mallard et al. 2008).

Au champ, peu de spécificités des QTL de résistance ont été mises en évidence, confirmant les observations précédentes (Hamon et al. 2013). Les effets des QTL *Ae-Ps7.6* (allèles PI180693 et 90-2131), *Ae-Ps1.2* et *Ae-Ps4.1* (allèles PI180693) ont été consistants dans les différents environnements testés. L'effet du QTL *Ae-Ps5.1* semble avoir été davantage spécifique de Riec-sur-Belon, celui du QTL *Ae-Ps4.5* de Dijon et celui du QTL *Ae-Ps2.2* de Riec-sur-Belon ou de Dijon selon l'allèle de résistance (respectivement, PI180693 ou 552). Les différences d'effet des QTL de résistance à *A. euteiches* dans les différents environnements peuvent être dus au climat différent entre années et lieux (température, pluviométrie), mais également beaucoup aux lieux d'expérimentation, notamment aux sols. Les deux pépinières de Riec-sur-Belon et de Dijon diffèrent par leurs compositions de sol (sablo-limoneux à Riec-sur-Belon et argilo-limoneux à Dijon), pouvant influencer l'attractivité et les déplacements des zoospores. De plus, peu de données sont disponibles sur leur composition en souches d'*A. euteiches*, qui ont été caractérisées comme appartenant au pathotype I dans les deux lieux (Onfroy et al. 2015, soumis), et sur l'existence d'autres agents du complexe racinaire (*Fusarium* spp., *Phoma medicaginis*) qui peuvent interagir avec *Aphanomyces*. Les résultats d'effets des QTL sur partie racinaires obtenus au champ seront à confirmer avec les données de jaunissement sur parties aériennes, qui pourraient éventuellement révéler également des spécificités d'expression des QTL sur les différentes parties de la plante.

2.3. MODE D'ACTION DES QTL DE RESISTANCE

Au cours de cette thèse, l'utilisation d'un test, destructeur mais reproductible, de suivi en cinétique du développement des symptômes a permis d'évaluer l'effet des QTL sur les premières étapes du cycle d'*A. euteiches* (infection, colonisation des tissus). Les travaux de mise au point du test de PCR quantitative pour quantifier l'ADN d'*A. euteiches* dans la plante, ont permis de mettre en évidence avec précision les effets des QTL sur l'étape de la colonisation de la plante par l'agent pathogène. Pour les agents pathogènes racinaires, il existe très peu de références sur les méthodes permettant de mesurer les étapes des cycles pathogènes car elles sont difficiles à mettre en œuvre (Azzimonti et al. 2013; Broers 1997; Chung et al. 2010; Diaz-Lago et al. 2003; Herrera-Foessel et al. 2007; Leiva-Mora et al. 2015; Negussie et al. 2005; Rufty and Main 1989; Viljanen-Rollinson et al. 1998).

Dans notre étude, nous avons réussi à mettre en évidence que les QTL à effets majeurs, *Ae-Ps7.6* (allèles PI180693, 90-2131 et 552) et *Ae-Ps4.5* (allèle 90-2079) agissaient indépendamment sur les deux étapes étudiées alors que les QTL à effets mineurs *Ae-Ps2.2* (allèles PI180693 et 552), *Ae-Ps3.1* (allèle 552) et *Ae-Ps5.1* (allèle 90-2131) n’agissaient que sur la colonisation. Ces effets ont été confirmés sur le niveau de symptômes racinaires au champ, dans les NILs sur fonds de référence porteuses (i) d’allèles de résistance individuels à effets majeurs (QTL *Ae-Ps7.6*), (ii) de combinaisons d’allèles à effets majeurs et mineurs validés individuellement (QTL *Ae-Ps7.6* + *Ae-Ps5.1*) ou (iii) de combinaisons d’allèles à effets mineurs (QTL *Ae-Ps2.2* + *Ae-Ps3.1* + *Ae-Ps7.6*) non validés individuellement au champ. L’efficacité de combinaisons de QTL sur la résistance partielle peut donc être due à des QTL à effets majeurs agissant individuellement sur différentes étapes du cycle de l’agent pathogène mais aussi à des QTL à effets mineurs agissant individuellement sur les mêmes étapes du cycle. Néanmoins, il est possible que les QTL agissent également sur d’autres étapes du cycle non évaluées dans cette étude (la germination des spores et la sporulation). Avec l’usage de NILs, Richardson et al. (2006) ont également mis en évidence un effet « pleiotrope », plutôt que des fonctions spécialisées, de plusieurs QTL individuels sur la période de latence, l’efficacité d’infection, la taille des lésions et la densité de pustules pour la rouille de l’orge. A l’inverse, Chung et al. (2010) ont révélé des modes d’action distincts de deux QTL sur deux étapes, la pénétration et la colonisation, du cycle de *Setosphaeria turcica* chez le maïs. Mundt (2014) a suggéré que si l’usage en sélection de QTL à effets « pléiotropes » sur plusieurs étapes du cycle pathogène étaient plus aisé, il risquait également de réduire le nombre de mutations requises chez l’agent pathogène pour contourner ou éroder la résistance, donc cela impose une pression de sélection moins forte sur l’agent pathogène.

2.4. SELECTION ASSISTEE PAR MARQUEURS ET COMBINAISONS DE QTL POUR LA RESISTANCE

Cette thèse a permis d’apporter des données expérimentales sur la mise en œuvre de la SAM, implémentée dans un schéma de BAM. Relativement peu d’exemples expérimentaux d’implémentation de la SAM pour les résistances quantitatives sont disponibles dans la littérature (St Clair 2010), même si la méthodologie de BAM est couramment utilisée dans le secteur privé de l’amélioration des plantes.

L’expérience de la SAM dans cette étude a permis de soulever deux points majeurs pour sa réussite, qui ont fait l’objet d’études théoriques (Hospital 2005; Hospital and Charcosset 1997). Afin de réussir au mieux un programme de SAM, il faut une :

- Quantité suffisante de marqueurs afin de (i) tracer des introgressions (au moins trois marqueurs par introgression), de taille souvent larges et éviter la perte des introgressions par doubles crossing-overs (tel qu'observé pour le QTL *Ae-Ps3.1*), (ii) sélectionner dès les 1ères générations dans les zones flanquant les QTL, où le retour au fonds receveur est le plus difficile à obtenir, afin de limiter les tailles d'introggression et (iii) contrôler le bon retour au fonds receveur en dehors des zones d'introggressions. Dans notre étude, nous disposions que d'un faible nombre de marqueurs SSR associés aux QTL et globalement sur le génome (Hamon et al. 2013; Loridon et al. 2005). Pour pallier au manque de contrôle du génome par les marqueurs, davantage de générations de BC ont été réalisées (5-6) par rapport au nombre supposé suffisant (3-4) dans un schéma de BAM.
- Quantité suffisante d'individus triés à chaque génération, pour augmenter la puissance de sélection des individus ayant à la fois introgressé plusieurs fragments cibles et optimisé leur retour au fonds receveur, en particulier dans les zones flanquant les QTL. Dans notre étude, l'effectif de 91 individus triés à chaque génération n'a pas été suffisant pour optimiser les chances d'introggresser trois QTL simultanément, tout en s'assurant d'un bon retour au fonds receveur en dehors des zones introgressées. Néanmoins, le nombre de croisements manuels de fleurs de pois réalisable a été limitant pour produire de larges descendance à chaque génération (obtention de 2-3 graines par gousse croisée). Des schémas d'introggression mono- ou bi-QTL restent le plus réaliste sur le plan pratique.

Les résultats apportés au cours de la thèse permettent d'apporter des éléments de choix de QTL d'intérêt pour augmenter le niveau de résistance en France, sur la base de leur consistance d'effets et modes d'actions dans différent(e)s conditions, environnements et fonds génétiques. Le QTL à effet majeur *Ae-Ps7.6* (allèles PI180693 ou 90-2131), en combinaison avec les QTL à effets mineurs *Ae-Ps5.1* et/ou *Ae-Ps4.1*, exercerait un effet très précocement et dans différents environnements au champ et fonds génétiques, qui se traduit en fin de cycle par une diminution importante de la sévérité de la maladie. Les allèles de résistance issus de PI180693 aux QTL *Ae-Ps1.2*, *Ae-Ps2.2* et *Ae-Ps3.1* auraient, en combinaison, un effet au champ peu spécifique d'environnements et fonds génétiques. Néanmoins, Hamon et al. (2013) ont montré que ces allèles de résistance étaient associés à des allèles de morphologie et développement de la plante défavorables à la sélection du pois protéagineux (feuilles non afila/*Ae-Ps1.2* ; anthocyanes-tardiveté/*Ae-Ps2.2* ; tardiveté/*Ae-Ps3.1*). Enfin, les allèles de

résistance apportés par 552 à la combinaison des trois QTL *Ae-Ps2.2+ Ae-Ps3.1+ Ae-Ps7.6* exercerait un effet plus spécifique de l'environnement (identifié à Dijon uniquement), mais non spécifique des fonds génétiques. Dans cette étude, des combinaisons de plus de trois allèles provenant de plusieurs sources de résistance n'ont pas pu être testées, mais seraient probablement pertinentes pour augmenter significativement les niveaux de résistance partielle.

2.5. HYPOTHESES SUR LES FONCTIONS SOUS-JACENTES AUX QTL DE RESISTANCE

Les résultats obtenus sur l'évaluation des NILs permettent de discuter de différentes hypothèses quant aux mécanismes et fonctions sous-jacents aux QTL de résistance.

Une hypothèse avancée par Poland et al. (2009) est que des gènes impliqués dans la morphologie ou le développement de la plante auraient un effet pléiotrope sur la résistance aux maladies. Plusieurs co-localisations de QTL de résistance avec des gènes/QTL contrôlant des caractères morphologiques ou phénologiques ont été détectées et introgressées dans les NILs évaluées. Ainsi, les NILs porteuses de l'allèle PI180693 au QTL *Ae-Ps1.2* associé à l'allèle *Af* (feuilles non afila), ont présenté des feuilles normales et une résistance au niveau racinaire au champ. Cette co-localisation a été récemment confirmée par génétique d'association (Desgroux et al. 2016). Des QTL de plusieurs autres caractères d'intérêt chez le pois (Burstin et al. 2007), notamment Bourion et al. (2010) ont identifiés au niveau racinaire, des QTL d'architecture et de nutrition azoté localisés dans la région du gène *Af*.

La spécificité de spectre d'action des QTL de résistance à effets majeurs chez les plantes (Ballini et al. 2008; Le Van et al. 2013) a souvent suggéré l'hypothèse de gènes majeurs contournés à effets résiduels, codant des protéines de type NB-LRR, sous-jacents à ces QTL (Broglie et al. 2006; Calenge et al. 2005; Poland et al. 2009). Chez le riz, des substitutions dans le domaine LRR du gène *Xa21* ont conféré une résistance partielle à *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Wang et al. 1998). Néanmoins, les quelques exemples de QTL de résistance clonés chez les plantes montrent que d'autres fonctions peuvent sous-tendre les QTL majeurs (Cook et al. 2012; Kou and Wang 2010; Michelmore et al. 2013; Niks et al. 2015). Chez *M. truncatula*, Bonhomme et al. (2014) ont identifiés deux gènes codant pour une protéine F-box et un facteur de transcription de type MYB, comme candidats sous-jacent au locus *prAe1/AER1* de résistance à *A. euteiches*. Néanmoins, le locus *prAe1/AER1* semblerait ne pas se situer en position synténique par rapport aux QTL étudiés dans cette thèse (Pilet-Nayel et al. 2014). Cependant, Desgroux et al. (2016) ont identifié un gène codant pour une

protéine F-Box dans la région du QTL *Ae-Ps7.6* et un domaine LRR dans la région du QTL *Ae-Ps4.5*, permettant ainsi de faire l'hypothèse que le QTL *Ae-Ps4.5* serait un gène majeur contourné à effet résiduels par la souche RB84 du pathotype I. La disponibilité récente de larges ressources génomiques chez le pois (Duarte et al. 2014; Tayeh et al. 2015) permettra de confirmer les positions des QTL et ainsi mieux identifié les gènes candidats sous-jacent chaque régions.

3. PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Ce travail de thèse a posé des bases pour la poursuite de travaux sur (i) la validation des effets des QTL à différents stades de la plante et sur la nuisibilité de la maladie, (ii) la densification en marqueurs des zones à QTL et l'utilisation de combinaisons de QTL en sélection, (iii) la cartographie fine des QTL, (iv) l'étude des modes d'action des QTL sur le cycle de l'agent pathogène et des mécanismes moléculaires associés aux QTL en réponse à l'infection, et (v) l'étude de la durabilité des QTL de résistance.

3.1. EFFETS DES QTL DE RESISTANCE SUR LA NUISIBILITE DE LA MALADIE

Dans cette thèse, nous avons évalué le matériel NILs pour la résistance intrinsèque à *A. euteiches*, d'une part en conditions contrôlées *via* un indice de nécrose racinaire mesuré à un stade plantule, d'autre part au champ en pépinière fortement infestée en utilisant le même indice de notation sur racines ainsi qu'un indice de jaunissement des parties aériennes. Néanmoins, ces évaluations n'ont pas permis d'estimer les effets des QTL sur la préservation du rendement et de ses composantes de rendement en conditions fortement infestées.

Au sein du projet « **PeaMUST** » (Adaptation **M**ulti-**S**Tress et Régulations biologiques pour l'amélioration du rendement et de la stabilité du **P**ois protéagineux, 2012-2019), les meilleures NILs identifiées dans cette thèse pour la résistance, vont être évaluées à partir de 2016, pour leur rendement au champ sur un réseau multi-local INRA-GSP de parcelles infestées *vs.* saines. Ces évaluations permettront de mesurer l'effet de combinaisons de QTL sur le rendement dans des fonds génétiques agronomiques en conditions de semis d'hiver ou de printemps, et d'estimer le coût potentiel pour la plante de posséder les QTL de résistance. Les NILs seront aussi évaluées, dans le cadre du projet « **ARMEN** » (Aphanomyces : **R**ésistance, **M**éthodologie d'**E**valuation et **N**uisibilité, CASDAR, 2016-2018) dans un système de test développé en serre (Moussart 2014). Ce test permettra de mesurer l'effet des QTL à différents stades de la plante au moment de l'infection pour limiter la nuisibilité de la pourriture racinaire. En permettant ainsi de montrer l'impact de la résistance partielle et de ses

composantes génétiques sur le rendement final, ce test sera proposé pour l'évaluation à l'inscription des futures variétés résistantes.

3.2. UTILISATION DES MARQUEURS ET COMBINAISONS DE QTL EN SÉLECTION

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis de montrer qu'un grand nombre de marqueurs SNPs récemment développés (Duarte et al. 2014; Tayeh et al. 2015) couvraient les IC précédemment définis des QTL de résistance. La validation de l'association de ces SNPs au phénotype de résistance et la re-précision des IC des QTL est un travail indispensable avant l'usage de ces marqueurs SNP en sélection. Des travaux de génotypage complémentaire des populations de RILs à partir desquelles les QTL avaient été détectés sur des cartes de quelques 100aines de marqueurs SSR, sont en cours à l'aide de 2000 SNPs issus des projets récents de séquençage d'ADNc/g et découverte de SNPs chez le pois (Boutet et al. 2016; Duarte et al. 2014; Tayeh et al. 2015). Les cartes génétiques seront mises à jour, les QTL seront re-détectés et leurs positions génomiques seront comparées à celles de marqueurs SNP associés à la résistance par génétique d'association dans une étude parallèle (Desgroux et al. 2016). Un large set de marqueurs SNP sera défini pour tracer les meilleures combinaisons de QTL en sélection. Ce set sera utilisé dans un schéma de sélection qui sera élaboré pour améliorer la résistance aux principaux stress du pois (*Aphanomyces*, *Ascochyte* et gel). Ces travaux d'intégration des SNPs en sélection pour la résistance feront l'objet du projet « **PeaMAS** » (**Pea Marker Assisted Selection**, 2016-2018 ; financé par le Fonds d'Action Stratégique des Oléoprotéagineux « FASO »), qui sera initié en 2016 et qui rassemblera l'INRA ainsi que les six sélectionneurs de pois membres du GSP. Le projet permettra aux différents obtenteurs d'acquérir un set de marqueurs SNP associés à la résistance aux principaux stress et de valider ces marqueurs dans leurs programmes de sélection de pois protéagineux. Ce projet permettra aussi de délivrer les différentes NILs présentant des combinaisons de QTL d'intérêt pour leur utilisation en tant que géniteurs dans les programmes de SAM.

3.3. CARTOGRAPHIE FINE DE QTL DE RESISTANCE

En vue de réduire les IC de certains QTL pour faciliter leur usage en sélection (rupture de liaisons défavorables) et identifier des gènes candidats sous-jacents aux QTL, des NILs hétérozygotes à chaque QTL ont été conservées dans les fonds de référence au cours de la fixation du matériel. Au cours de cette thèse et dans le cadre du projet PeaMUST, nous avons commencé à réduire l'IC du QTL *Ae-Ps7.6* par criblage moléculaire et fixation d'individus recombinants dans cet IC, à partir d'une descendance dite « pseudo-F2 » de 645 plantes issues

de NILs hétérozygotes au QTL seul. Les individus recombinants identifiés ont été ensuite phénotypés en conditions contrôlées. Trois vagues de génotypage des recombinants phénotypés, à l'aide de 4SSRs, 6 SNPs (Duarte et al. 2014) puis 21 SNPs (Tayeh et al. 2015), ont permis de réduire l'IC du QTL, respectivement, à 12 cM, 7 cM puis 1,4 cM (Annexe V.1). Actuellement, des individus recombinants fixés sélectionnés dans l'IC de 1.4 cM par criblage d'une deuxième descendance « pseudo-F2 » de 2081 plantes, sont en cours de phénotypage et seront génotypés plus densément dans l'IC réduit à l'aide de nouveaux marqueurs SNPs (Boutet et al. 2016). Lorsque l'intervalle sera suffisamment réduit, une banque de grands fragments d'ADN (BAC) sera construite et criblée à l'aide des marqueurs flanquant l'IC, pour identifier la région physique et les gènes candidats sous-jacents au QTL.

3.4. MODE D'ACTION DES QTL SUR LE CYCLE D'*A. EUTEICHES*

Afin d'approfondir l'étude des modes d'action des QTL de résistance sur les étapes du cycle de l'agent pathogène et ses traits d'histoire de vie, il sera nécessaire de développer de nouvelles méthodologies.

Au cours de cette thèse, nous avons essayé de quantifier **la sporulation**, trait de vie clé d'un agent pathogène permettant sa multiplication. Une méthode de broyage des racines, puis utilisation de pectinases et cellulases, nous a permis de détruire les parois cellulaires racinaires de la plante et libérer les oospores, qui ont été filtrées, puis comptées au microscope (Billard 2014). Cette méthode a permis d'identifier un nombre plus important d'oospores dans les NILs ne possédant pas de QTL, mais la perte importante d'oospores à chaque étape de la méthode, a fait perdre quasiment 80% des oospores initiales. Une amélioration de cette méthodologie sera donc nécessaire afin de tester l'effet des QTL sur la sporulation.

L'action des QTL sur la limitation de **la germination des oospores** serait également d'un intérêt majeur pour limiter l'infection par *A. euteiches*. Elle permettrait de limiter le nombre de zoospores libérées et donc le potentiel d'inoculum dans les racines. Pour cela, le développement d'une méthodologie d'extraction d'oospores viables et de mise en germination est nécessaire. L'attractivité des zoospores libérées, due aux **exsudats racinaires** de la plante, est également une autre étape du cycle qui pourrait également être évaluée. Des méthodologies d'extraction des exsudats racinaires ont été développées (Billard 2014; Kraft and Boge 1996) et resteraient à appliquer sur les NILs créées, afin d'identifier si les QTL sont impliqués dans le contrôle d'une production d'exsudats racinaires plus ou moins attractifs pour les zoospores.

3.5. MECANISMES ASSOCIES AUX QTL DE RESISTANCE EN REPONSE A L'INFECTION

La connaissance plus précise des mécanismes cellulaires et moléculaires contrôlés par les QTL de résistance permettrait également de mieux orienter les stratégies de choix de combinaison de QTL favorisant la mise en place de mécanismes multiples. Notamment, il serait intéressant de savoir si les QTL agissant sur la même étape de colonisation de la plante par l'agent pathogène sous-tendent des mécanismes différents. Chez *M. truncatula*, des études cytologiques et histologiques ont montré que la résistance partielle conférée par le QTL *prAe1* de résistance à *A. euteiches* se traduisait par la mise en place de mécanismes de protection du cylindre central, à travers la formation de couches supplémentaires au niveau du péricycle ainsi que l'accumulation de lignine et de composés phénoliques dans le cortex puis dans le cylindre central (Djebali et al. 2009). Le rôle important des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des flavonoïdes a également été mis en évidence dans les mécanismes de défense associés au QTL en réponse à l'infection (Badis et al. 2015). Ainsi, il serait intéressant d'observer si ces mécanismes sont mis en place dans les NILs de pois étudiées. Avec les ressources génomiques récemment développées chez le pois (Alves-Carvalho et al. 2015; Tayeh et al. 2015), l'identification de gènes ou métabolites différentiellement exprimés en réponse à l'infection pourra être réalisée dans des couples de NILs porteuses ou non de QTL à IC réduits, afin d'identifier les voies métaboliques régulées par les QTL de résistance.

3.6. DURABILITE DES QTL DE RESISTANCE

En vue de la gestion durable des QTL de résistance en sélection et dans les stratégies intégrées de lutte contre *A. euteiches*, il sera indispensable d'évaluer si les effets des QTL ne se seraient pas érodés après plusieurs cultures de pois, tel qu'observé pour la résistance quantitative dans d'autres pathosytèmes (Andrivon et al. 2007; Chain et al. 2007; Montarry et al. 2012; Villareal and Lannou 2000). La capacité d'adaptation des populations d'*A. euteiches* sous pression de sélection due aux locus de résistance est totalement inconnue, puisqu'aucune variété résistante n'a été cultivée à ce jour. L'agent pathogène étant homothallique et tellurique, l'hypothèse de son adaptation par mutation peut être avancée. L'hypothèse de son évolution par adaptation à des hôtes alternatifs chez les légumineuses a été également suggérée, suite à l'identification de souches du pathotype III dans des parcelles de pois américaines présentant un historique de culture de luzerne qui est hôte d'*A. euteiches* (Onfroy et al. 2015, soumis). Il sera donc nécessaire de pouvoir anticiper les risques de contournement de QTL en simulant, en conditions contrôlées ou au champ, une forte pression de l'agent pathogène sur des génotypes porteurs de QTL de résistance, pendant plusieurs cycles de

culture de pois, en alternance ou non avec d'autres légumineuses hôtes. Dans le cadre du projet Inter-régional « PROGRAILIVE » (Production Protein Grain For Livestock, 2016-2019), des essais de cycle accélérés de culture successifs simulés en conditions contrôlées sont en cours de mise au point sur des NILs, afin d'observer l'évolution de la sévérité de la maladie, et potentiellement celle des souches d'*A. euteiches*, sur dix cycles. Ces cycles seront également réalisés en conditions de culture au champ en parcelles infestées sur quatre années. Ce projet permettra aussi d'évaluer la durabilité de combinaisons de QTL en rotation ou non avec la féverole, deuxième légumineuse hôte cultivée en France dont les variétés sont à ce jour résistantes.

4. CONCLUSION GENERALE

Au cours de cette thèse, nous avons exploité un matériel unique de type NILs pour caractériser la diversité des effets et les modes d'action des principaux QTL de résistance à *A. euteiches* chez le pois. Nous avons montré que les effets de ces QTL pouvaient être majeurs ou mineurs et pouvaient dépendre du fonds génétique, du stade de la plante et des conditions environnementales. Nous avons montré que ces QTL, seuls ou en combinaison, pouvaient agir sur une ou plusieurs étape(s) du cycle de l'agent pathogène. Nous avons identifié des combinaisons de QTL d'intérêt permettant d'augmenter le niveau de résistance partielle du pois. Ces résultats apportent des connaissances supplémentaires sur les bases génétiques des résistances quantitatives aux maladies chez les plantes, ainsi que du matériel végétal (NIL), des outils et des éléments de choix de QTL à utiliser en SAM. Ils ouvrent de nouvelles pistes de recherche vers l'approfondissement des modes d'action des QTL de résistance sur le cycle et les populations pathogènes, la compréhension des fonctions sous-jacentes et mécanismes associés aux QTL et l'identification de stratégies de gestion des QTL pour améliorer durablement l'efficacité des résistances.

Références Bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahmadi N, Albar L, Pressoir G, Pinel A, Fargette D, Ghesquiere A (2001) Genetic basis and mapping of the resistance to Rice yellow mottle virus. III. Analysis of QTL efficiency in introgressed progenies confirmed the hypothesis of complementary epistasis between two resistance QTLs. *Theor Appl Genet* 103:1084-1092
- Ainsworth GC (1981) Introduction to the history of plant pathology. Cambridge University Press., Cambridge, UK
- Allmaras RR, Fritz VA, Pfleger FL, Copeland SM (2003) Impaired internal drainage and *Aphanomyces euteiches* root rot of pea caused by soil compaction in a fine-textured soil. *Soil Tillage Res* 70:41-52
- Alves-Carvalho S, Aubert G, Carrère S, Cruaud C, Brochot A-L, Jacquin F, Klein A, Martin C, Boucherot K, Kreplak J, da Silva C, Moreau S, Gamas P, Wincker P, Gouzy J, Burstin J (2015) Full-length de novo assembly of RNA-seq data in pea (*Pisum sativum* L.) provides a gene expression atlas and gives insights into root nodulation in this species. *The Plant Journal* 84:1-19
- Ando T, Yamamoto T, Shimizu T, Ma XF, Shomura A, Takeuchi Y, Lin SY, Yano M (2008) Genetic dissection and pyramiding of quantitative traits for panicle architecture by using chromosomal segment substitution lines in rice. *Theor Appl Genet* 116:881-890
- Andrion D, Pilet F, Montarry J, Hafidi M, Corbiere R, Achbani EH, Pelle R, Ellisseche D (2007) Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: Evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology* 97:338-343
- Azzimonti G, Lannou C, Sache I, Goyeau H (2013) Components of quantitative resistance to leaf rust in wheat cultivars: diversity, variability and specificity. *Plant Pathol* 62:970-981
- Baart PGJ, Parlevliet JE, Limburg H (1991) Effects of infection density on the size of barley and wheat leaf rust colonies before and on the size of uredia after the start of sporulation. *J Phytopathol* 131:59-64
- Badis Y, Bonhomme M, Lafitte C, Huguet S, Balzergue S, Dumas B, Jacquet C (2015) Transcriptome analysis highlights preformed defences and signalling pathways controlled by the *prAe1* quantitative trait locus (QTL), conferring partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Pathol* 16:973-986
- Balkunde S, Le HL, Lee HS, Kim DM, Kang JW, Ahn SN (2013) Fine mapping of a QTL for the number of spikelets per panicle by using near-isogenic lines derived from an interspecific cross between *Oryza sativa* and *Oryza minuta*. *Plant Breed* 132:70-76
- Ballini E, Morel JB, Droc G, Price A, Courtois B, Notteghem JL, Tharreau D (2008) A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. *Mol Plant-Microbe Interact* 21:859-868
- Barbary A, Palloix A, Fazari A, Marteu N, Castagnone-Sereno P, Djian-Caporalino C (2014) The plant genetic background affects the efficiency of the pepper major nematode resistance genes *Me1* and *Me3*. *Theor Appl Genet* 127:499-507
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S (2014) lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1.1-7, <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>
- Billard E (2014) Evaluation des traits d'histoires de vie d'un pathogène tellurique in vitro: le potentiel infectieux des oospores constitue-t-il un atout adaptatif pour *Aphanomyces euteiches* ? Stage M1. Master EFCE : Ecologie Fonctionnelle Comportementale et Evolutive, p 20

- Billoud B, Jouanno E, Nehr Z, Carton B, Rolland E, Chenivesse S, Charrier B (2015) Localization of causal locus in the genome of the brown macroalga *Ectocarpus*: NGS-based mapping and positional cloning approaches. *Front Plant Sci* 6(68)
- Blein M, Levrel A, Lemoine J, Gautier V, Chevalier M, Barloy D (2009) *Oculimacula yallundae* lifestyle revisited: relationships between the timing of eyespot symptom appearance, the development of the pathogen and the responses of infected partially resistant wheat plants. *Plant Pathol* 58:1-11
- Bomblies K, Weigel D (2007) Hybrid necrosis: autoimmunity as a potential gene-flow barrier in plant species. *Nat Rev Genet* 8:382-393
- Bonhomme M, Andre O, Badis Y, Ronfort J, Burgarella C, Chantret N, Prosperi JM, Briskine R, Mudge J, Debelle F, Navier H, Miteul H, Hajri A, Baranger A, Tiffin P, Dumas B, Pilet-Nayel ML, Young ND, Jacquet C (2014) High-density genome-wide association mapping implicates an F-box encoding gene in *Medicago truncatula* resistance to *Aphanomyces euteiches*. *New Phytol* 201:1328-1342
- Bordat A, Savoie V, Nicolas M, Salse J, Chauveau A, Bourgeois M, Potier J, Houtin H, Rond C, Murat F, Marget P, Aubert G, Burstin J (2011) Translational Genomics in Legumes Allowed Placing In Silico 5460 Unigenes on the Pea Functional Map and Identified Candidate Genes in *Pisum sativum* L. *G3-Genes Genomes Genet* 1:93-103
- Bourion V, Rizvi SMH, Fournier S, de Larambergue H, Galmiche F, Marget P, Duc G, Burstin J (2010) Genetic dissection of nitrogen nutrition in pea through a QTL approach of root, nodule, and shoot variability. *Theor Appl Genet* 121:71-86
- Boutet G, Alves-Carvalho S, Falque M, Peterlongo P, Lhuillier E, Bouchez O, Lavaud C, Pilet-Nayel ML, Riviere N, Baranger A (2016) SNP discovery and genetic mapping using Genotyping by Sequencing of whole genome genomic DNA from a pea RIL population. *BMC Genomics* accepted
- Boyd LA, Ridout C, O'Sullivan DM, Leach JE, Leung H (2013) Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends Genet* 29:233-240
- Boyardieu J (1991) Produire des grains oléagineux et protéagineux. p 234
- Bradley DJ, Gilbert GS, Parker IM (2003) Susceptibility of clover species to fungal infection: The interaction of leaf surface traits and environment. *Am J Bot* 90:857-864
- Broers LHM (1989) Influence of development stage and host genotype on 3 components of partial resistance to leaf rust in spring wheat. *Euphytica* 44:187-195
- Broers LHM (1997) Components of quantitative resistance to yellow rust in ten spring bread wheat cultivars and their relations with field assessments. *Euphytica* 96:215-223
- Broglie K, Butler K, Butruille M, de Silva Conceicao A, Frey T, Hawk J, Jaqueth J, Jones E, Multani D, Wolters PCC (2006) Polynucleotides and methods for making plants resistant to fungal pathogens. <http://www.google.com/patents/US20060223102>
- Brouwer DJ, St Clair DA (2004) Fine mapping of three quantitative trait loci for late blight resistance in tomato using near isogenic lines (NILs) and sub-NILs. *Theor Appl Genet* 108:628-638
- Brown JKM, Chartrain L, Lasserre-Zuber P, Saintenac C (2015) Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genet Biol* 79:33-41
- Burstin J, Marget P, Huart M, Moessner A, Mangin B, Duchene C, Desprez B, Munier-Jolain N, Duc G (2007) Developmental genes have pleiotropic effects on plant morphology and source capacity, eventually impacting on seed protein content and productivity in pea. *Plant physiology* 144:768-781
- Calenge F, Faure A, Goerre M, Gebhardt C, Van de Weg WE, Parisi L, Durel CE (2004) Quantitative trait loci (QTL) analysis reveals both broad-spectrum and isolate-specific QTL for scab resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 94:370-379

- Calenge F, Van der Linden CG, Van de Weg E, Schouten HJ, Van Arkel G, Denance C, Durel CE (2005) Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. *Theor Appl Genet* 110:660-668
- Calonnec A, Richard B, Andrivon D, Baranger A, Chauvin J, Faivre R, Casadebaig P, Guyader S, Bussière F, Langlais M, Tivoli B (2013) PROJET « ARCHIDEMIO » : Modéliser les interactions entre développement de la plante, architecture du couvert et épidémies de maladies fongiques aériennes, pour une gestion durable des cultures. *Innovations Agronomiques*, pp 201-219
- Cantonwine EG, Culbreath AK, Holbrook CC, Gorbet DW (2008) Disease progress of early leaf spot and components of resistance to *Cercospora arachidicola* and *Cercosporidium personatum* in runner-type peanut cultivars. *Peanut Science* 35:1-10
- Caranta C, Palloix A, Lefebvre V, Daubeze AM (1997) QTLs for a component of partial resistance to cucumber mosaic virus in pepper: Restriction of virus installation in host-cells. *Theor Appl Genet* 94:431-438
- Carrouée B, Moussart A (2011) *Aphanomyces* : quand le froid protège le pois. *Bulletin Semences*, pp 22-24
- Carrouée B, Schneider A, Flénet F, Jeuffroy MH, Nemecek T (2012) Introduction du pois protéagineux dans des rotations à base de céréales à paille et colza : impacts sur les performances économiques et environnementales. *Innovations Agronomiques*, pp 125-142
- Castro P, Piston F, Madrid E, Millan T, Gil J, Rubio J (2010) Development of chickpea near-isogenic lines for fusarium wilt. *Theor Appl Genet* 121:1519-1526
- Chain F, Riault G, Trottet M, Jacquot E (2007) Evaluation of the durability of the Barley yellow dwarf virus-resistant Zhong ZH and TC14 wheat lines. *Eur J Plant Pathol* 117:35-43
- Chin KM, Wolfe MS (1984) Selection on *Erysiphe-graminis* in pure and mixed stands of barley. *Plant Pathol* 33:535-545
- Chung CL, Longfellow JM, Walsh EK, Kerdieh Z, Van Esbroeck G, Balint-Kurti P, Nelson RJ (2010) Resistance loci affecting distinct stages of fungal pathogenesis: use of introgression lines for QTL mapping and characterization in the maize - *Setosphaeria turcica* pathosystem. *BMC Plant Biol* 10(103)
- Chung CL, Poland J, Kump K, Benson J, Longfellow J, Walsh E, Balint-Kurti P, Nelson R (2011) Targeted discovery of quantitative trait loci for resistance to northern leaf blight and other diseases of maize. *Theor Appl Genet* 123:307-326
- Colditz F, Braun HP (2010) *Medicago truncatula* proteomics. *J Proteomics* 73:1974-1985
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142:169-196
- Collard BCY, Mackill DJ (2008) Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philos Trans R Soc B-Biol Sci* 363:557-572
- Collins A, Milbourne D, Ramsay L, Meyer R, Chatot-Balandras C, Oberhagemann P, De Jong W, Gebhardt C, Bonnel E, Waugh R (1999) QTL for field resistance to late blight in potato are strongly correlated with maturity and vigour. *Mol Breed* 5:387-398
- Cook DE, Lee TG, Guo XL, Melito S, Wang K, Bayless AM, Wang JP, Hughes TJ, Willis DK, Clemente TE, Diers BW, Jiang JM, Hudson ME, Bent AF (2012) Copy Number Variation of Multiple Genes at Rhg1 Mediates Nematode Resistance in Soybean. *Science* 338:1206-1209
- Crosson P, Moussart A (2011) *Aphanomyces* - Un test pour cultiver du pois sans crainte. *Perspectives Agricoles*, 378, pp 68-71

- Dalmaïs M, Schmidt J, Le Signor C, Moussy F, Burstin J, Savoie V, Aubert G, Brunaud V, de Oliveira Y, Guichard C, Thompson R, Bendahmane A (2008) UTILLdb, a *Pisum sativum* in silico forward and reverse genetics tool. *Genome Biol* 9(2)
- Dangl JL, Horvath DM, Staskawicz BJ (2013) Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment. *Science* 341:746-751
- Dangl JL, Jones JDG (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-833
- Davis DW, Fritz VA, Pflieger FL, Percich JA, Malvick DK (1995) MN 144, MN 313, and MN 314 - Garden pea lines resistant to root-rot caused by *Aphanomyces-euteiches drechs.* *Hortscience* 30:639-640
- Deacon JW, Saxena G (1998) Germination triggers of zoospore cysts of *Aphanomyces euteiches* and *Phytophthora parasitica*. *Mycol Res* 102:33-41
- Delourme R, Bousset L, Ermel M, Duffe P, Besnard AL, Marquer B, Fudal I, Linglin J, Chadaeuf J, Brun H (2014) Quantitative resistance affects the speed of frequency increase but not the diversity of the virulence alleles overcoming a major resistance gene to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape. *Infect Genet Evol* 27:490-499
- Delourme R, Piel N, Horvais R, Pouilly N, Domin C, Vallee P, Falentin C, Manzanares-Dauleux MJ, Renard M (2008) Molecular and phenotypic characterization of near isogenic lines at QTL for quantitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 117:1055-1067
- Delwiche PA, Grau CR, Holub EB, Perry JB (1987) Characterization of *Aphanomyces euteiches* isolates recovered from alfalfa in wisconsin. *Plant Dis* 71:155-161
- Denby KJ, Kumar P, Kliebenstein DJ (2004) Identification of *Botrytis cinerea* susceptibility loci in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 38:473-486
- Denissen CJM (1991) Influence of race and post infection temperature on 2 components of partial resistance to wheat leaf rust in seedlings of wheat. *Euphytica* 58:13-20
- Desgroux A, L'Anthoëne V, Roux-Duparque M, Rivière JP, Aubert G, Tayeh N, Moussart A, Mangin P, Vetel P, Piriou C, McGee RJ, Coyne C, Burstin J, Baranger A, Manzanares-Dauleux MJ, Bourion V, Pilet-Nayel ML (2016) Genome-wide association mapping of partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in pea. *BMC Genomics* accepted
- Desta ZA, Ortiz R (2014) Genomic selection: genome-wide prediction in plant improvement. *Trends Plant Sci* 19:592-601
- Deulvot C, Charrel H, Marty A, Jacquin F, Donnadiou C, Lejeune-Henaut I, Burstin J, Aubert G (2010) Highly-multiplexed SNP genotyping for genetic mapping and germplasm diversity studies in pea. *BMC Genomics* 11(468)
- Diaz-Lago JE, Stuthman DD, Leonard KJ (2003) Evaluation of components of partial resistance to oat crown rust using digital image analysis. *Plant Dis* 87:667-674
- Didelot D, Chaillet I (1995) Relevance and interest of root disease prediction tests for pea crop in France. In: AEP (ed) 2nd Eur Conf Grain Legumes – Improving production and utilisation of grain legumes. July 9–13th, Copenhagen- Denmark
- Didelot D, Maumené C, Carrouée B (1994) Des nécroses racinaires mieux connues. *Perspectives agricoles*, 188, pp 90-94
- Ding X, Li X, Xiong L (2011) Evaluation of near-isogenic lines for drought resistance QTL and fine mapping of a locus affecting flag leaf width, spikelet number, and root volume in rice. *Theor Appl Genet* 123:815-826
- Djebali N, Jauneau A, Ameline-Torregrosa C, Chardon F, Jaulneau V, Mathe C, Bottin A, Cazaux M, Pilet-Nayel ML, Baranger A, Aouani ME, Esquerre-Tugaye MT, Dumas B, Huguet T, Jacquet C (2009) Partial Resistance of *Medicago truncatula* to *Aphanomyces euteiches* Is Associated with Protection of the Root Stele and Is Controlled by a Major QTL Rich in Proteasome-Related Genes. *Mol Plant-Microbe Interact* 22:1043-1055

- Djian-Caporalino C, Palloix A, Fazari A, Marteu N, Barbary A, Abad P, Sage-Palloix AM, Mateille T, Risso S, Lanza R, Taussig C, Castagnone-Sereno P (2014) Pyramiding, alternating or mixing: comparative performances of deployment strategies of nematode resistance genes to promote plant resistance efficiency and durability. *BMC Plant Biol* 14(53)
- Doerge RW (2002) Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat Rev Genet* 3:43-52
- Dolezel J, Greilhuber J (2010) Nuclear Genome Size: Are We Getting Closer? *Cytom Part A* 77A:635-642
- Domoney C, Knox M, Moreau C, Ambrose M, Palmer S, Smith P, Christodoulou V, Isaac PG, Hegarty M, Blackmore T, Swain M, Ellis N (2013) Exploiting a fast neutron mutant genetic resource in *Pisum sativum* (pea) for functional genomics. *Funct Plant Biol* 40:1261-1270
- Duarte J, Riviere N, Baranger A, Aubert G, Burstin J, Cornet L, Lavaud C, Lejeune-Henaut I, Martinant JP, Pichon JP, Pilet-Nayel ML, Boutet G (2014) Transcriptome sequencing for high throughput SNP development and genetic mapping in Pea. *BMC Genomics* 15(126)
- Duparque M, Boitel C (2001) Common root rot (*Aphanomyces euteiches*) reduces the yield of pea (*Pisum sativum* L.) depending on the resistance level of the genotype. *Proceedings of the 4th European conference on grain legumes, Cracow, Poland*, pp 270-271
- Elshire R, Glaubitz J, Sun Q, Poland J, Kawamoto K, Buckler E, Mitchell S (2011) A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One* 6:e19379
- Eshed Y, Zamir D (1995) An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics* 141:1147-1162
- Fahlgren N, Gehan MA, Baxter I (2015) Lights, camera, action: high-throughput plant phenotyping is ready for a close-up. *Curr Opin Plant Biol* 24:93-99
- FAOSTAT (2015) http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/E.
- Flor HH (1971) Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu Rev Phytopathol* 9:275-296
- Fomeju BF, Falentin C, Lassalle G, Manzanares-Dauleux MJ, Delourme R (2014) Homoeologous duplicated regions are involved in quantitative resistance of *Brassica napus* to stem canker. *BMC Genomics* 15(498)
- Fournet S, Kerlan MC, Renault L, Dantec JP, Rouaux C, Montarry J (2013) Selection of nematodes by resistant plants has implications for local adaptation and cross-virulence. *Plant Pathol* 62:184-193
- Franssen SU, Shrestha RP, Brautigam A, Bornberg-Bauer E, Weber APM (2011) Comprehensive transcriptome analysis of the highly complex *Pisum sativum* genome using next generation sequencing. *BMC Genomics* 12(227)
- Fu DL, Uauy C, Distelfeld A, Blechl A, Epstein L, Chen XM, Sela HA, Fahima T, Dubcovsky J (2009) A Kinase-START Gene Confers Temperature-Dependent Resistance to Wheat Stripe Rust. *Science* 323:1357-1360
- Fukuoka S, Mizobuchi R, Saka N, Ivan S, Matsumoto T, Okuno K, Yano M (2012) A multiple gene complex on rice chromosome 4 is involved in durable resistance to rice blast. *Theor Appl Genet* 125:551-559
- Furbank RT, Tester M (2011) Phenomics - technologies to relieve the phenotyping bottleneck. *Trends Plant Sci* 16:635-644

- Gangneux C, Cannesan MA, Bressan M, Castel L, Moussart A, Vire-Gibouin M, Driouich A, Trinsoutrot-Gattin I, Laval K (2014) A Sensitive Assay for Rapid Detection and Quantification of *Aphanomyces euteiches* in Soil. *Phytopathology* 104:1138-1147
- Garcia-Arenal F, McDonald BA (2003) An analysis of the durability of resistance to plant viruses. *Phytopathology* 93:941-952
- Gaulin E, Jacquet C, Bottin A, Dumas B (2007) Root rot disease of legumes caused by *Aphanomyces euteiches*. *Mol Plant Pathol* 8:539-548
- Gaulin E, Madoui MA, Bottin A, Jacquet C, Mathe C, Couloux A, Wincker P, Dumas B (2008) Transcriptome of *Aphanomyces euteiches*: New Oomycete Putative Pathogenicity Factors and Metabolic Pathways. *PLoS One* 3:e1723
- Gianola D, Fernando RL (1986) Bayesian methods in animal breeding theory. *J Anim Sci* 63:217-244
- Giorgetti C (2013) Part relative de l'architecture et de la résistance partielle dans le contrôle génétique du ralentissement des épidémies d'ascochytose à *Didymella pinodes* chez le pois. Ecole Doctorale : VAS. Agrocampus Ouest. Rennes, p 320
- Goulden MG, Kohm BA, Cruz SS, Kavanagh TA, Baulcombe DC (1993) A feature of the coat protein of potato virus-X affects both induced virus-resistance in potato and viral fitness. *Virology* 197:293-302
- Graves S, Piepho HP, Selzer L, Dorai-Raj S (2012) multcompView: Visualizations of Paired Comparisons. R package version 0.1-5, <http://CRAN.R-project.org/package=multcompView>
- Gravot A, Grillet L, Wagner G, Jubault M, Lariagon C, Baron C, Deleu C, Delourme R, Bouchereau A, Manzanares-Dauleux MJ (2011) Genetic and physiological analysis of the relationship between partial resistance to clubroot and tolerance to trehalose in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 191:1083-1094
- Greenberg JT, Yao N (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* 6:201-211
- Gritton ET (1990) Registration of 5 root-rot resistant germplasm lines of processing pea. *Crop Sci* 30:1166-1167
- Grube RC, Radwanski ER, Jahn M (2000) Comparative genetics of disease resistance within the solanaceae. *Genetics* 155:873-887
- Grunwald NJ, Hoheisel GA (2006) Hierarchical analysis of diversity, selfing, and genetic differentiation in populations of the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* 96:1134-1141
- Gupta PK, Kulwal PL, Jaiswal V (2014) Association Mapping in Crop Plants: Opportunities and Challenges. In: Friedmann T, Dunlap JC, Goodwin SF (eds) *Advances in Genetics*, Vol 85. Elsevier Academic Press Inc, San Diego, pp 109-147
- Habier D, Fernando RL, Dekkers JCM (2007) The impact of genetic relationship information on genome-assisted breeding values. *Genetics* 177:2389-2397
- Habier D, Tetens J, Seefried FR, Lichtner P, Thaller G (2010) The impact of genetic relationship information on genomic breeding values in German Holstein cattle. *Genet Sel Evol* 42:5
- Halekoh U, Højsgaard S (2013) pbkrtest: Parametric Bootstrap and Kenward Roger based methods for mixed model comparison. R package version 0.3-8, <http://CRAN.R-project.org/package=pbkrtest>
- Hamon C, Baranger A, Coyne CJ, McGee RJ, Le Goff I, L'Anthoene V, Esnault R, Riviere JP, Klein A, Mangin P, McPhee KE, Roux-Duparque M, Porter L, Miteul H, Lesne A, Morin G, Onfroy C, Moussart A, Tivoli B, Delourme R, Pilet-Nayel ML (2011) New consistent QTL in pea associated with partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in multiple French and American environments. *Theor Appl Genet* 123:261-281

- Hamon C, Coyne CJ, McGee RJ, Lesne A, Esnault R, Mangin P, Herve M, Le Goff I, Deniot G, Roux-Duparque M, Morin G, McPhee KE, Delourme R, Baranger A, Pilet-Nayel ML (2013) QTL meta-analysis provides a comprehensive view of loci controlling partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in four sources of resistance in pea. *BMC Plant Biol* 13(45)
- Hayes BJ, Bowman PJ, Chamberlain AJ, Goddard ME (2009) Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *J Dairy Sci* 92:433-443
- Hébrard JP (2002) Un "plus" pour l'environnement. *Perspectives Agricoles*, 280, pp 42-43
- Heffner EL, Sorrells ME, Jannink JL (2009) Genomic Selection for Crop Improvement. *Crop Sci* 49:1-12
- Henderson CR (1975) Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. *Biometrics* 31:423-447
- Herrera-Foessel SA, Singh RP, Huerta-Espino J, Crossa J, Djurle A, Yuen J (2007) Evaluation of slow rusting resistance components to leaf rust in CIMMYT durum wheats. *Euphytica* 155:361-369
- Holland JB (2007) Genetic architecture of complex traits in plants. *Curr Opin Plant Biol* 10:156-161
- Hospital F (2005) Selection in backcross programmes. *Philos Trans R Soc B-Biol Sci* 360:1503-1511
- Hospital F (2009) Challenges for effective marker-assisted selection in plants. *Genetica* 136:303-310
- Hospital F, Charcosset A (1997) Marker-assisted introgression of quantitative trait loci. *Genetics* 147:1469-1485
- Hossain S, Bergkvist G, Berglund K, Martensson A, Persson P (2012) *Aphanomyces* pea root rot disease and control with special reference to impact of Brassicaceae cover crops. *Acta Agric Scand Sect B-Soil Plant Sci* 62:477-487
- Hosseini S, Elfstrand M, Heyman F, Jensen DF, Karlsson M (2015) Deciphering common and specific transcriptional immune responses in pea towards the oomycete pathogens *Aphanomyces euteiches* and *Phytophthora pisi*. *BMC Genomics* 16(627)
- Huard-Chauveau C, Perchepied L, Debieu M, Rivas S, Kroj T, Kars I, Bergelson J, Roux F, Roby D (2013) An Atypical Kinase under Balancing Selection Confers Broad-Spectrum Disease Resistance in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 9:e1003766
- Hughes TJ, Grau CR (2007) *Aphanomyces* root rot or common root rot of legumes. *The Plant Health Instructor* DOI: 10.1094/PHI-I-2007-0418-01
- Hurni S, Scheuermann D, Krattinger SG, Kessel B, Wicker T, Herren G, Fitze MN, Breen J, Presterl T, Ouzunova M, Keller B (2015) The maize disease resistance gene *Htn1* against northern corn leaf blight encodes a wall-associated receptor-like kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:8780-8785
- Jacobsen BJ, Hopen HJ (1981) Influence of herbicides on *aphanomyces* root-rot of peas. *Plant Dis* 65:11-16
- Jannink JL, Moreau L, Charmet G, Charcosset A (2009) Overview of QTL detection in plants and tests for synergistic epistatic interactions. *Genetica* 136:225-236
- Jing RC, Vershinin A, Grzebyta J, Shaw P, Smykal P, Marshall D, Ambrose MJ, Ellis THN, Flavell AJ (2010) The genetic diversity and evolution of field pea (*Pisum*) studied by high throughput retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) marker analysis. *BMC Evol Biol* 10 (44)
- John F, Sanford W (2011) An {R} Companion to Applied Regression, second edn. Sage, <http://CRAN.R-project.org/package=car>
- Johnson R (1984) A critical analysis of durable resistance. *Annu Rev Phytopathol* 22:309-330

- Jonas E, de Koning DJ (2013) Does genomic selection have a future in plant breeding? Trends Biotechnol 31:497-504
- Jones FR, Drechsler C (1925) Root rot of peas in the United States caused by *Aphanomyces euteiches*. J Agric Res 30:293-325
- Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. Nature 444:323-329
- Jorge V, Dowkiw A, Faivre-Rampant P, Bastien C (2005) Genetic architecture of qualitative and quantitative *Melampsora larici-populina* leaf rust resistance in hybrid poplar: genetic mapping and QTL detection. New Phytol 167:113-127
- Jorgensen JH (1992) Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. Euphytica 63:141-152
- Kang BC, Yeaman I, Jahn MM (2005) Genetics of plant virus resistance. Annu Rev Phytopathol. Annual Reviews, Palo Alto, pp 581-621
- Kelm C, Ghaffary SMT, Bruehlheide H, Roder MS, Miersch S, Weber WE, Kema GHJ, Saal B (2012) The genetic architecture of seedling resistance to *Septoria tritici* blotch in the winter wheat doubled-haploid population Solitar x Mazurka. Mol Breed 29:813-830
- Kjoller R, Rosendahl S (1998) Enzymatic activity of the mycelium compared with oospore development during infection of pea roots by *Aphanomyces euteiches*. Phytopathology 88:992-996
- Kombrink E, Schmelzer E (2001) The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. Eur J Plant Pathol 107:69-78
- Kou YJ, Wang SP (2010) Broad-spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance. Curr Opin Plant Biol 13:181-185
- Kover PX, Valdar W, Trakalo J, Scarcelli N, Ehrenreich IM, Purugganan MD, Durrant C, Mott R (2009) A Multiparent Advanced Generation Inter-Cross to Fine-Map Quantitative Traits in *Arabidopsis thaliana*. PLoS Genet 5:e1000551
- Kraft JM (1992) Registration of 90-2079, 90-2131, and 90-2322 pea germplasms. Crop Sci 32:1076-1076
- Kraft JM, Boge WL (1994) Development of an antiserum to quantify *Aphanomyces-euteiches* in resistant pea lines. Plant Dis 78:179-183
- Kraft JM, Boge WL (1996) Identification of characteristics associated with resistance to root rot caused by *Aphanomyces euteiches* in pea. Plant Dis 80:1383-1386
- Kuska M, Wahabzada M, Leucker M, Dehne HW, Kersting K, Oerke EC, Steiner U, Mahlein AK (2015) Hyperspectral phenotyping on the microscopic scale: towards automated characterization of plant-pathogen interactions. Plant Methods 11(28)
- Kwon SJ, Brown AF, Hu J, McGee R, Watt C, Kisha T, Timmerman-Vaughan G, Grusak M, McPhee KE, Coyne CJ (2012) Genetic diversity, population structure and genome-wide marker-trait association analysis emphasizing seed nutrients of the USDA pea (*Pisum sativum* L.) core collection. Genes Genom 34:305-320
- Lamari L, Bernier CC (1985) Etiology of seedling blight and root-rot of faba bean (*vicia-faba*) in manitoba. Can J Plant Pathol 7:139-145
- Lavaud C, Lesné A, Piriou C, Le Roy G, Boutet G, Moussart A, Poncet C, Delourme R, Baranger A, Pilet-Nayel ML (2015) Validation of QTL for resistance to *Aphanomyces euteiches* in different pea genetic backgrounds using near-isogenic lines. Theor Appl Genet 128:2273-2288
- Le Van A, Caffier V, Lasserre-Zuber P, Chauveau A, Brunel D, Le Cam B, Durel CE (2013) Differential selection pressures exerted by host resistance quantitative trait loci on a pathogen population: a case study in an apple *Venturia inaequalis* pathosystem. New Phytol 197:899-908

- Lecomte L, Duffe P, Buret M, Servin B, Hospital F, Causse M (2004) Marker-assisted introgression of five QTLs controlling fruit quality traits into three tomato lines revealed interactions between QTLs and genetic backgrounds. *Theor Appl Genet* 109:658-668
- Lecoq H, Moury B, Desbiez C, Palloix A, Pitrat M (2004) Durable virus resistance in plants through conventional approaches: a challenge. *Virus Res* 100:31-39
- Leister D, Ballvora A, Salamini F, Gebhardt C (1996) A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genet* 14:421-429
- Leiva-Mora M, Alvarado-Capo Y, Acosta-Suarez M, Cruz-Martin M, Roque B, Mendez EM (2015) Components of resistance to assess Black Sigatoka response in artificially inoculated *Musa* genotypes. *Revista de Proteccion Vegetal* 30:60-69
- Lejeune-Henaut I, Hanocq E, Bethencourt L, Fontaine V, Delbreil B, Morin J, Petit A, Devaux R, Boilleau M, Stempniak JJ, Thomas M, Laine AL, Foucher F, Baranger A, Burstin J, Rameau C, Giauffret C (2008) The flowering locus *Hr* colocalizes with a major QTL affecting winter frost tolerance in *Pisum sativum* L. *Theor Appl Genet* 116:1105-1116
- Lemarié S, Robert-Seilaniantz A, Lariagon C, Lemoine J, Marnet N, Levrel A, Jubault M, Manzanares-Dauleux MJ, Gravot A (2015) Camalexin contributes to the partial resistance of *Arabidopsis thaliana* to the biotrophic soilborne protist *Plasmodiophora brassicae*. *Front Plant Sci* 6
- Lenth RV, Herve M (2015) lsmeans: Least-Squares Means. R package version 2.18, <http://CRAN.R-project.org/package=lsmeans>
- Leur JAGv, Southwell RJ, Mackie JM (2008) *Aphanomyces* root rot on faba bean in northern NSW. *Austral Plant Disease Notes* 3:8-9
- Levenfors JP, Wikstrom M, Persson L, Gerhardson B (2003) Pathogenicity of *Aphanomyces* spp. from different leguminous crops in Sweden. *Eur J Plant Pathol* 109:535-543
- Li N, Shi J, Wang X, Liu G, Wang H (2014) A combined linkage and regional association mapping validation and fine mapping of two major pleiotropic QTLs for seed weight and silique length in rapeseed (*Brassica napus* L.). *BMC Plant Biol* 14(114)
- Li ZK, Yu SB, Lafitte HR, Huang N, Courtois B, Hittalmani S, Vijayakumar CHM, Liu GF, Wang GC, Shashidhar HE, Zhuang JY, Zheng KL, Singh VP, Sidhu JS, Srivantaneeyakul S, Khush GS (2003) QTL x environment interactions in rice. I. Heading date and plant height. *Theor Appl Genet* 108:141-153
- Liu J, Liu X, Dai L, Wang G (2007) Recent progress in elucidating the structure, function and evolution of disease resistance genes in plants. *J genetics and genomics* 34:765-776
- Liu Y, Zhu X, Zhang SH, Bernardo M, Edwards J, Galbraith DW, Leach J, Zhang GS, Liu B, Leung H (2011) Dissecting quantitative resistance against blast disease using heterogeneous inbred family lines in rice. *Theor Appl Genet* 122:341-353
- Lockwood JL, Ballard JC (1960) Evaluation of pea introductions for resistance to *aphanomyces* and *fusarium* root rots. *Michigan Quarterly Bulletin* 42(4):704-713
- Loridon K, McPhee K, Morin J, Dubreuil P, Pilet-Nayel ML, Aubert G, Rameau C, Baranger A, Coyne C, Lejeune-Henaut I, Burstin J (2005) Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Theor Appl Genet* 111:1022-1031
- Loudet O, Gaudon V, Trubuil A, Daniel-Vedele F (2005) Quantitative trait loci controlling root growth and architecture in *Arabidopsis thaliana* confirmed by heterogeneous inbred family. *Theor Appl Genet* 110:742-753
- Ma J, Yan GJ, Liu CJ (2012) Development of near-isogenic lines for a major QTL on 3BL conferring *Fusarium* crown rot resistance in hexaploid wheat. *Euphytica* 183:147-152
- Mackay TFC, Stone EA, Ayroles JF (2009) The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. *Nat Rev Genet* 10:565-577

- Madoui MA, Gaulin E, Mathe C, Clemente HS, Couloux A, Wincker P, Dumas B (2007) AphanoDB: a genomic resource for *Aphanomyces* pathogens. *BMC Genomics* 8(471)
- Madoui MA, Labadie K, Aury JM, Coyne CJ, Warkentin T, Kreplak J, Lichtenzveig J, Dolezel J, Aubert G, Bergès H, Wincker P, Burstin J (2015) The International Pea Genome Sequencing Project: Sequencing and Assembly Progresses. *PLANT & ANIMAL Genome XXIII*, San Diego, CA
- Mallard S, Negre S, Pouya S, Gaudet D, Lu ZX, Dedryver F (2008) Adult plant resistance-related gene expression in 'Camp Remy' wheat inoculated with *Puccinia striiformis*. *Mol Plant Pathol* 9:213-225
- Malvick DK, Grau CR (2001) Characteristics and frequency of *Aphanomyces euteiches* races 1 and 2 associated with alfalfa in the midwestern United States. *Plant Dis* 85:740-744
- Malvick DK, Grau CR, Percich JA (1998) Characterization of *Aphanomyces euteiches* strains based on pathogenicity tests and random amplified polymorphic DNA analyses. *Mycol Res* 102:465-475
- Malvick DK, Percich JA (1998) Genotypic and pathogenic diversity among pea-infecting strains of *Aphanomyces euteiches* from the central and western United States. *Phytopathology* 88:915-921
- Marcel TC, Gorguet B, Ta MT, Kohutova Z, Vels A, Niks RE (2008) Isolate specificity of quantitative trait loci for partial resistance of barley to *Puccinia hordei* confirmed in mapping populations and near-isogenic lines. *New Phytol* 177:743-755
- Martin GB, Bogdanove AJ, Sessa G (2003) Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu Rev Plant Biol* 54:23-61
- McDonald BA, Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu Rev Phytopathol* 40:349-379
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126:969-980
- Michelmore RW, Christopoulou M, Caldwell KS (2013) Impacts of Resistance Gene Genetics, Function, and Evolution on a Durable Future. *Annu Rev Phytopathol* 51:291-319
- Mishra R, Chaudhary S, Kumar A, Kumar S (2009) Effects of MULTIFOLIATE-PINNA, AFILA, TENDRIL-LESS and UNIFOLIATA genes on leafblade architecture in *Pisum sativum*. *Planta* 230:177-190
- Montarry J, Cartier E, Jacquemond M, Palloix A, Moury B (2012) Virus adaptation to quantitative plant resistance: erosion or breakdown? *J Evol Biol* 25:2242-2252
- Morin J, Mautord J, Sarda X, Canoy AS, Anglares S, Deniot G, Muel F, Lejeune-Hénaut I, Pilet-Nayel ML, Baranger A (2008) Transcript profiling during the *Aphanomyces euteiches* infection in pea (*Pisum sativum*). ANR-Génoplande meeting. Poster, Arles, France
- Morrison RH, Johnson JK, King TH, Davis DW (1971) An evaluation of the excised root tip method for determining the reaction of *Pisum sativum* to *Aphanomyces euteiches*. *J Am Soc Hortic Sci* 96:616-629
- Moussart A (2014) Nuisibilité de la pourriture racinaire due à *Aphanomyces euteiches* en fonction du stade de la plante au moment de l'inoculation. Rapport d'expérimentation UNIP-INRA, p 15
- Moussart A, Even MN, Tivoli B (2008) Reaction of genotypes from several species of grain and forage legumes to infection with a French pea isolate of the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Eur J Plant Pathol* 122:321-333
- Moussart A, Wicker E, Duparque M, Rouxel F (2001) Development of an efficient screening test for pea resistance to *Aphanomyces euteiches*. In: AEP (ed) 4th Eur Conf Grain Legumes. July 8-12th, Cracow, Poland

- Mundt C, Cowger C, Garrett K (2002) Relevance of integrated disease management to resistance durability. *Euphytica* 124:245-252
- Mundt CC (2002) Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. *Annu Rev Phytopathol* 40:381-410
- Mundt CC (2014) Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests. *Infect Genet Evol* 27:446-455
- Mutka AM, Bart RS (2015) Image-based phenotyping of plant disease symptoms. *Front Plant Sci* 5(734)
- Nakaya A, Isobe SN (2012) Will genomic selection be a practical method for plant breeding? *Ann Bot* 110:1303-1316
- Navara S, Smith KP (2014) Using near-isogenic barley lines to validate deoxynivalenol (DON) QTL previously identified through association analysis. *Theor Appl Genet* 127:633-645
- Negussie T, Pretorius ZA, Bender CM (2005) Components of rust resistance in lentil. *Euphytica* 142:55-64
- Ngu MS, Thomson MJ, Bhuiyan MAR, Ho C, Wickneswari R (2014) Fine mapping of a grain weight quantitative trait locus, qGW6, using near isogenic lines derived from *Oryza rufipogon* IRGC105491 and *Oryza sativa* cultivar MR219. *Genet Mol Res* 13:9477-9488
- Niks RE, Qi X, Marcel TC (2015) Quantitative Resistance to Biotrophic Filamentous Plant Pathogens: Concepts, Misconceptions, and Mechanisms. *Annu Rev Phytopathol* 53:445-470
- Nyamsuren O, Colditz F, Rosendahl S, Tamasloukht M, Bekel T, Meyer F, Kuester H, Franken P, Krajinski F (2003) Transcriptional profiling of *Medicago truncatula* roots after infection with *Aphanomyces euteiches* (oomycota) identifies novel genes upregulated during this pathogenic interaction. *Physiol Mol Plant Pathol* 63:17-26
- Onfroy C, Tivoli B, Grünwald NJ, Pilet-Nayel ML, Baranger A, Andrivon D, Moussart A (2015, soumis) Aggressiveness and virulence of *Aphanomyces euteiches* isolates recovered from pea nurseries in the United States and France. *Plant Pathol* (soumis)
- Palloix A, Ayme V, Moury B (2009) Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytol* 183:190-199
- Pan QL, Liu YS, Budai-Hadrian O, Sela M, Carmel-Goren L, Zamir D, Fluhr R (2000) Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: Tomato and Arabidopsis. *Genetics* 155:309-322
- Papavizas GC, Ayers WA (1974) *Aphanomyces* species and their root diseases in pea and sugarbeet. A review. *US Dep Agric Tech Bull* 1485:158
- Pariaud B, Ravigne V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, Lannou C (2009a) Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathol* 58:409-424
- Pariaud B, Robert C, Goyeau H, Lannou C (2009b) Aggressiveness Components and Adaptation to a Host Cultivar in Wheat Leaf Rust. *Phytopathology* 99:869-878
- Parlevliet JE (1979) Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annu Rev Phytopathol* 17:203-222
- Pascual L, Albert E, Sauvage C, Duangjit J, Bouchet J-P, Bitton F, Desplat N, Brunel D, Le Paslier M-C, Ranc N, Bruguier L, Chauchard B, Verschave P, Causse M (2016) Dissecting quantitative trait variation in the resequencing era: complementarity of bi-parental, multi-parental and association panels. *Plant sci* 242:120-130

- Paterson AH, Lander ES, Hewitt JD, Peterson S, Lincoln SE, Tanksley SD (1988) Resolution of quantitative traits into mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335:721-726
- Peressotti E, Wiedemann-Merdinoglu S, Delmotte F, Bellin D, Di Gaspero G, Testolin R, Merdinoglu D, Mestre P (2010) Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. *BMC Plant Biol* 10(147)
- Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, Nielsen HB, Lacy M, Austin MJ, Parker JE, Sharma SB, Klessig DF, Martienssen R, Mattsson O, Jensen AB, Mundy J (2000) Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 103:1111-1120
- Pfender WF, Hagedorn DJ (1983) Disease progress and yield loss in aphanomyces root-rot of peas. *Phytopathology* 73:1109-1113
- Pfender WF, Malvick DK, Pfleger FL, Grau CR (2001) Aphanomyces root rot. In: Press neA (ed) *Compendium of pea diseases and pests*, St. Paul, pp 9-13
- Pilet-Nayel ML, Bonhomme M, André O, Hajri A, Boutet G, Badis Y, Chantret N, Ronfort J, Young ND, Baranger A, Jacquet C (2014) Translational genomics for resistance to *Aphanomyces euteiches* between *Medicago truncatula* and pea. 6th International Food Legumes Research Conference (IFLRC VI) and 7th International Conference on Legume Genetics and Genomics (ICLGG VII). Communication, Saskatoon, Canada
- Pilet-Nayel ML, Muehlbauer FJ, McGee RJ, Kraft JM, Baranger A, Coyne CJ (2002) Quantitative trait loci for partial resistance to Aphanomyces root rot in pea. *Theor Appl Genet* 106:28-39
- Pilet-Nayel ML, Muehlbauer FJ, McGee RJ, Kraft JM, Baranger A, Coyne CJ (2005) Consistent quantitative trait loci in pea for partial resistance to *Aphanomyces euteiches* isolates from the United States and France. *Phytopathology* 95:1287-1293
- Pociecha E, Plazek A, Rapacz M, Niemczyk E, Zwierzykowski Z (2010) Photosynthetic Activity and Soluble Carbohydrate Content Induced by the Cold Acclimation Affect Frost Tolerance and Resistance to Microdochium nivale of Androgenic Festulolium Genotypes. *J Agron Crop Sci* 196:48-54
- Poland JA, Balint-Kurti PJ, Wisser RJ, Pratt RC, Nelson RJ (2009) Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends Plant Sci* 14:21-29
- Poland JA, Brown PJ, Sorrells ME, Jannink J-L (2012) Development of High-Density Genetic Maps for Barley and Wheat Using a Novel Two-Enzyme Genotyping-by-Sequencing Approach. *PLoS One* 7:e32253
- Pottorff M, Roberts PA, Close TJ, Lonardi S, Wanamaker S, Ehlers JD (2014) Identification of candidate genes and molecular markers for heat-induced brown discoloration of seed coats in cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *BMC Genomics* 15(328)
- Prashar A, Yildiz J, McNicol JW, Bryan GJ, Jones HG (2013) Infra-red Thermography for High Throughput Field Phenotyping in *Solanum tuberosum*. *PLoS One* 8:e65816
- Pueppke SG, Etten HDV (1974) Pisatin accumulation and lesion development in peas infected with *Aphanomyces euteiches*, *Fusarium solani* f.sp. pisi or *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 64:1433-1440
- Qiu DY, Xiao J, Ding XH, Xiong M, Cai M, Cao CL, Li XH, Xu CG, Wang SP (2007) OsWRKY13 mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate- and jasmonate-dependent signaling. *Mol Plant-Microbe Interact* 20:492-499
- Quillévéré-Hamard A, Pilet-Nayel ML, Onfroy C, Moussart A, Andrivon D, Baranger A, Le May C (2014) Role of legume species successions on *Aphanomyces euteiches* population structure. 6th International Food Legumes Research Conference (IFLRC VI) and 7th International Conference on Legume Genetics and Genomics (ICLGG VII). Poster, Saskatoon, Canada

- R Development Core Team (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Retrieved from <http://www.R-project.org>
- Ranc N (2010) Analyse du polymorphisme moléculaire de gènes de composantes de la qualité des fruits dans les ressources génétiques sauvages et cultivées de tomate ; recherche d'associations gènes/QTL. Ecole Doctorale : SIBAGHE. ENSA, Montpellier, p 275
- Resende RS, Rodrigues FA, Soares JM, Casela CR (2009) Influence of silicon on some components of resistance to anthracnose in susceptible and resistant sorghum lines. *Eur J Plant Pathol* 124:533-541
- Richardson KL, Vales MI, Kling JG, Mundt CC, Hayes PM (2006) Pyramiding and dissecting disease resistance QTL to barley stripe rust. *Theor Appl Genet* 113:485-495
- Rodeva R, Ivanova B, Stoyanova Z, Stefanov D, Maneva S (2009) Resistance Components to *Septoria lycopersici* in Tomato. *ISHS II International Symposium on Tomato Diseases* 808:45-49
- Roux-Duparque M, Boitel C, Decaux B, Moussart A, Alamie J, Pilet-Nayel ML, Muel F (2004) Breeding peas for resistance to *Aphanomyces* root rot : current main outputs of three breeding programmes. 5th Eur Conf Grain Legumes. June 7-11th, Dijon, France
- Rufty RC, Main CE (1989) Components of partial resistance to blue mold in 6 tobacco genotypes under controlled environmental-conditions. *Phytopathology* 79:606-609
- Sakr N (2009) Components of quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus*). *J Plant Protection Res* 49:297-301
- Sapoukhina N, Durel CE, Le Cam B (2009) Spatial deployment of gene-for-gene resistance governs evolution and spread of pathogen populations. *Theor Ecol* 2:229-238
- Sartori V (2002) Les atouts agronomiques du pois. *Perspectives Agricoles*, 280, p 40
- Sauvage H, Moussart A, Bois F, Tivoli B, Barray S, Laval K (2007) Development of a molecular method to detect and quantify *Aphanomyces euteiches* in soil. *FEMS Microbiol Lett* 273:64-69
- Schmalenbach I, Korber N, Pillen K (2008) Selecting a set of wild barley introgression lines and verification of QTL effects for resistance to powdery mildew and leaf rust. *Theor Appl Genet* 117:1093-1106
- Schneider A, Huyghe C (2015) Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables. *Quae*, p 512
- Shang H, Grau CR, Peters RD (2000) Oospore germination of *Aphanomyces euteiches* in root exudates and on the rhizoplanes of crop plants. *Plant Dis* 84:994-998
- Shehata MA, Davis DW, Pfleger FL (1983) Breeding for resistance to *Aphanomyces euteiches* root-rot and *rhizoctonia solani* stem rot in peas. *J Am Soc Hortic Sci* 108:1080-1085
- Shi JQ, Li RY, Qiu D, Jiang CC, Long Y, Morgan C, Bancroft I, Zhao JY, Meng JL (2009) Unraveling the Complex Trait of Crop Yield With Quantitative Trait Loci Mapping in *Brassica napus*. *Genetics* 182:851-861
- Smolinska U, Knudsen GR, Morra MJ, Borek V (1997) Inhibition of *Aphanomyces euteiches* f. sp. *pisi* by volatiles produced by hydrolysis of *Brassica napus* seed meal. *Plant Dis* 81:288-292
- Smýkal P, Aubert G, Burstin J, Coyne CJ, Ellis NTH, Flavell AJ, Ford R, Hýbl M, Macas J, Neumann P, McPhee KE, Redden RJ, Rubiales D, Weller JL, Warkentin TD (2012) Pea (*Pisum sativum* L.) in the Genomic Era. *Agronomy* 2:74-115
- Smykal P, Kenicer G, Flavell AJ, Corander J, Kosterin O, Redden RJ, Ford R, Coyne CJ, Maxted N, Ambrose MJ, Ellis NTH (2011) Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genet Resour-Charact Util* 9:4-18

- St Clair DA (2010) Quantitative Disease Resistance and Quantitative Resistance Loci in Breeding. *Annu Rev Phytopathol* 48:247-268
- Steele KA, Virk DS, Kumar R, Prasad SC, Witcombe JR (2007) Field evaluation of upland rice lines selected for QTLs controlling root traits. *Field Crop Res* 101:180-186
- Stewart EL, McDonald BA (2014) Measuring Quantitative Virulence in the Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici* Using High-Throughput Automated Image Analysis. *Phytopathology* 104:985-992
- Stokstad E (2007) Plant pathology - Deadly wheat fungus threatens world's breadbaskets. *Science* 315:1786-1787
- Takeda S, Matsuoka M (2008) Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. *Nat Rev Genet* 9:444-457
- Talukder ZI, Tharreau D, Price AH (2004) Quantitative trait loci analysis suggests that partial resistance to rice blast is mostly determined by race-specific interactions. *New Phytol* 162:197-209
- Tameling WIL, Takken FLW (2008) Resistance proteins: scouts of the plant innate immune system. *Eur J Plant Pathol* 121:243-255
- Tayeh N, Aluome C, Falque M, Jacquin F, Klein A, Chauveau A, Bérard A, Houtin H, Rond C, Kreplak J, Boucherot K, Martin C, Baranger A, Pilet-Nayel ML, Warkentin TD, Brunel D, Marget P, Le Paslier M-C, Aubert G, Burstin J (2015) The GenoPea Infinium® BeadChip allowed the construction of a high-density highresolution gene-based consensus genetic map in pea and provided an overview on the genome organization. *Plant J* 84:1257-1273
- Tofte JE, Smith RR, Grau CR (1992) Reaction of red-clover to *Aphanomyces euteiches*. *Plant Dis* 76:39-42
- Topp CN, Iyer-Pascuzzi AS, Anderson JT, Lee C-R, Zurek PR, Symonova O, Zheng Y, Bucksch A, Mileyko Y, Galkovskyi T, Moore BT, Harer J, Edelsbrunner H, Mitchell-Olds T, Weitz JS, Benfey PN (2013) 3D phenotyping and quantitative trait locus mapping identify core regions of the rice genome controlling root architecture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:1695-1704
- UNIP (2015) <http://www.unip.fr/pois/atouts-et-contraintes.html>.
- van den Bosch F, Gilligan CA (2003) Measures of durability of resistance. *Phytopathology* 93:616-625
- van der Hoorn RAL, Kamoun S (2008) From Guard to Decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* 20:2009-2017
- Van der plank JE (1968) Disease resistance in plants. Accademic Press, New-York, 206
- Vandemark G, Grunwald NJ (2005) Use of real-time PCR to examine the relationship between disease severity in pea and *Aphanomyces euteiches* DNA content in roots. *Eur J Plant Pathol* 111:309-316
- Vandemark GJ, Barker BM, Gritsenko MA (2002) Quantifying *Aphanomyces euteiches* in alfalfa with a fluorescent polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 92:265-272
- Vandemark GJ, Kraft JM, Larsen RC, Gritsenko MA, Boge WL (2000) A PCR-based assay by sequence-characterized DNA markers for the identification and detection of *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* 90:1137-1144
- Veyrieras JB, Goffinet B, Charcosset A (2007) MetaQTL: a package of new computational methods for the meta-analysis of QTL mapping experiments. *BMC Bioinformatics* 8(49)
- Viljanen-Rollinson SLH, Gaunt RE, Frampton CMA, Falloon RE, McNeil DL (1998) Components of quantitative resistance to powdery mildew (*Erysiphe pisi*) in pea (*Pisum sativum*). *Plant Pathol* 47:137-147

- Villareal L, Lannou C (2000) Selection for increased spore efficacy by host genetic background in a wheat powdery mildew population. *Phytopathology* 90:1300-1306
- Wang DL, Zhu J, Li ZK, Paterson AH (1999) Mapping QTLs with epistatic effects and QTLxenvironment interactions by mixed linear model approaches. *Theor Appl Genet* 99:1255-1264
- Wang GL, Ruan DL, Song WY, Sideris S, Chen LL, Pi LY, Zhang SP, Zhang Z, Fauquet C, Gaut BS, Whalen MC, Ronald PC (1998) Xa21D encodes a receptor-like molecule with a leucine-rich repeat domain that determines race-specific recognition and is subject to adaptive evolution. *Plant Cell* 10:765-779
- Wang LJ, Wang YJ, Wang Z, Marcel TC, Niks RE, Qi XQ (2010) The phenotypic expression of QTLs for partial resistance to barley leaf rust during plant development. *Theor Appl Genet* 121:857-864
- Wang Q, Liu YQ, He J, Zheng XM, Hu JL, Liu YL, Dai HM, Zhang YX, Wang BX, Wu WX, Gao H, Zhang YH, Tao XR, Deng HF, Yuan DY, Jiang L, Zhang X, Guo XP, Cheng XN, Wu CY, Wang HY, Yuan LP, Wan JM (2014) STV11 encodes a sulphotransferase and confers durable resistance to rice stripe virus. *Nat Commun* 5(4768)
- Warkentin TD (2015) Pea. *Handbook of Plant Breeding*, Springer-Verlag New York, 10
- Weeden NF, McGee R, Grau CR, Muehlbauer FJ (2000) A gene influencing tolerance to common root rot is located on linkage group IV. *Pisum Genetics* 32:53-55
- Wicker E (2001) Diversité des populations françaises d'*Aphanomyces euteiches* Drechs, agent de la pourriture racinaire du pois : variabilité pathogène et moléculaire. ENSAR, Rennes, p 178
- Wicker E, Hulle M, Rouxel F (2001) Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* from pea in France. *Plant Pathol* 50:433-442
- Wicker E, Moussart A, Duparque M, Rouxel F (2003) Further contributions to the development of a differential set of pea cultivars (*Pisum sativum*) to investigate the virulence of isolates of *Aphanomyces euteiches*. *Eur J Plant Pathol* 109:47-60
- Wicker E, Rouxel F (2001) Specific behaviour of French *Aphanomyces euteiches* Drechs. Populations for virulence and aggressiveness on pea, related to isolates from Europe, America and New Zealand. *Eur J Plant Pathol* 107:919-929
- Wilde F, Schon CC, Korzun V, Ebmeyer E, Schmolke M, Hartl L, Miedaner T (2008) Marker-based introduction of three quantitative-trait loci conferring resistance to *Fusarium* head blight into an independent elite winter wheat breeding population. *Theor Appl Genet* 117:29-35
- Wilfert L, Schmid-Hempel P (2008) The genetic architecture of susceptibility to parasites. *BMC Evol Biol* 8(187)
- Wilocquet L, Jumel S, Lemarchand E (2007) Spatio-temporal development of pea root rot disease through secondary infections during a crop cycle. *J Phytopathol* 155:623-632
- Yadav SK (2010) Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agron Sustain Dev* 30:515-527
- Yang W, Guo Z, Huang C, Duan L, Chen G, Jiang N, Fang W, Feng H, Xie W, Lian X, Wang G, Luo Q, Zhang Q, Liu Q, Xiong L (2014) Combining high-throughput phenotyping and genome-wide association studies to reveal natural genetic variation in rice. *Nat Commun* 5(5087)
- Yu JM, Buckler ES (2006) Genetic association mapping and genome organization of maize. *Curr Opin Biotechnol* 17:155-160
- Yu JM, Holland JB, McMullen MD, Buckler ES (2008) Genetic design and statistical power of nested association mapping in maize. *Genetics* 178:539-551
- Yu JM, Pressoir G, Briggs WH, Bi IV, Yamasaki M, Doebley JF, McMullen MD, Gaut BS, Nielsen DM, Holland JB, Kresovich S, Buckler ES (2006) A unified mixed-model

- method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genet* 38:203-208
- Yu XM, Griffith M, Wiseman SB (2001) Ethylene induces antifreeze activity in winter rye leaves. *Plant Physiol* 126:1232-1240
- Zenbayashi-Sawata K, Fukuoka S, Katagiri S, Fujisawa M, Matsumoto T, Ashizawa T, Koizumi S (2007) Genetic and physical mapping of the partial resistance gene, Pi34, to blast in rice. *Phytopathology* 97:598-602
- Zhang J, Li X, Jiang G, Xu Y, He Y (2006) Pyramiding of Xa7 and Xa21 for the improvement of disease resistance to bacterial blight in hybrid rice. *Plant Breed* 125:600-605
- Zhao X, Han YP, Li YH, Liu DY, Sun MM, Zhao Y, Lv CM, Li DM, Yang ZJ, Huang L, Teng WL, Qiu LJ, Zheng HK, Li WB (2015) Loci and candidate gene identification for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean (*Glycine max* L. Merr.) via association and linkage maps. *Plant J* 82:245-255
- Zheng ZY, Abu Qamar S, Chen ZX, Mengiste T (2006) Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J* 48:592-605
- Zhong ZZ, Wu WX, Wang HJ, Chen LP, Liu LL, Wang CM, Zhao ZG, Lu GW, Gao H, Wei XJ, Yu CY, Chen MJ, Shen YY, Zhang X, Cheng ZJ, Wang JL, Jiang L, Wan JM (2014) Fine mapping of a minor-effect QTL, DTH12, controlling heading date in rice by up-regulation of florigen genes under long-day conditions. *Mol Breed* 34:311-322
- Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JDG, Felix G, Boller T (2004) Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature* 428:764-767
- Zong XX, Redden RJ, Liu QC, Wang SM, Guan JP, Liu J, Xu YH, Liu XJ, Gu J, Yan L, Ades P, Ford R (2009) Analysis of a diverse global *Pisum* sp collection and comparison to a Chinese local *P. sativum* collection with microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 118:193-204

Annexes

SOMMAIRE DES ANNEXES

Annexes chapitre II	129
ANNEXE II.1.....	129
ANNEXE II.2.....	131
ANNEXE II.3.....	133
Annexes chapitre III	135
ANNEXE III.1.....	135
ANNEXE III.2.....	137
ANNEXE III.3.....	138
Annexe chapitre IV	140
ANNEXE IV.1	140
ANNEXE IV.2	143
Annexe chapitre V.....	145
ANNEXE V.1	145

ANNEXE II.1

Supplementary data file 1: Description of 157 NILs homozygous at zero to three of the seven main *Aphanomyces* resistance QTL, selected in the MAB program : NIL codes, pedigrees, morphological traits, QTL introgressions and genotyping data in and outside QTL regions.

[illegible]

ANNEXE II.1 (suite)

[illegible]

White, dark gray, light gray and red colours indicate, for each NIL, non polymorphic markers, markers for which donor parents initially carried alleles of the reference recipient parents outside the target QTL, markers showing return to the recipient genome during the MAB process and markers showing presence of donor fragments, respectively.

a- NILs are coded as follows: NIL "NIL set number" - "0 for zero QTL or QTL number(s)" "sister NIL letter (a or b)"

b- NIL pedigree, indicating plant numbers selected at each generation in the MAB program.

c- Position and confidence interval of target fragments at the seven main QTL were estimated from Hamon et al. (2013)

d-SSR and eSSR markers used during the MAB scheme for NILs production. Marker positions are shown in Fig. 2. Markers indicated in red were previously associated to the main QTL for resistance to *A. entomophagae* (Hamon et al. 2013) and were used to control introgressions at each MAB generation

e- The annealing temperatures for amplification of each locus

f- Percentages of Recipient Genome Content in each homozygous NIL at the fixity generation, calculated by the ratio between the number of markers outside the target QTL for which NILs are homozygous for the recipient alleles and the total number of polymorphic markers tested outside the target QTL.

ANNEXE II.2

Supplementary data file 2: Disease Severity (DS) LSMeans and standard deviations obtained for each NIL with the RB84 and Ae109 strains

NIL Code	LSMeans DS RB84	sd RB84	LSMeans DS Ae109	sd Ae109
NIL1-0a	3,75	0,140	3,20	0,178
NIL1-0b	3,69	0,143	3,36	0,202
NIL1-4.5a	3,33	0,146	1,11	0,178
NIL1-4.5b	3,74	0,143	1,16	0,208
NIL2-0a	3,30	0,140	3,05	0,176
NIL2-0b	3,15	0,140	2,85	0,176
NIL2-4.5a	3,30	0,140	1,33	0,180
NIL2-4.5b	3,31	0,143	1,81	0,180
NIL3-0a	3,46	0,143	3,30	0,176
NIL3-0b	3,85	0,140	3,35	0,176
NIL3-4.5a	3,70	0,140	1,75	0,176
NIL3-4.5b	3,55	0,140	1,60	0,176
NIL4-0a	3,30	0,140	3,50	0,180
NIL4-0b	3,50	0,140	2,85	0,176
NIL4-5.1a	2,78	0,146	2,95	0,180
NIL4-5.1b	2,95	0,143	3,02	0,180
NIL4-7.6a	2,85	0,140	3,15	0,176
NIL4-7.6b	2,55	0,140	3,35	0,176
NIL4-5.1/7.6a	1,95	0,143	3,05	0,178
NIL4-5.1/7.6b	1,84	0,146	2,99	0,180
NIL5-0b	3,30	0,140	2,65	0,176
NIL5-0a	3,25	0,140	2,70	0,176
NIL5-5.1b	3,37	0,143	2,94	0,180
NIL5-5.1a	3,01	0,153	3,10	0,178
NIL5-7.6b	1,95	0,140	2,10	0,176
NIL5-7.6a	2,05	0,143	3,05	0,176
NIL5-5.1/7.6b	2,00	0,143	2,20	0,176
NIL5-5.1/7.6a	2,16	0,143	2,46	0,180
NIL6-0a	3,65	0,140	3,25	0,176
NIL6-0b	3,65	0,140	3,05	0,176
NIL6-5.1a	3,77	0,146	3,33	0,180
NIL6-5.1b	3,43	0,143	3,27	0,178
NIL6-7.6a	2,95	0,140	2,70	0,176
NIL6-7.6b	2,68	0,143	3,10	0,176
NIL6-5.1/7.6a	3,04	0,143	3,15	0,176
NIL6-5.1/7.6b	2,95	0,140	3,30	0,176
NIL16-0a	3,30	0,140	2,90	0,176
NIL16-0b	3,55	0,140	2,85	0,176
NIL16-5.1a	3,35	0,140	2,85	0,176
NIL16-5.1b	3,32	0,143	2,70	0,176
NIL16-7.6a	2,45	0,140	3,15	0,176
NIL16-7.6b	2,60	0,140	2,55	0,176
NIL16-5.1/7.6a	2,20	0,140	2,95	0,176
NIL16-5.1/7.6b	2,83	0,143	2,65	0,176
NIL7-0a	3,75	0,140	3,47	0,178
NIL7-0b	3,73	0,143	3,35	0,176
NIL7-4.1a	3,72	0,146	3,30	0,176
NIL7-4.1b	3,74	0,143	3,16	0,180
NIL7-7.6a	2,99	0,149	3,00	0,176
NIL7-7.6b	2,56	0,146	3,01	0,180
NIL7-4.1/7.6a	2,07	0,153	3,29	0,205
NIL7-4.1/7.6b	2,38	0,153	3,24	0,182
NIL8-0b	3,11	0,143	2,89	0,182
NIL8-0a	3,05	0,140	3,00	0,176
NIL8-4.1b	3,45	0,140	2,95	0,176
NIL8-4.1a	3,25	0,140	2,72	0,182
NIL8-7.6b	1,95	0,140	1,95	0,176
NIL8-7.6a	2,25	0,140	1,90	0,176
NIL8-4.1/7.6b	2,35	0,140	2,95	0,176
NIL8-4.1/7.6a	2,35	0,140	2,70	0,176
NIL9-0a	3,45	0,140	3,05	0,176
NIL9-0b	3,53	0,143	3,25	0,176
NIL9-4.1a	3,70	0,140	3,41	0,178
NIL9-4.1b	3,65	0,140	3,25	0,176
NIL9-7.6a	3,05	0,140	3,30	0,176
NIL9-7.6b	3,05	0,140	3,10	0,176
NIL9-4.1/7.6a	2,65	0,140	3,05	0,176
NIL9-4.1/7.6b	2,80	0,140	3,25	0,176
NIL10-0a	3,95	0,140	3,45	0,176
NIL10-0b	3,63	0,143	3,31	0,178
NIL10-0c	3,53	0,143	3,17	0,182
NIL10-0d	3,94	0,149	3,20	0,178
NIL10-1.2a	3,74	0,157	3,31	0,182
NIL10-1.2b	3,94	0,143	3,58	0,182
NIL10-2.2a	3,49	0,149	2,74	0,178
NIL10-2.2b	3,75	0,140	3,00	0,178
NIL10-2.2c	3,35	0,140	3,20	0,176
NIL10-2.2d	3,64	0,153	3,27	0,186
NIL10-3.1a	3,85	0,140	3,50	0,176

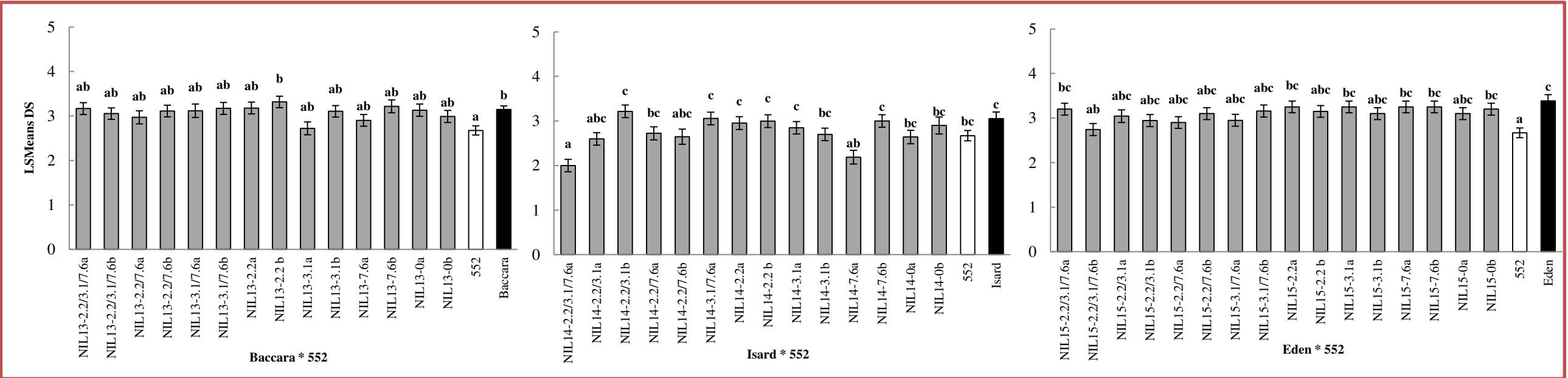
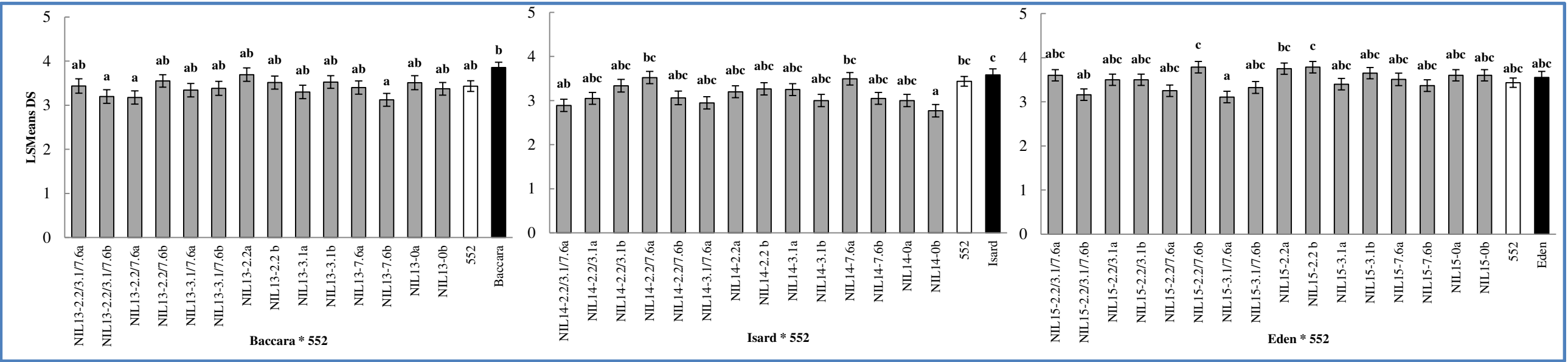
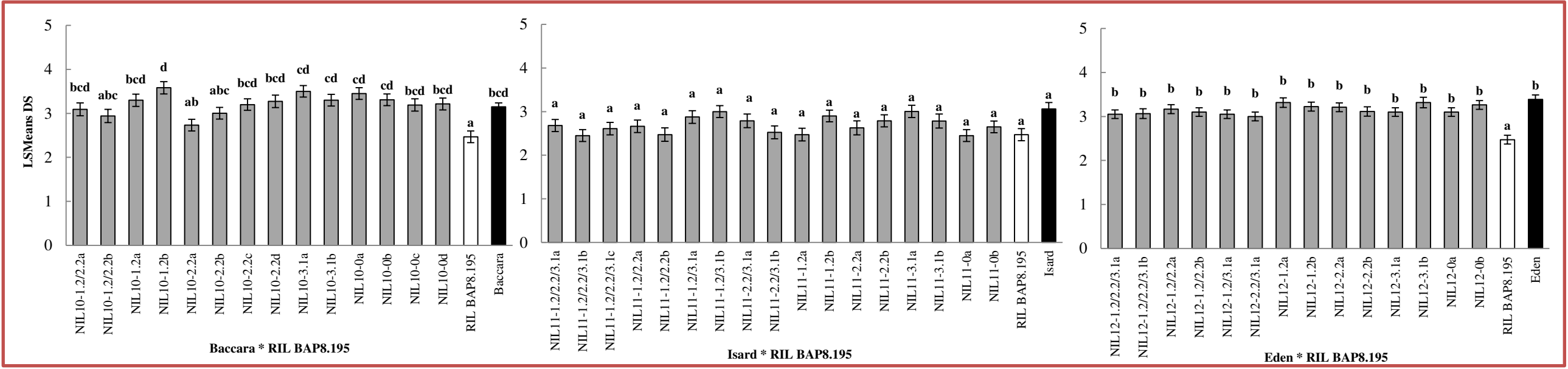
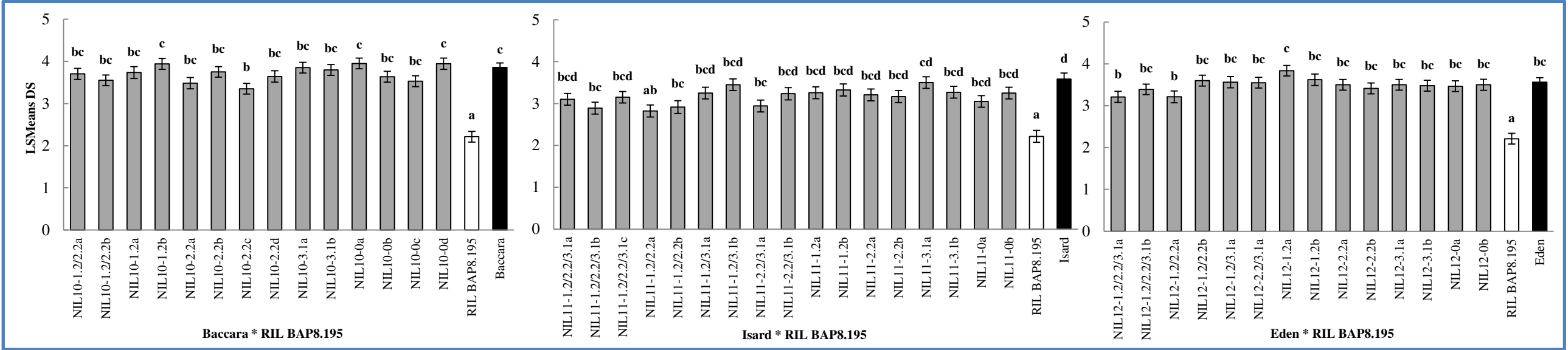
ANNEXE II.2 (suite)

NIL Code	LSMeans DS RB84	sd RB84	LSMeans DS Ae109	sd Ae109
NIL10-3.1b	3,80	0,143	3,30	0,176
NIL10-1.2/2.2a	3,70	0,146	3,12	0,202
NIL10-1.2/2.2b	3,55	0,140	2,91	0,205
NIL11-0a	3,05	0,140	2,45	0,176
NIL11-0b	3,25	0,140	2,65	0,176
NIL11-1.2a	3,26	0,143	2,50	0,182
NIL11-1.2b	3,31	0,146	2,90	0,176
NIL11-2.2a	3,20	0,143	2,68	0,205
NIL11-2.2b	3,16	0,146	2,78	0,178
NIL11-3.1a	3,50	0,140	2,99	0,178
NIL11-3.1b	3,27	0,143	2,77	0,205
NIL11-1.2/2.2a	2,81	0,146	2,67	0,180
NIL11-1.2/2.2b	2,90	0,153	2,47	0,187
NIL11-1.2/3.1a	3,25	0,140	2,89	0,182
NIL11-1.2/3.1b	3,45	0,140	3,00	0,176
NIL11-2.2/3.1a	2,95	0,143	2,79	0,202
NIL11-2.2/3.1b	3,23	0,146	2,51	0,182
NIL11-1.2/2.2/3.1a	3,10	0,140	2,69	0,178
NIL11-1.2/2.2/3.1b	2,89	0,143	2,45	0,176
NIL11-1.2/2.2/3.1c	3,15	0,140	2,61	0,180
NIL12-0a	3,46	0,143	3,10	0,176
NIL12-0b	3,50	0,140	3,25	0,178
NIL12-1.2a	3,83	0,146	3,36	0,185
NIL12-1.2b	3,61	0,161	3,22	0,180
NIL12-2.2a	3,50	0,140	3,20	0,178
NIL12-2.2b	3,41	0,143	3,10	0,184
NIL12-3.1a	3,50	0,140	3,10	0,176
NIL12-3.1b	3,48	0,143	3,31	0,208
NIL12-1.2/2.2a	3,21	0,143	3,16	0,180
NIL12-1.2/2.2b	3,60	0,140	3,10	0,176
NIL12-1.2/3.1a	3,56	0,146	3,06	0,178
NIL12-2.2/3.1a	3,55	0,140	3,00	0,178
NIL12-1.2/2.2/3.1a	3,21	0,143	3,05	0,178
NIL12-1.2/2.2/3.1b	3,39	0,146	3,07	0,187
NIL13-0a	3,51	0,157	3,15	0,182
NIL13-0b	3,37	0,143	2,96	0,182
NIL13-2.2a	3,69	0,149	3,18	0,180
NIL13-2.2 b	3,52	0,146	3,32	0,178
NIL13-3.1a	3,30	0,149	2,67	0,188
NIL13-3.1b	3,52	0,143	3,11	0,178
NIL13-7.6a	3,40	0,149	2,88	0,178
NIL13-7.6b	3,12	0,146	3,26	0,189
NIL13-2.2/7.6a	3,17	0,149	2,96	0,202
NIL13-2.2/7.6b	3,55	0,140	3,11	0,178
NIL13-3.1/7.6a	3,34	0,149	3,13	0,205
NIL13-3.1/7.6b	3,38	0,157	3,16	0,180
NIL13-2.2/3.1/7.6a	3,43	0,162	3,16	0,180
NIL13-2.2/3.1/7.6b	3,20	0,153	3,05	0,178
NIL14-0a	3,00	0,143	2,63	0,182
NIL14-0b	2,76	0,146	2,91	0,247
NIL14-2.2a	3,20	0,140	2,95	0,178
NIL14-2.2 b	3,27	0,143	3,00	0,178
NIL14-3.1a	3,25	0,140	2,85	0,176
NIL14-3.1b	3,00	0,143	2,70	0,176
NIL14-7.6a	3,49	0,146	2,19	0,184
NIL14-7.6b	3,05	0,140	3,00	0,176
NIL14-2.2/3.1a	3,05	0,140	2,60	0,176
NIL14-2.2/3.1b	3,34	0,146	3,21	0,178
NIL14-2.2/7.6a	3,52	0,143	2,70	0,180
NIL14-2.2/7.6b	3,06	0,157	2,71	0,210
NIL14-3.1/7.6a	2,95	0,143	3,04	0,178
NIL14-2.2/3.1/7.6a	2,89	0,143	2,00	0,176
NIL15-0a	3,60	0,140	3,10	0,176
NIL15-0b	3,60	0,140	3,20	0,176
NIL15-2.2a	3,75	0,140	3,25	0,176
NIL15-2.2 b	3,79	0,143	3,15	0,176
NIL15-3.1a	3,40	0,140	3,25	0,176
NIL15-3.1b	3,65	0,140	3,10	0,176
NIL15-7.6a	3,51	0,153	3,25	0,176
NIL15-7.6b	3,36	0,143	3,25	0,176
NIL15-2.2/3.1a	3,50	0,140	3,05	0,184
NIL15-2.2/3.1b	3,50	0,140	2,95	0,178
NIL15-2.2/7.6a	3,25	0,140	2,90	0,176
NIL15-2.2/7.6b	3,79	0,143	3,10	0,176
NIL15-3.1/7.6a	3,11	0,143	2,95	0,176
NIL15-3.1/7.6b	3,33	0,146	3,16	0,178
NIL15-2.2/3.1/7.6a	3,60	0,140	3,20	0,176
NIL15-2.2/3.1/7.6b	3,17	0,143	2,76	0,178

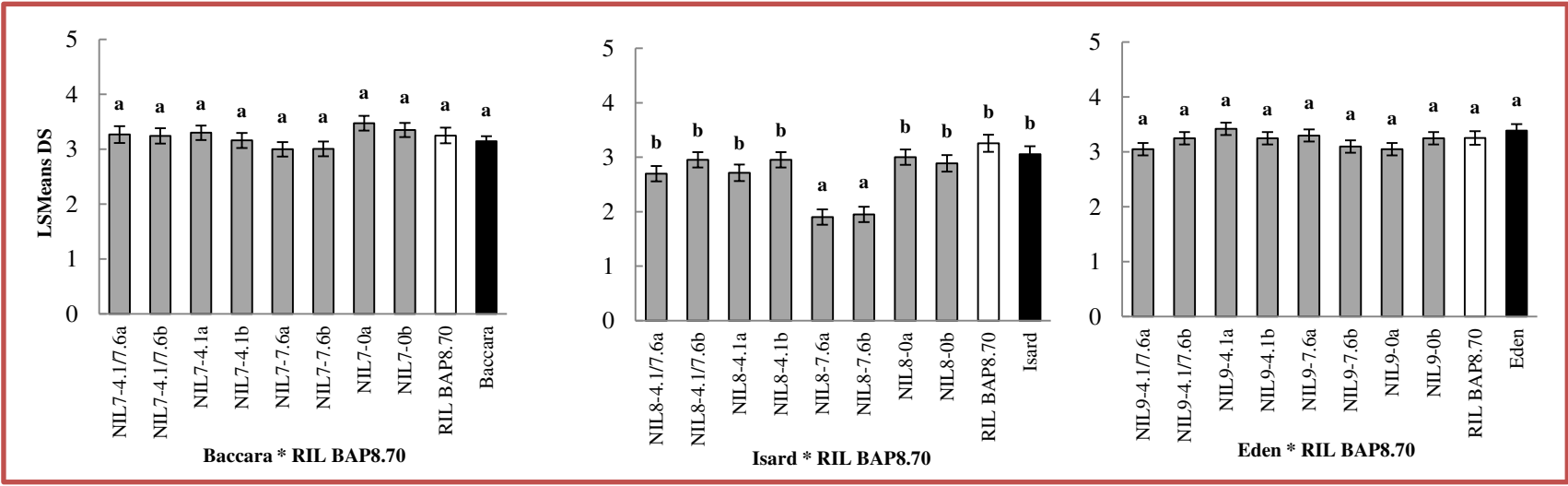
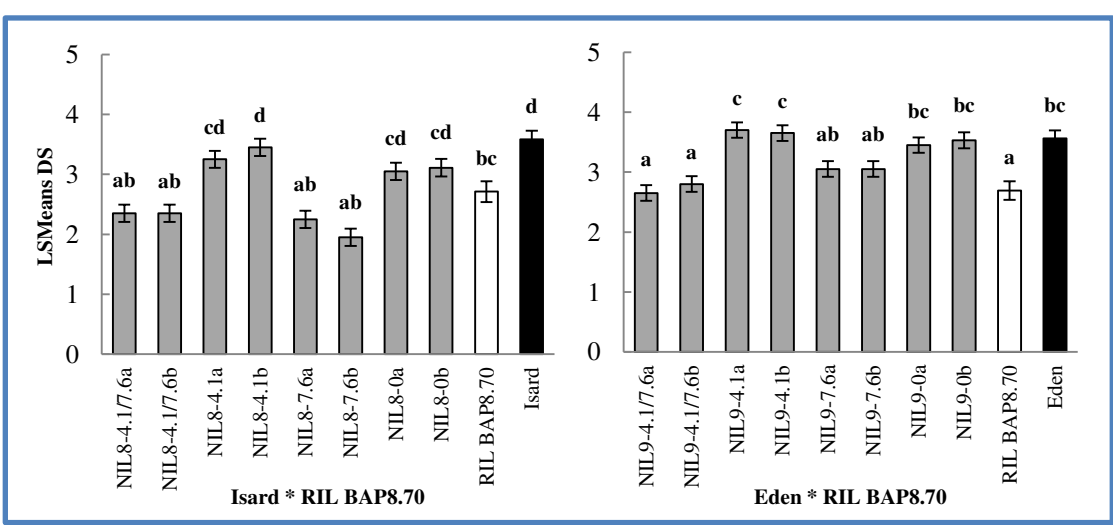
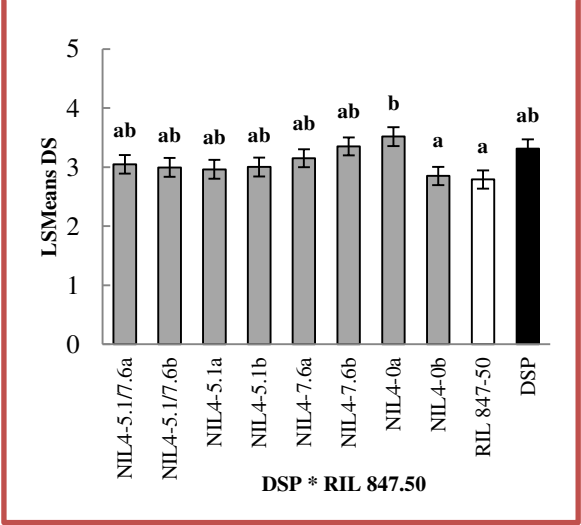
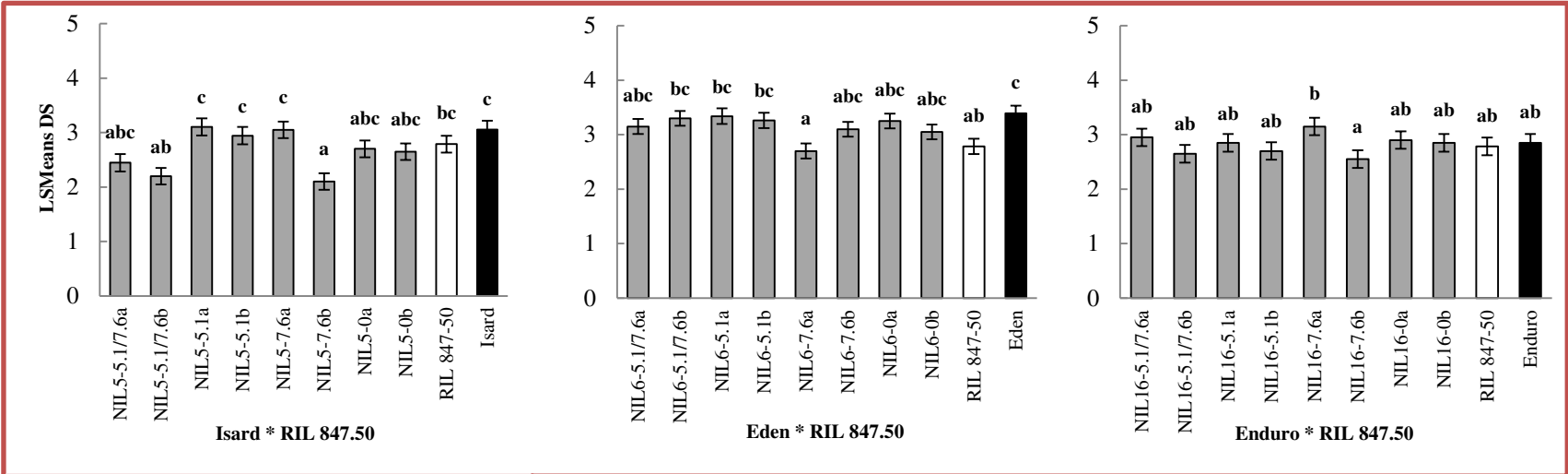
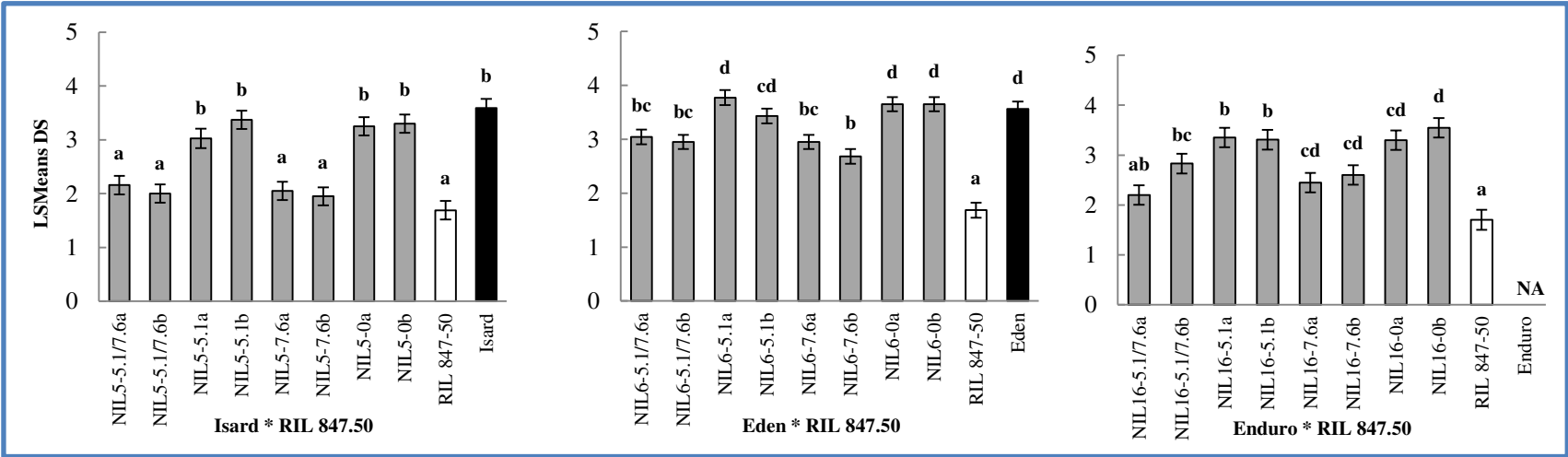
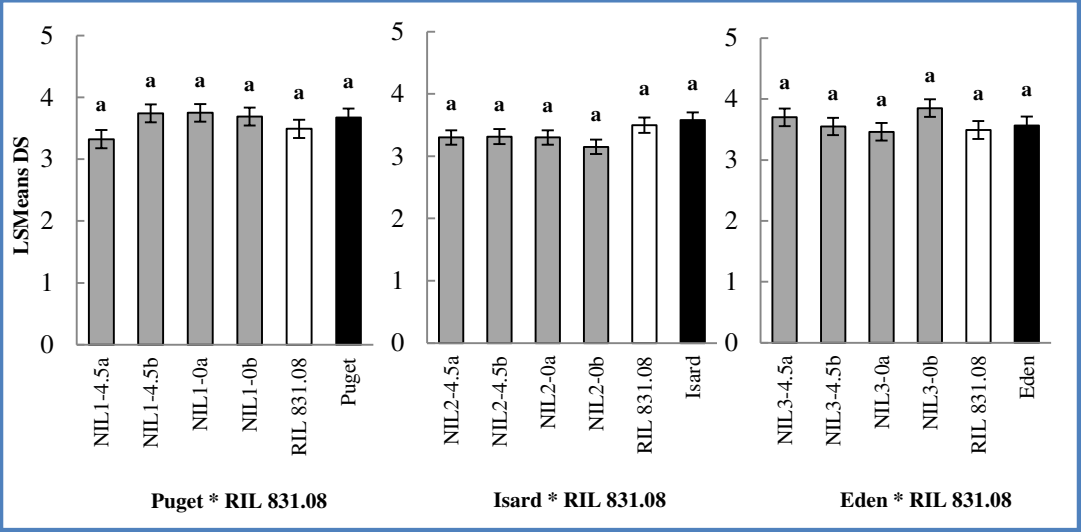
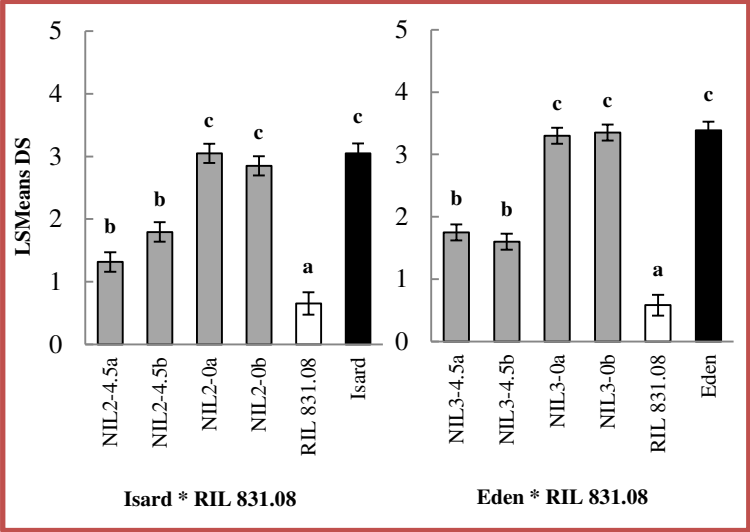
ANNEXE II.3

Supplementary data file 3: Comparison of Disease Severity (DS) between NILs and parental lines in each NIL set, with the RB84 (blue boxes) and Ae109 (red boxes) strains.

Histograms for the three NIL sets from DSP x RIL 847.50, Baccara x RIL BAP8.70 and Puget x RIL 831.08 are shown in Fig.3. White, black, and gray bars indicate DS LSMean values of the donor parent, the reipient parent and the NIL set, respectively. Bars represent standard errors. LSMean values labeled with different letters differ significantly (P < 0.05, Tukey-HSD). NA: Not Available data.



ANNEXE II.3 (suite)



ANNEXE III.1

Liste des NILs évaluées pour la résistance à *A. euteiches* au champ sur un réseau multi-local de parcelles infestées.

		2014						2015							
		Réseau international France-USA			Réseau GSP			Réseau international France-USA			Réseau GSP				
Lieu Expérimentation	Riec-sur- Belon, FR	Dijon- Epoisses, FR	Pullman, USA	KWS- Momont	Unisigma	RAGT2n	Limagrain	Riec-sur- Belon, FR	Dijon- Epoisses, FR	Pullman, USA	KWS- Momont	Unisigma	RAGT2n	Limagrain	
Code NIL															
NIL1-0a	x	x	Problème : Pas de semis en 2014	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL1-0b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL1-4.5a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL1-4.5b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL2-0a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL2-0b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL2-4.5a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL2-4.5b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL3-0a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL3-0b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL3-4.5a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL3-4.5b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL4-0a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL4-0b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL4-5.1a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL4-5.1b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL4-7.6a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL4-7.6b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL4-5.1/7.6a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL4-5.1/7.6b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL5-0a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL5-0b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL5-5.1a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL5-5.1b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL5-7.6a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL5-7.6b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL5-5.1/7.6a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL5-5.1/7.6b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL6-0a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL6-0b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL6-5.1a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL6-5.1b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL6-7.6a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL6-7.6b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL6-5.1/7.6a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL6-5.1/7.6b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL16-0a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL16-0b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL16-5.1a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL16-5.1b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL16-7.6a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL16-7.6b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL16-5.1/7.6a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL16-5.1/7.6b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL7-0a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL7-0b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL7-4.1a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL7-4.1b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL7-7.6a	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL7-7.6b	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL7-4.1/7.6a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL7-4.1/7.6b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL8-0a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL8-0b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL8-4.1a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL8-4.1b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL8-7.6a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL8-7.6b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL8-4.1/7.6a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL8-4.1/7.6b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL9-0a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL9-0b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL9-4.1a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL9-4.1b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL9-7.6a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL9-7.6b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL9-4.1/7.6a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL9-4.1/7.6b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL10-0a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL10-0b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL10-0c	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL10-0d	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL10-1.2a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL10-1.2b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
NIL10-2.2a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	

Problème : Pas de semis en 2014

ANNEXE III.1 (suite)

NIL10-2.2b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL10-2.2c	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL10-2.2d	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL10-3.1a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL10-3.1b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL10-1.2/2.2a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL10-1.2/2.2b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL11-0a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL11-0b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL11-1.2a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL11-1.2b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL11-2.2a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL11-2.2b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL11-3.1a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL11-3.1b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL11-1.2/2.2a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL11-1.2/2.2b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL11-1.2/3.1a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL11-1.2/3.1b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL11-2.2/3.1a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL11-2.2/3.1b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL11-1.2/2.2/3.1a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL11-1.2/2.2/3.1b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL11-1.2/2.2/3.1c	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL12-0a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL12-0b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL12-1.2a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL12-1.2b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL12-2.2a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL12-2.2b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL12-3.1a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL12-3.1b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL12-1.2/2.2a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL12-1.2/2.2b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL12-1.2/3.1a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL12-2.2/3.1a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL12-1.2/2.2/3.1a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL12-1.2/2.2/3.1b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL13-0a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL13-0b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL13-2.2a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL13-2.2 b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL13-3.1a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL13-3.1b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL13-7.6a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL13-7.6b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL13-2.2/7.6a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL13-2.2/7.6b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL13-3.1/7.6a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL13-3.1/7.6b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL13-2.2/3.1/7.6a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL13-2.2/3.1/7.6b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL14-0a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL14-0b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL14-2.2a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL14-2.2 b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL14-3.1a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL14-3.1b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL14-7.6a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL14-7.6b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL14-2.2/3.1a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL14-2.2/3.1b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL14-2.2/7.6a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL14-2.2/7.6b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL14-3.1/7.6a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL14-2.2/3.1/7.6a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL15-0a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL15-0b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL15-2.2a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL15-2.2 b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL15-3.1a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL15-3.1b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL15-7.6a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL15-7.6b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL15-2.2/3.1a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL15-2.2/3.1b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL15-2.2/7.6a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL15-2.2/7.6b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL15-3.1/7.6a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL15-3.1/7.6b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL15-2.2/3.1/7.6a	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
NIL15-2.2/3.1/7.6b	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Total des NILs testées	157	154	141	141	142	142	157	157	153	157	157	157	157

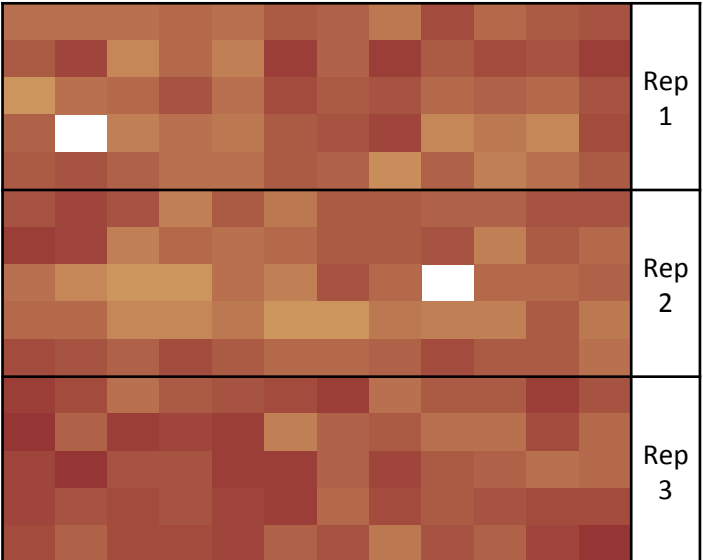
ANNEXE III.2

Cartographie du potentiel infectieux du sol dans chaque expérimentation à partir des notations de sévérité de la maladie (DS) obtenues sur les racines du témoin adjacent Solara présent toutes les quatre lignées.

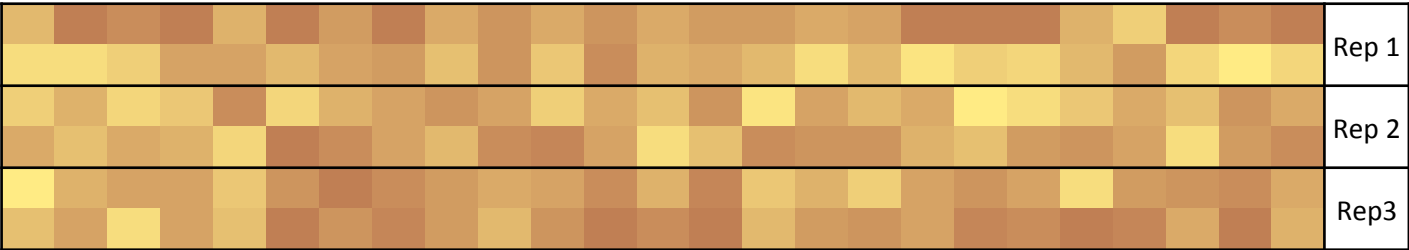
Riec-sur-Belon 2014



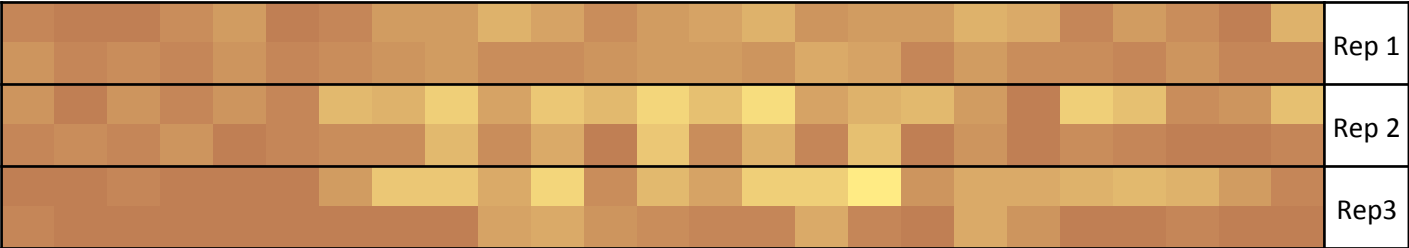
Riec-sur-Belon 2015



Dijon-Epoisses 2014



Dijon-Epoisses 2015



ANNEXE III.3

Sévérité de la maladie sur racines (DS LSMeans) et écarts types (sd) obtenus pour chaque NIL dans chacune et sur l'ensemble des quatre expérimentations conduites sur deux lieux et deux années.

NIL Code	DS LSMeans Riec 2014	sd Riec 2014	DS LSMeans Riec 2015	sd Riec 2015	DS LSMeans Dijon 2014	sd Dijon 2014	DS LSMeans Dijon 2015	sd Dijon 2015	DS LSMeans Generale	sd Generale
NIL1-0a	4,1	0,1	4,3	0,2	3,7	0,2	3,3	0,2	3,8	0,4
NIL1-0b	4,4	0,1	4,1	0,2	3,5	0,2	3,7	0,2	4,0	0,4
NIL1-4.5a	4,2	0,1	4,5	0,2	2,8	0,2	3,7	0,2	3,8	0,4
NIL1-4.5b	4,2	0,1	4,1	0,2	3,6	0,2	3,8	0,2	3,9	0,4
NIL2-0a	4,3	0,1	3,7	0,3	3,1	0,2	3,5	0,2	3,7	0,4
NIL2-0b	4,2	0,1	3,5	0,3	3,1	0,2	3,4	0,2	3,5	0,4
NIL2-4.5a	4,1	0,1	3,8	0,3	3,1	0,2	3,4	0,2	3,6	0,4
NIL2-4.5b	4,3	0,1	3,7	0,3	2,9	0,2	3,3	0,2	3,6	0,4
NIL3-0a	4,7	0,1	4,6	0,2	2,9	0,2	3,8	0,2	4,0	0,6
NIL3-0b	4,8	0,1	4,6	0,2	3,2	0,2	3,7	0,2	4,1	0,6
NIL3-4.5a	4,7	0,1	4,4	0,2	3,6	0,2	3,4	0,2	4,0	0,6
NIL3-4.5b	4,8	0,1	4,4	0,2	3,4	0,2	3,7	0,2	4,1	0,6
NIL4-0a	4,5	0,1	3,7	0,2	2,5	0,2	3,2	0,2	3,5	0,5
NIL4-0b	4,3	0,1	4,4	0,2	2,5	0,2	3,4	0,2	3,7	0,5
NIL4-5.1a	3,7	0,1	3,8	0,2	2,7	0,2	3,5	0,2	3,4	0,5
NIL4-5.1b	3,8	0,1	3,8	0,2	2,3	0,2	3,6	0,2	3,4	0,5
NIL4-7.6a	4,1	0,1	3,7	0,2	2,2	0,2	3,2	0,2	3,3	0,5
NIL4-7.6b	3,2	0,1	4,0	0,2	2,3	0,2	2,8	0,2	3,1	0,5
NIL4-5.1/7.6a	3,4	0,1	3,4	0,2	2,1	0,2	3,1	0,2	3,0	0,5
NIL4-5.1/7.6b	2,8	0,1	3,4	0,2	2,2	0,2	2,9	0,2	2,9	0,5
NIL5-0b	4,0	0,1	3,9	0,3	2,9	0,2	3,6	0,2	3,6	0,4
NIL5-0a	4,0	0,1	3,6	0,3	3,1	0,2	3,4	0,2	3,5	0,4
NIL5-5.1b	4,0	0,1	3,7	0,3	2,8	0,2	3,1	0,2	3,4	0,4
NIL5-5.1a	4,1	0,1	3,8	0,3	2,7	0,2	3,4	0,2	3,5	0,4
NIL5-7.6b	4,1	0,1	3,4	0,3	2,6	0,2	3,3	0,2	3,4	0,4
NIL5-7.6a	3,9	0,1	3,4	0,3	2,5	0,2	3,0	0,2	3,2	0,4
NIL5-5.1/7.6b	4,2	0,1	3,6	0,3	2,6	0,2	3,3	0,2	3,4	0,4
NIL5-5.1/7.6a	4,3	0,1	3,2	0,3	2,5	0,2	3,1	0,2	3,3	0,4
NIL6-0a	4,8	0,1	4,6	0,2	3,3	0,2	3,7	0,1	4,1	0,6
NIL6-0b	4,9	0,1	4,6	0,2	3,5	0,2	3,6	0,1	4,2	0,6
NIL6-5.1a	4,7	0,1	4,5	0,2	3,5	0,2	4,0	0,1	4,2	0,6
NIL6-5.1b	4,8	0,1	4,8	0,2	3,1	0,2	3,5	0,1	4,1	0,6
NIL6-7.6a	4,7	0,1	4,2	0,2	2,3	0,2	3,3	0,1	3,6	0,6
NIL6-7.6b	4,4	0,1	4,2	0,2	2,6	0,2	3,4	0,1	3,7	0,6
NIL6-5.1/7.6a	4,4	0,1	3,9	0,2	3,5	0,2	3,2	0,1	3,8	0,6
NIL6-5.1/7.6b	4,5	0,1	4,0	0,2	2,3	0,2	3,6	0,1	3,6	0,6
NIL16-0a	4,2	0,1	3,6	0,3	2,7	0,2	3,7	0,1	3,6	0,4
NIL16-0b	4,4	0,1	3,8	0,3	2,4	0,2	3,8	0,1	3,6	0,4
NIL16-5.1a	4,6	0,1	3,6	0,3	3,2	0,2	3,9	0,1	3,8	0,4
NIL16-5.1b	4,4	0,1	4,1	0,3	3,1	0,2	3,5	0,1	3,8	0,4
NIL16-7.6a	4,4	0,1	3,6	0,3	2,6	0,2	3,9	0,1	3,6	0,4
NIL16-7.6b	4,4	0,1	3,6	0,3	3,0	0,2	3,5	0,1	3,6	0,4
NIL16-5.1/7.6a	4,4	0,1	3,9	0,3	3,2	0,2	3,7	0,1	3,8	0,4
NIL16-5.1/7.6b	4,4	0,1	3,7	0,3	3,1	0,2	3,4	0,1	3,7	0,4
NIL7-0a	4,3	0,1	3,9	0,2	3,6	0,2	3,7	0,1	3,9	0,5
NIL7-0b	4,7	0,1	4,4	0,2	3,0	0,2	3,6	0,1	3,9	0,5
NIL7-4.1a	4,2	0,1	4,1	0,2	2,6	0,2	3,4	0,1	3,6	0,5
NIL7-4.1b	4,6	0,1	4,2	0,2	3,1	0,2	3,6	0,1	3,9	0,5
NIL7-7.6a	4,3	0,1	4,2	0,2	2,6	0,2	3,3	0,1	3,6	0,5
NIL7-7.6b	4,3	0,1	3,9	0,2	2,6	0,2	3,1	0,1	3,5	0,5
NIL7-4.1/7.6a	4,1	0,1	3,8	0,2	2,6	0,2	3,3	0,1	3,5	0,5
NIL7-4.1/7.6b	4,3	0,1	3,8	0,2	2,8	0,2	2,9	0,1	3,5	0,5
NIL8-0b	4,4	0,2	4,0	0,2	2,9	0,2	3,3	0,2	3,7	0,5
NIL8-0a	4,4	0,2	3,8	0,2	2,8	0,2	3,4	0,2	3,6	0,5
NIL8-4.1b	3,8	0,2	3,9	0,2	2,4	0,2	3,2	0,2	3,3	0,5
NIL8-4.1a	4,3	0,2	4,0	0,2	2,8	0,2	2,8	0,2	3,5	0,5
NIL8-7.6b	3,7	0,2	3,9	0,2	2,5	0,2	3,2	0,2	3,3	0,5
NIL8-7.6a	4,1	0,2	3,7	0,2	3,1	0,2	3,3	0,2	3,6	0,5
NIL8-4.1/7.6b	4,1	0,2	3,1	0,2	2,7	0,2	3,4	0,2	3,3	0,5
NIL8-4.1/7.6a	3,9	0,2	3,4	0,2	2,5	0,2	3,2	0,2	3,3	0,5
NIL9-0a	4,8	0,1	4,6	0,1	3,5	0,2	3,6	0,1	4,1	0,6
NIL9-0b	4,7	0,1	4,3	0,1	2,8	0,2	3,7	0,1	3,9	0,6
NIL9-4.1a	4,8	0,1	4,6	0,1	2,8	0,2	3,8	0,1	4,0	0,6
NIL9-4.1b	4,6	0,1	4,3	0,1	3,5	0,2	3,7	0,1	4,0	0,6
NIL9-7.6a	4,6	0,1	4,1	0,1	2,6	0,2	3,1	0,1	3,6	0,6
NIL9-7.6b	4,3	0,1	3,9	0,1	3,2	0,2	2,9	0,1	3,6	0,6
NIL9-4.1/7.6a	4,2	0,1	4,4	0,1	2,9	0,2	3,7	0,1	3,8	0,6
NIL9-4.1/7.6b	4,6	0,1	4,3	0,1	2,7	0,2	3,1	0,1	3,7	0,6
NIL10-0a	4,7	0,1	4,5	0,1	3,3	0,2	3,5	0,1	4,0	0,5
NIL10-0b	4,3	0,1	4,0	0,1	2,6	0,2	3,6	0,1	3,6	0,5
NIL10-0c	4,5	0,1	4,0	0,1	3,6	0,2	3,6	0,1	3,9	0,5
NIL10-0d	4,3	0,1	4,5	0,1	3,0	0,2	4,0	0,1	3,9	0,5
NIL10-1.2a	4,1	0,1	4,5	0,1	3,0	0,2	3,5	0,1	3,8	0,5
NIL10-1.2b	4,2	0,1	4,2	0,1	3,1	0,2	3,2	0,1	3,7	0,5
NIL10-2.2a	4,4	0,1	4,0	0,1	3,4	0,2	3,6	0,1	3,9	0,5
NIL10-2.2b	4,3	0,1	4,0	0,1	3,5	0,2	3,4	0,1	3,8	0,5

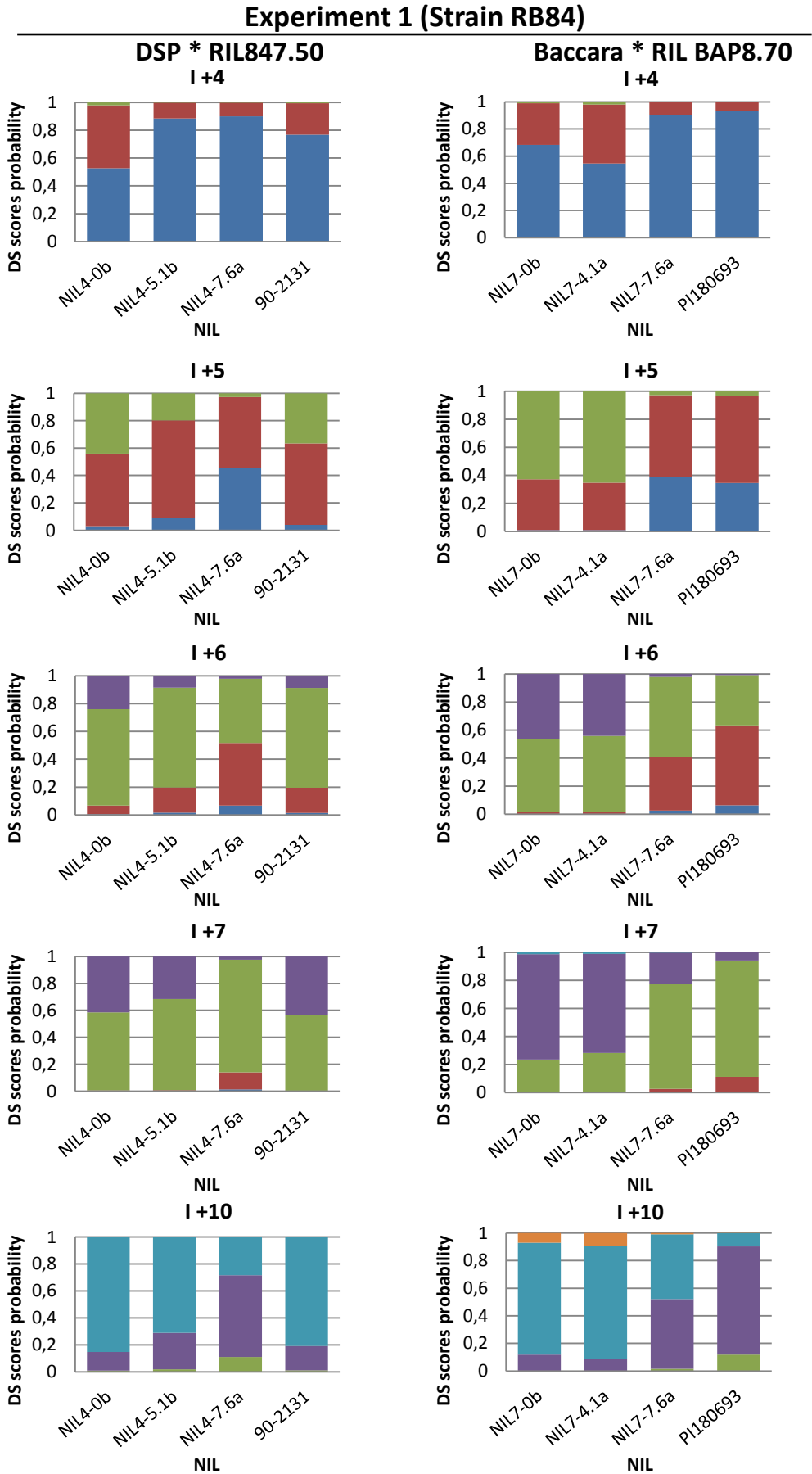
ANNEXE III.3 (suite)

NIL10-2.2c	4,5	0,1	4,2	0,1	3,5	0,2	3,5	0,1	3,9	0,5
NIL10-2.2d	4,4	0,1	4,5	0,1	3,4	0,2	3,5	0,1	4,0	0,5
NIL10-3.1a	4,4	0,1	4,3	0,1	3,2	0,2	3,6	0,1	3,9	0,5
NIL10-3.1b	4,6	0,1	4,7	0,1	3,0	0,2	3,6	0,1	4,0	0,5
NIL10-1.2/2.2a	4,1	0,1	4,2	0,1	3,1	0,2	3,0	0,1	3,6	0,5
NIL10-1.2/2.2b	4,3	0,1	4,5	0,1	3,3	0,2	3,7	0,1	3,9	0,5
NIL11-0a	4,3	0,1	4,1	0,1	2,8	0,2	3,3	0,2	3,6	0,5
NIL11-0b	4,1	0,1	4,4	0,1	NA	NA	3,2	0,2	3,6	0,5
NIL11-1.2a	3,9	0,1	4,0	0,1	2,8	0,2	3,1	0,2	3,4	0,5
NIL11-1.2b	4,1	0,1	4,0	0,1	3,1	0,2	3,5	0,2	3,7	0,5
NIL11-2.2a	3,8	0,1	3,3	0,1	NA	NA	3,3	0,2	3,2	0,5
NIL11-2.2b	4,2	0,1	3,8	0,1	2,6	0,2	3,5	0,2	3,5	0,5
NIL11-3.1a	4,6	0,1	3,8	0,1	3,1	0,2	3,6	0,2	3,8	0,5
NIL11-3.1b	4,3	0,1	4,0	0,1	3,3	0,2	3,4	0,2	3,8	0,5
NIL11-1.2/2.2a	4,0	0,1	4,0	0,1	2,4	0,2	3,1	0,2	3,4	0,5
NIL11-1.2/2.2b	4,1	0,1	3,6	0,1	2,0	0,2	3,3	0,2	3,3	0,5
NIL11-1.2/3.1a	4,2	0,1	4,0	0,1	2,6	0,2	3,3	0,2	3,5	0,5
NIL11-1.2/3.1b	4,0	0,1	3,9	0,1	2,4	0,2	3,6	0,2	3,5	0,5
NIL11-2.2/3.1a	4,2	0,1	3,9	0,1	2,5	0,2	3,4	0,2	3,5	0,5
NIL11-2.2/3.1b	4,4	0,1	4,2	0,1	2,8	0,2	3,5	0,2	3,7	0,5
NIL11-1.2/2.2/3.1a	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NIL11-1.2/2.2/3.1b	3,9	0,1	4,0	0,1	2,4	0,2	3,1	0,2	3,4	0,5
NIL11-1.2/2.2/3.1c	4,0	0,1	3,8	0,1	2,6	0,2	3,0	0,2	3,3	0,5
NIL12-0a	4,5	0,1	4,5	0,1	3,2	0,2	4,0	0,1	4,0	0,6
NIL12-0b	4,6	0,1	4,9	0,1	3,2	0,2	3,7	0,1	4,1	0,6
NIL12-1.2a	4,4	0,1	4,6	0,1	3,2	0,2	3,8	0,1	4,0	0,6
NIL12-1.2b	4,3	0,1	4,4	0,1	2,2	0,2	3,6	0,1	3,7	0,6
NIL12-2.2a	4,6	0,1	4,5	0,1	3,2	0,2	3,5	0,1	4,0	0,6
NIL12-2.2b	4,6	0,1	4,4	0,1	3,0	0,2	3,7	0,1	3,9	0,6
NIL12-3.1a	4,4	0,1	4,2	0,1	3,0	0,2	3,6	0,1	3,8	0,6
NIL12-3.1b	4,5	0,1	4,6	0,1	3,2	0,2	3,8	0,1	4,1	0,6
NIL12-1.2/2.2a	4,2	0,1	4,2	0,1	3,3	0,2	3,7	0,1	3,8	0,6
NIL12-1.2/2.2b	4,4	0,1	4,3	0,1	2,9	0,2	3,5	0,1	3,8	0,6
NIL12-1.2/3.1a	4,6	0,1	4,4	0,1	2,6	0,2	3,5	0,1	3,8	0,6
NIL12-2.2/3.1a	4,8	0,1	4,4	0,1	2,3	0,2	3,6	0,1	3,8	0,6
NIL12-1.2/2.2/3.1a	4,3	0,1	4,3	0,1	2,7	0,2	3,2	0,1	3,6	0,6
NIL12-1.2/2.2/3.1b	3,8	0,1	4,0	0,1	3,3	0,2	3,3	0,1	3,6	0,6
NIL13-0a	4,5	0,1	4,2	0,1	3,4	0,2	3,6	0,2	4,0	0,5
NIL13-0b	4,3	0,1	4,4	0,1	2,9	0,2	3,7	0,2	3,8	0,5
NIL13-2.2a	4,6	0,1	4,6	0,1	3,7	0,2	3,8	0,2	4,2	0,5
NIL13-2.2 b	4,6	0,1	4,2	0,1	3,8	0,2	3,8	0,2	4,1	0,5
NIL13-3.1a	4,4	0,1	4,3	0,1	2,9	0,2	3,5	0,2	3,8	0,5
NIL13-3.1b	4,0	0,1	4,4	0,1	NA	NA	3,4	0,2	3,7	0,5
NIL13-7.6a	4,5	0,1	4,3	0,1	3,4	0,2	3,5	0,2	3,9	0,5
NIL13-7.6b	4,6	0,1	4,2	0,1	3,2	0,2	3,7	0,2	3,9	0,5
NIL13-2.2/7.6a	4,2	0,1	4,4	0,1	3,5	0,2	3,5	0,2	3,9	0,5
NIL13-2.2/7.6b	4,4	0,1	4,1	0,1	3,0	0,2	3,7	0,2	3,8	0,5
NIL13-3.1/7.6a	4,1	0,1	4,1	0,1	3,1	0,2	3,3	0,2	3,7	0,5
NIL13-3.1/7.6b	4,4	0,1	4,4	0,1	3,2	0,2	3,2	0,2	3,8	0,5
NIL13-2.2/3.1/7.6a	4,2	0,1	4,5	0,1	2,8	0,2	3,1	0,2	3,7	0,5
NIL13-2.2/3.1/7.6b	4,3	0,1	4,3	0,1	3,0	0,2	3,0	0,2	3,7	0,5
NIL14-0a	4,5	0,1	4,0	0,2	2,8	0,2	3,6	0,2	3,7	0,5
NIL14-0b	4,3	0,1	3,9	0,2	3,1	0,2	3,4	0,2	3,7	0,5
NIL14-2.2a	4,2	0,1	4,1	0,2	3,4	0,2	3,2	0,2	3,7	0,5
NIL14-2.2 b	4,4	0,1	4,1	0,2	2,3	0,2	3,5	0,2	3,6	0,5
NIL14-3.1a	4,3	0,1	3,9	0,2	3,0	0,2	3,4	0,2	3,7	0,5
NIL14-3.1b	4,4	0,1	3,9	0,2	2,7	0,2	3,6	0,2	3,6	0,5
NIL14-7.6a	4,3	0,1	3,8	0,2	2,6	0,2	3,4	0,2	3,5	0,5
NIL14-7.6b	4,2	0,1	3,8	0,2	3,2	0,2	3,5	0,2	3,7	0,5
NIL14-2.2/3.1a	4,2	0,1	4,3	0,2	3,5	0,2	3,5	0,2	3,9	0,5
NIL14-2.2/3.1b	4,5	0,1	3,7	0,2	3,1	0,2	3,2	0,2	3,6	0,5
NIL14-2.2/7.6a	4,0	0,1	4,1	0,2	3,0	0,2	3,1	0,2	3,5	0,5
NIL14-2.2/7.6b	4,1	0,1	4,1	0,2	2,8	0,2	3,5	0,2	3,6	0,5
NIL14-3.1/7.6a	4,3	0,1	3,9	0,2	3,0	0,2	3,3	0,2	3,6	0,5
NIL14-2.2/3.1/7.6a	4,1	0,1	4,1	0,2	2,2	0,2	3,3	0,2	3,4	0,5
NIL15-0a	4,8	0,1	4,6	0,1	3,2	0,2	3,8	0,1	4,1	0,6
NIL15-0b	4,5	0,1	4,5	0,1	3,4	0,2	3,8	0,1	4,0	0,6
NIL15-2.2a	4,7	0,1	4,7	0,1	3,0	0,2	3,8	0,1	4,0	0,6
NIL15-2.2 b	4,6	0,1	4,5	0,1	3,1	0,2	3,9	0,1	4,0	0,6
NIL15-3.1a	4,6	0,1	4,5	0,1	2,8	0,2	4,0	0,1	4,0	0,6
NIL15-3.1b	4,6	0,1	4,7	0,1	3,1	0,2	3,8	0,1	4,1	0,6
NIL15-7.6a	4,5	0,1	4,8	0,1	3,6	0,2	3,4	0,1	4,1	0,6
NIL15-7.6b	4,8	0,1	4,7	0,1	3,2	0,2	3,8	0,1	4,2	0,6
NIL15-2.2/3.1a	4,7	0,1	4,6	0,1	3,7	0,2	3,8	0,1	4,2	0,6
NIL15-2.2/3.1b	4,6	0,1	4,4	0,1	2,6	0,2	3,9	0,1	3,9	0,6
NIL15-2.2/7.6a	4,5	0,1	4,3	0,1	3,2	0,2	3,8	0,1	3,9	0,6
NIL15-2.2/7.6b	4,8	0,1	4,1	0,1	3,5	0,2	3,6	0,1	4,0	0,6
NIL15-3.1/7.6a	4,6	0,1	4,2	0,1	3,1	0,2	3,7	0,1	3,9	0,6
NIL15-3.1/7.6b	4,6	0,1	4,5	0,1	2,8	0,2	4,0	0,1	4,0	0,6
NIL15-2.2/3.1/7.6a	4,7	0,1	4,6	0,1	2,8	0,2	3,8	0,1	4,0	0,6
NIL15-2.2/3.1/7.6b	4,6	0,1	4,3	0,1	2,4	0,2	3,6	0,1	3,7	0,6

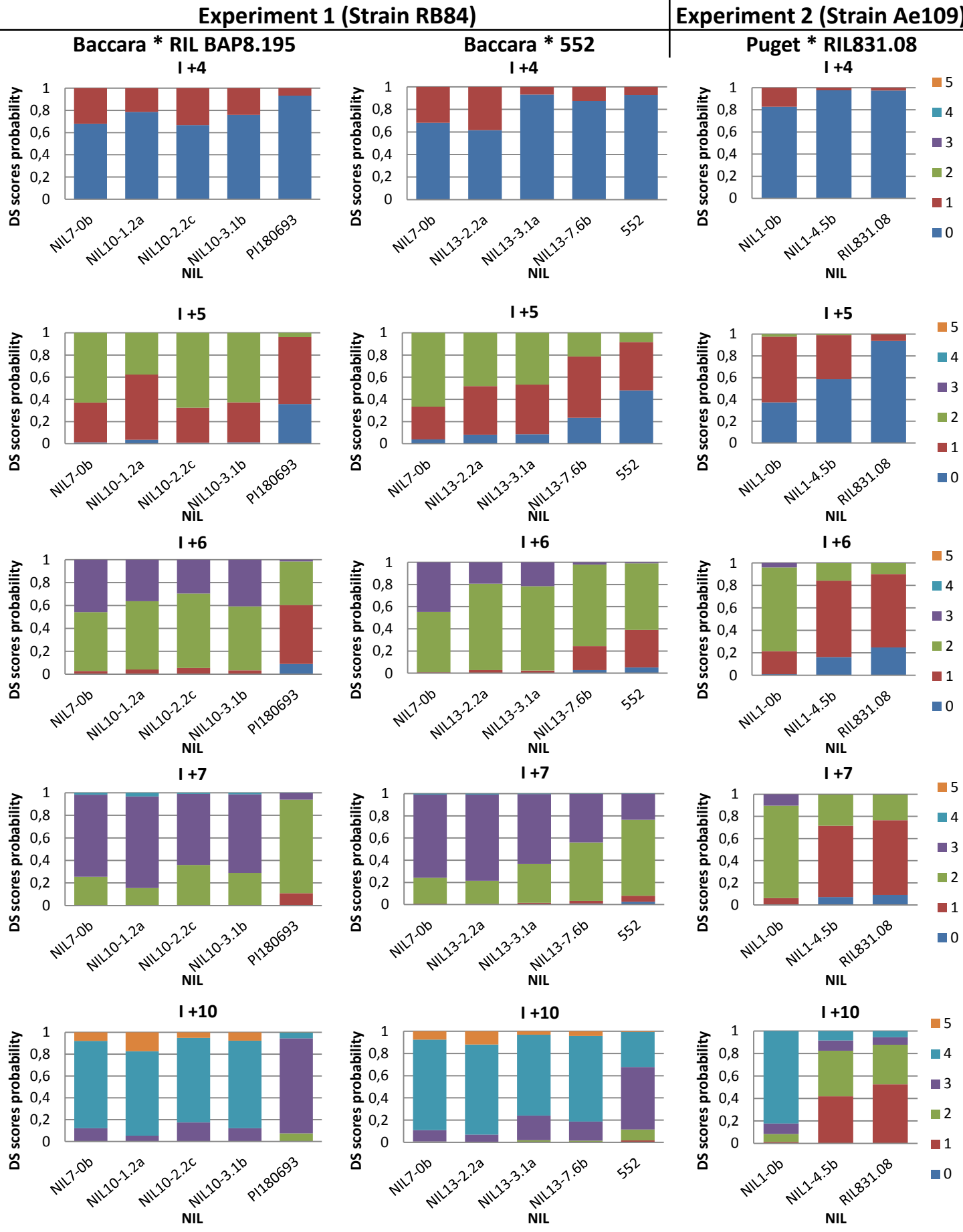
ANNEXE IV.1

Additional file 1: DS scores probability in each NIL set at each scoring day

A Experiments #1 and #2. The colors in each bar represent the probabilities of scores “0” (healthy plant) to “5” (dead plant), according to the DS rating scale used [26]. At two and three days after inoculation, no DS scores probability could be calculated from the CLMM model because some lines did not have symptoms.

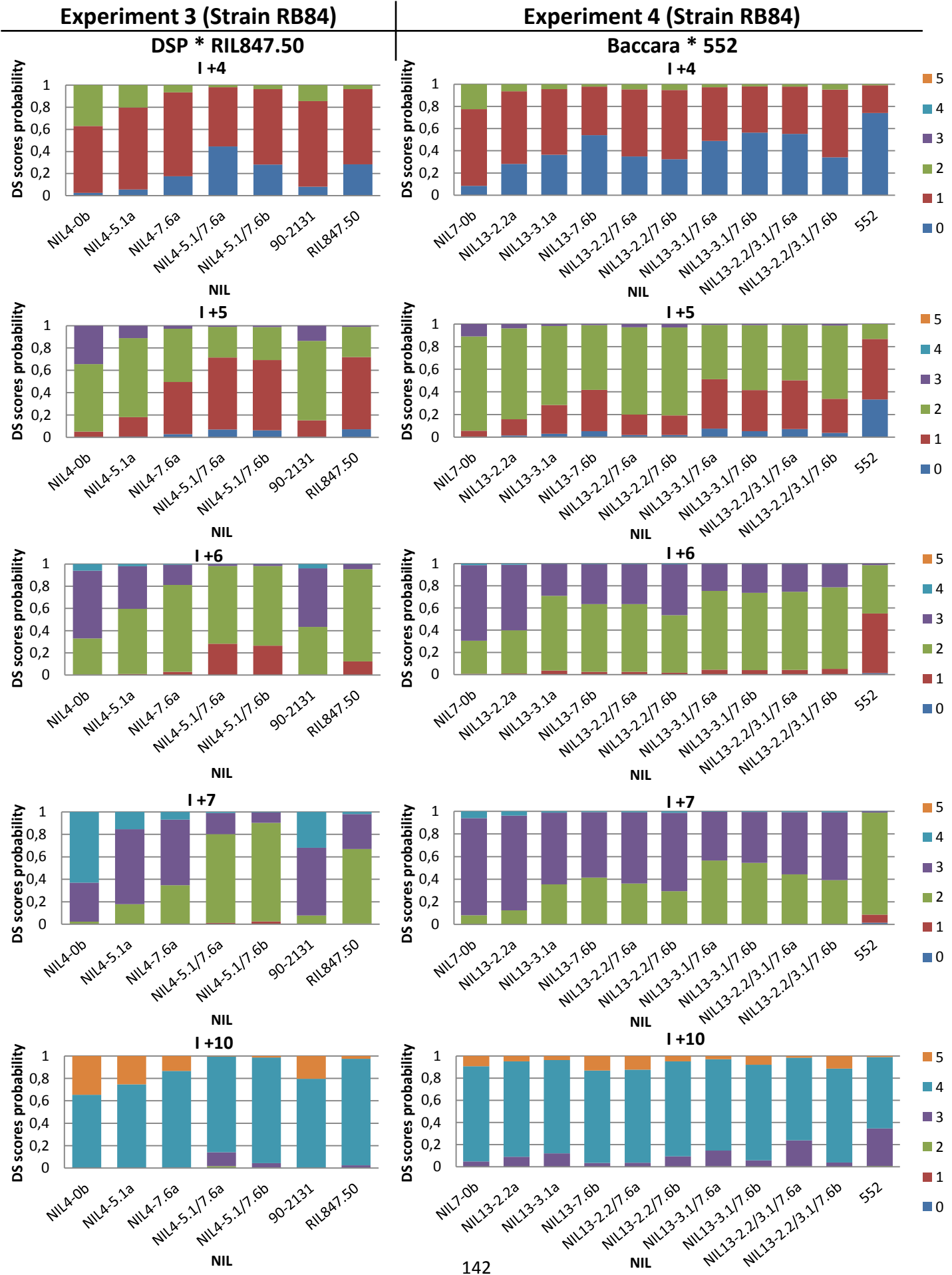


ANNEXE IV.1 (suite 1)



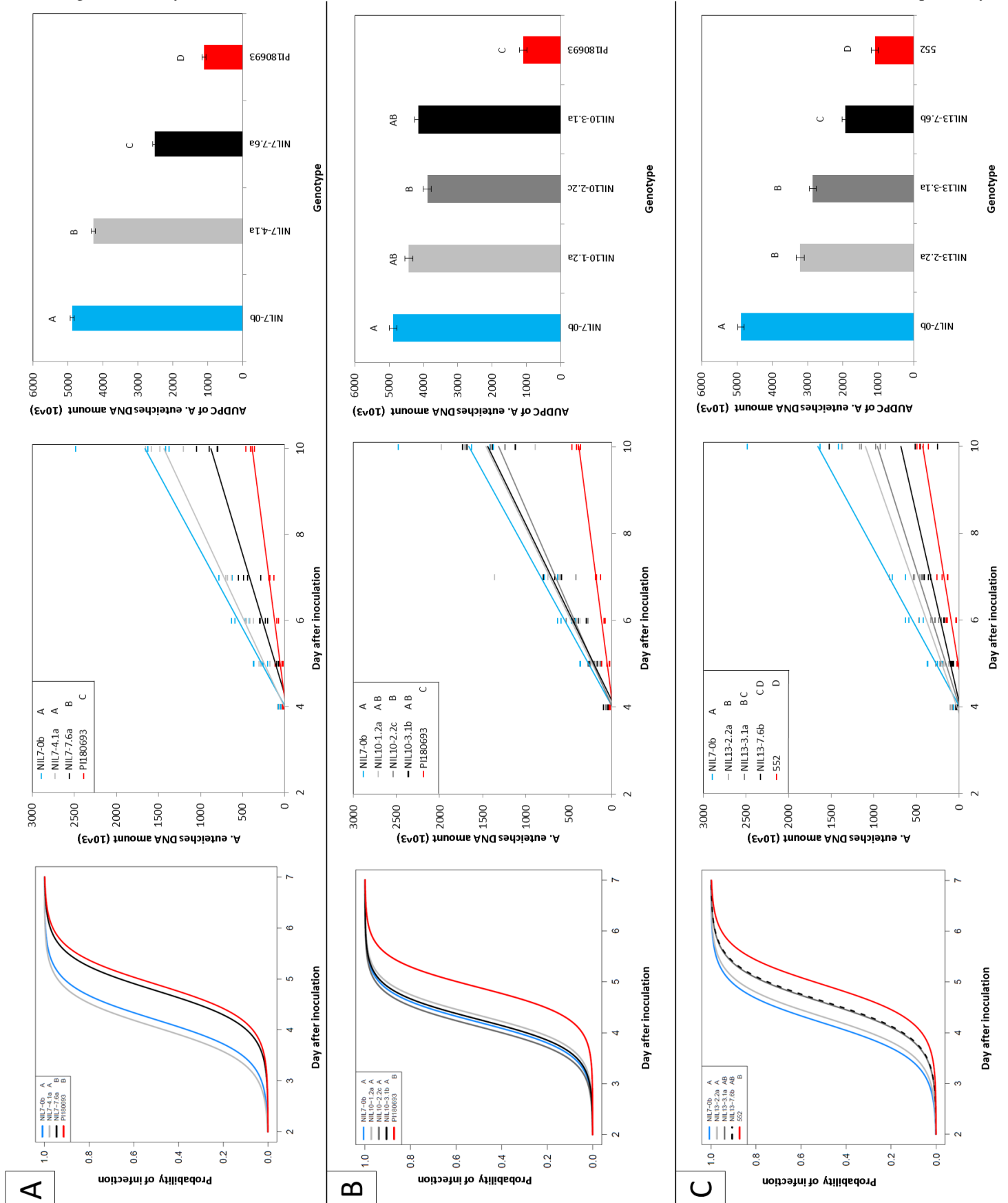
ANNEXE IV.1 (suite 2)

B Experiments #3 and #4. The colors in each bar represent the probabilities of scores “0” (healthy plant) to “5” (dead plant), according to the DS rating scale used [26]. At two and three days after inoculation, no DS scores probability could be calculated from the CLMM model because some lines did not have symptoms.



Additional file 2: Effects of NILs carrying single or combined resistance QTL on variables of *A. euteiches* life cycle.

A-C/ Single QTL NIL experiment #1; **D/** Single QTL NIL experiment #2; **E/** Combined and single QTL NIL experiment #4. The first graph represents, the probability of infection, corresponding to the percentage of plants with symptoms per block for each scoring day. The second graph represents, the root colonization speed, corresponding to the slope of the DNA amount evolution curve per block for 10 days after inoculation, from 10^4 DNA copies detected. The third graph correspond to the AUDPC calculated from the pathogen DNA quantification data. Bars represent standard errors. Attribution of each line to LSMeans group(s) is indicated by letter(s), according to the Tukey test ($P < 0.05$). Blue and red lines indicate the NIL without QTL and the donor line (RIL 847.50), respectively.



ANNEXE V.1

Démarche de réduction de l'Intervalle de Confiance (IC) du QTL *Ae-Ps7.6* de résistance à *A. euteiches* chez le pois

QTL *Ae-Ps7.6* (Allèle 90-2131, $R^2 \leq 60\%$, en condition contrôlée avec la souche RB84)

645 plantes (BC5F2) "**DSP x 847.50**" screenées

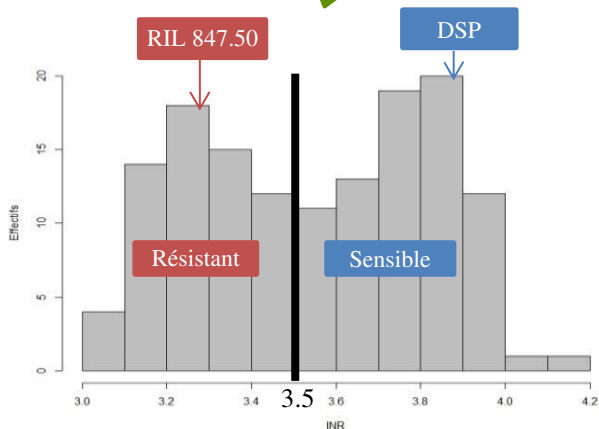
(issues de 10 plantes hétérozygotes BC5F1 mono-QTL)

2012 → 4 SSRs (50cM) → 140 plantes recombinantes

Phénotypage

2013 → 6 SNPs (Duarte et al. 2014) (12 cM)

2014 → 21 SNPs (Tayeh et al. 2015) (4,5 cM)



Phénotypage des 140 plantes fixées
en conditions contrôlées avec la souche RB84

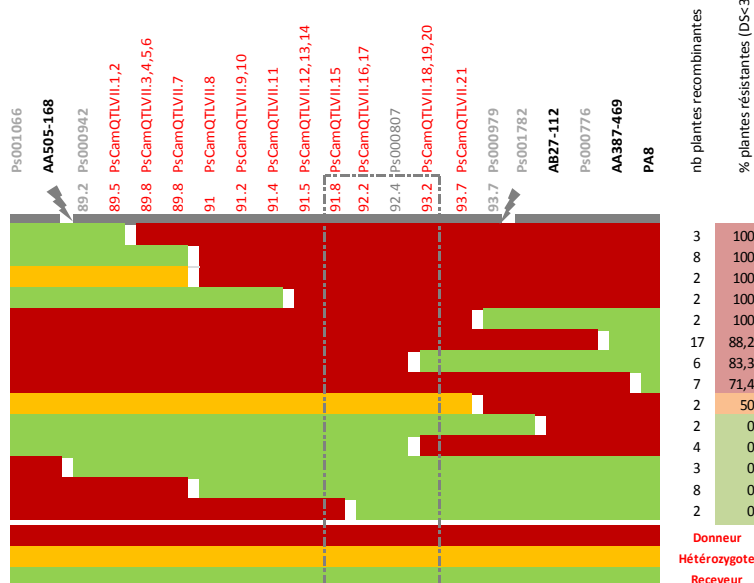
→ **IC Final : 1.4 cM**

Groupe de Liaison VII

Ae-Ps7.6



50 cM



Nouvel IC du QTL *Ae-Ps7.6* de 1.4 cM.