



HAL
open science

Résistance du pommier à la tavelure (*Venturia inaequalis*): Recherche de nouveaux loci et construction de génotypes "prototypes" en vue d'une gestion durable de la résistance

Vanessa Soufflet-Freslon

► **To cite this version:**

Vanessa Soufflet-Freslon. Résistance du pommier à la tavelure (*Venturia inaequalis*): Recherche de nouveaux loci et construction de génotypes "prototypes" en vue d'une gestion durable de la résistance. Biologie végétale. Université d'Angers, 2008. Français. NNT: . tel-00445904

HAL Id: tel-00445904

<https://theses.hal.science/tel-00445904>

Submitted on 11 Jan 2010

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.

RESISTANCE DU POMMIER A LA TAVELURE
(*Venturia inaequalis*) :

Recherche de nouveaux loci
et construction de géotypes "prototypes"
en vue d'une gestion durable de la résistance

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire Végétale

ECOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement
le 20 novembre 2008
à Angers

Par Vanessa SOUFFLET-FRESLON

Devant le jury :

| | | |
|----------------------|--------------------|---|
| Rapporteurs : | Catherine BASTIEN | Directrice de Recherches, INRA, Orléans |
| | Véronique LEFEBVRE | Directrice de Recherches, INRA, Avignon |
| Examineurs : | Laurence MOREAU | Chargée de Recherches, INRA, Versailles-Grignon |
| | Philippe SIMONEAU | Professeur, Université d'Angers |
| Directeur de thèse : | Charles-Eric DUREL | Chargé de Recherches, INRA, Angers-Nantes |

**"Le commencement de toutes les sciences,
c'est l'étonnement de ce que les choses
sont ce qu'elles sont."**

(Aristote)

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée à l'UMR Génétique et Horticulture (GenHort) dans l'équipe de "Cartographie génétique du pommier" du Centre INRA d'Angers. Elle a été financée par l'Agglomération d'Angers.

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements à Charles-Eric Durel pour la confiance qu'il a su m'accorder pour mener à bien ce projet. Passionné par votre travail et par vos recherches, vous m'avez communiqué cet enthousiasme que je garderai.

Je remercie Elisabeth Chevreau de m'avoir de nouveau accueillie au sein de son Unité ainsi que pour son soutien.

Je tiens à remercier Catherine Bastien et Véronique Lefèbvre d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse en qualité de rapporteurs, et Laurence Moreau et Philippe Simoneau pour avoir accepté de participer à mon jury. Merci également à Marie-Laure Pilet-Nayel, Alain Palloix et Bruno Le Cam pour leurs conseils apportés lors des comités de thèse.

Un merci particulier à Michel Chevalier pour m'avoir fait confiance et donné l'opportunité d'une première expérience dans l'enseignement.

Merci à l'équipe "Tavelure" de l'UMR PaVé, en particulier Pascale pour l'aide à la préparation des inocula, ainsi qu'à Luciana (ayant récemment intégré l'Unité de Recherches Intégrées de Gotheron), Valérie, Natacha et Bruno pour nos échanges.

Merci à Jean-Michel (que j'ai dérangé si souvent et qui a toujours répondu présent à mes demandes avec beaucoup de professionnalisme) et son équipe, en particulier Lysiane, pour avoir pris soin de mes plantes en serre.

Merci à Fabrice D. et Sylvain d'avoir répondu à mes questions ponctuelles mais répétées... en statistiques et informatique.

Merci Agathe d'avoir contribué à mes travaux ; tu resteras ma "première stagiaire".

Je n'oublie pas ce que je dois à Chantal J., Patricia R. et Marie-Christine P. pour avoir contribué au bon déroulement "administratif" de cette thèse.

Un grand merci à mes collègues du bureau "Thésards-Post-docs", Samia et Nono, pour les fous rires partagés et les pauses qui "reboostent". Bon courage à toi Nono pour la fin de ta thèse.

Merci Caro pour ton aide... tu connais tes marqueurs comme personne !

Merci aussi à Mag, Raph, Pauline, Fabienne et Nadège pour les agréables moments partagés. Une p'tite pause...

Merci Marie et Marie-Hélène pour votre soutien, en particulier dans la dernière ligne droite.

Un merci général à toutes les personnes de l'Unité pour l'ambiance conviviale qu'il y règne.

Je suis tout particulièrement reconnaissante envers mes parents pour m'avoir laissée libre de mes orientations et de m'avoir donné la possibilité de réaliser ce que j'avais entrepris. Maman, Papa, merci du fond du cœur.

Un énorme merci à toi, Pierre, pour ton soutien, tes encouragements et ta patience tout au long de ces années. Merci de m'avoir supportée et d'être toujours présent pour les bons comme pour les moments plus difficiles. En quelques mots, tu es un mari formidable.

Famille et amis... Ca y est, les études sont terminées !

Finalement, on ne devrait jamais écrire la page des remerciements en dernier... Maintenant, je crains d'avoir oublié certaines personnes... Donc, à tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont soutenue ou aidée, "Merci !"

TABLE DES MATIERES

| | |
|------------------------|---|
| LISTE DES ABREVIATIONS | i |
|------------------------|---|

| | |
|-------------------------------|----|
| LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX | ii |
|-------------------------------|----|

| | |
|-----------------------|---|
| INTRODUCTION GENERALE | 1 |
|-----------------------|---|

| | |
|---------------------------------------|---|
| CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE | 5 |
|---------------------------------------|---|

| | |
|---|-----------|
| I- Génétique de l'interaction plante hôte-agent pathogène | 6 |
| I-1- Résistance non-hôte | 6 |
| I-2- Résistance hôte | 7 |
| I-2-1- Résistance qualitative | 7 |
| I-2-1-1- Relation "gène-pour-gène" | 8 |
| I-2-1-2- Gènes de résistance | 9 |
| I-2-1-3- Gènes d'avirulence | 10 |
| I-2-2- Résistance quantitative | 11 |
| I-2-3- Organisation génomique des loci de résistance | 12 |
| I-2-4- Voies de défense déclenchées | 14 |
| I-3- Evolution des pathosystèmes | 14 |
| I-3-1- Coévolution en milieu naturel | 14 |
| I-3-2- Adaptation en systèmes cultivés | 15 |
| II- Durabilité des résistances | 16 |
| II-1- Potentiel évolutif d'un agent pathogène | 17 |
| II-2- Gamme d'hôtes | 18 |
| II-3- Coût de <i>fitness</i> | 18 |
| II-4- Nature de la résistance | 19 |
| II-5- Déploiement spatial de la résistance | 21 |
| III- Méthodologies d'exploration de l'architecture génétique d'un caractère complexe comme la résistance | 22 |
| III-1- Cartographie en population simple | 22 |
| III-2- Cartographie en populations multiples | 22 |
| III-3- Génétique d'association et cartographie en déséquilibre de liaison | 23 |
| IV- Pathosystème <i>Malus-Venturia inaequalis</i> | 24 |
| IV-1- Pommier cultivé, <i>Malus x domestica</i> | 24 |
| IV-1-1- Origine et domestication | 24 |
| IV-1-2- Biologie | 25 |
| IV-1-3- Cytogénétique | 26 |
| IV-1-4- Importance économique | 26 |
| IV-1-5- Amélioration génétique | 27 |

| | |
|---|-----------|
| IV-1-5-1- Objectifs de sélection | 27 |
| IV-1-5-2- Méthodes d'amélioration | 28 |
| IV-1-5-2-1- Hybridation | 28 |
| IV-1-5-2-2- Mutagenèse | 29 |
| IV-1-5-2-3- Transformation génétique | 29 |
| IV-2- La tavelure, maladie du pommier causée par le champignon <i>Venturia inaequalis</i> | 30 |
| IV-2-1- Importance économique | 30 |
| IV-2-2- Taxonomie | 31 |
| IV-2-3- Cycle biologique | 31 |
| IV-2-4- Variabilité du pouvoir pathogène | 32 |
| IV-3- Symptomatologie | 33 |
| IV-4- Moyens de lutte | 33 |
| IV-4-1- Stratégie défensive | 34 |
| IV-4-2- Stratégie offensive | 36 |
| IV-4-3- Intégration des stratégies défensive et offensive : lutte intégrée | 36 |
| V- Génétique de la résistance du pommier à la tavelure | 37 |
| V-1- Sources de résistance | 37 |
| V-2- Organisation génomique de la résistance | 39 |
| VI- Sélection de la résistance du pommier à la tavelure | 40 |
| VI-1- Pyramidage de "gènes" | 40 |
| VI-2- Sélection assistée par marqueurs | 41 |

| | |
|--|-----------|
| CHAPITRE 2 : RECHERCHE DE NOUVEAUX LOCI DE RESISTANCE | 44 |
|--|-----------|

| | |
|---|-----------|
| I- Introduction | 45 |
| II- Déterminisme génétique de la résistance à la tavelure de 'Dülmener Rosenapfel' | 46 |
| II-1- Inheritance studies of apple scab resistance and identification of <i>Rvi14</i> , a new major gene that acts together with other broad-spectrum QTL | 46 |
| II-1-1- Introduction | 48 |
| II-1-2- Material and Methods | 49 |
| II-1-2-1- Plant material and <i>Venturia inaequalis</i> isolates | 49 |
| II-1-2-2- Pathological tests and phenotyping | 50 |
| II-1-2-3- Statistical analyses | 51 |
| II-1-2-4- DNA extraction and specific PCR amplification | 51 |
| II-1-2-5- Selective genotyping | 52 |
| II-1-2-6- Genetic map construction | 52 |
| II-1-2-7- QTL detection | 53 |
| II-1-2-8- QTL contributions to phenotypic variation | 53 |
| II-1-3- Results | 54 |
| II-1-3-1- Phenotyping | 54 |
| II-1-3-2- Genetic mapping of a new major gene in apple | 55 |
| II-1-3-3- Characterization of the interaction pattern of <i>Rvi14</i> with <i>Venturia inaequalis</i> | 55 |
| II-1-3-4- QTL analyses | 56 |
| II-1-3-5- QTL contributions to phenotypic variation | 56 |
| II-1-4- Discussion | 56 |
| II-1-4-1- A new genomic region involved in apple scab resistance | 56 |
| II-1-4-2- Two confirmed genomic regions involved in partial resistance to scab in apple | 58 |
| II-1-4-3- QTL contributions to phenotypic variation | 58 |
| II-1-4-4- Genetic determinants of resistance | 59 |
| II-2- Discussion supplémentaire | 66 |
| II-2-1- Caractérisation des souches avirulentes- <i>Rvi14</i> | 66 |

| | |
|---|-----------|
| II-2-2- Marqueurs flanquant le gène majeur <i>Rvi14</i> | 66 |
| II-2-3- Architecture génétique de la résistance de 'Dülmener Rosenapfel' | 67 |
| II-2-4- Origine et déterminisme génétiques des QTL détectés sur les GL11 et GL17 | 67 |
| III- Recherche de QTL de résistance à la tavelure par une approche de cartographie en pedigree | 70 |
| III-1- Introduction | 70 |
| III-2- Matériels et méthodes | 70 |
| III-2-1- Matériels végétal et fongique | 70 |
| III-2-2- Tests pathologiques | 71 |
| III-2-2-1- Elevage des plants | 71 |
| III-2-2-2- Dispositif expérimental | 72 |
| III-2-2-3- Inoculations | 72 |
| III-2-2-4- Lecture des symptômes | 73 |
| III-2-3- Analyses statistiques des données phénotypiques | 73 |
| III-2-3-1- Ajustement des données phénotypiques | 73 |
| III-2-3-1-1- Ajustement sur l'effet "Bloc" | 73 |
| III-2-3-1-2- Ajustement simultané sur les effets "Bloc" et "Saison" | 73 |
| III-2-3-1-2-1- Ajustement sur les moyennes des saisons | 74 |
| III-2-3-1-2-2- Ajustement par régression d'une saison sur l'autre | 74 |
| III-2-3-2- Répétabilité et héritabilité des caractères | 75 |
| III-2-4- Détection de QTL | 76 |
| III-2-4-1- Données phénotypiques | 76 |
| III-2-4-2- Données génotypiques | 76 |
| III-2-4-3- Identification de QTL par une approche en pedigree | 76 |
| III-2-4-3-1- <i>A priori</i> sur les paramètres explicatifs | 77 |
| III-2-4-3-2- Longueur de la chaîne de Markov | 78 |
| III-2-4-3-3- Critères à vérifier pour valider les QTL | 78 |
| III-2-4-3-4- Analyse des QTL | 79 |
| III-3- Résultats | 80 |
| III-3-1- Conditions favorables à la détection de QTL | 80 |
| III-3-1-1- Distributions phénotypiques | 80 |
| III-3-1-2- Répétabilité et héritabilité des caractères | 81 |
| III-3-2- Détection de QTL | 82 |
| III-3-2-1- Analyse globale | 82 |
| III-3-2-1-1- Saison par saison | 82 |
| III-3-2-1-2- Saisons conjointes | 82 |
| III-3-2-1-2-1- Ajustement des phénotypes sur les moyennes des saisons | 82 |
| III-3-2-1-2-2- Ajustement des phénotypes par régression d'une saison sur l'autre | 83 |
| III-3-2-2- Héritéité des allèles favorables aux deux principaux QTL | 84 |
| III-3-2-2-1- QTL sur le GL1 | 84 |
| III-3-2-2-2- QTL sur le GL17 | 86 |
| III-4- Discussion | 87 |
| III-4-1- Peu de QTL renforçant le gène majeur <i>Vf</i> face aux souches pathogènes virulentes- <i>Vf</i> | 88 |
| III-4-2- Raisons potentielles d'une faible détection de QTL additionnels | 89 |
| III-4-3- Limites méthodologiques | 91 |
| III-4-3-1- Expression différentielle de la résistance entre saisons | 91 |
| III-4-3-2- Biais causé par les données phénotypiques des ancêtres | 92 |
| III-4-3-3- Inoculum multi-souches | 92 |
| III-4-4- Avantages et limites de l'approche en pedigree | 93 |
| III-4-5- Caractéristiques propres aux principaux QTL détectés | 95 |
| III-4-5-1- Région génomique de <i>Vf</i> ... | 95 |
| III-4-5-1-1- Deux doses de <i>Vf</i> valent mieux qu'une ! | 95 |
| III-4-5-1-2- Diversité de résistance au locus | 95 |
| III-4-5-1-3- Ne jetons pas <i>Vf</i> ! | 97 |
| III-4-5-2- QTL sur le GL17 faible mais constant | 98 |

| | |
|--|------------|
| CHAPITRE 3 : CONSTRUCTION DE GENOTYPES "PROTOTYPES" | 100 |
|--|------------|

| | |
|---|------------|
| I- Introduction | 101 |
| II- Matériels et méthodes | 102 |
| II-1- Matériels végétal et fongique | 102 |
| II-2- Tests pathologiques | 104 |
| II-2-1- Elevage des plants | 104 |
| II-2-2- Dispositif expérimental | 104 |
| II-2-3- Inoculations | 104 |
| II-2-4- Lecture des symptômes | 105 |
| II-3- Détection des loci de résistance | 105 |
| II-3-1- Données phénotypiques | 105 |
| II-3-2- Données génotypiques | 106 |
| II-3-3- Détection intra-descendance des loci de résistance | 107 |
| II-3-3-1- Loci additifs et dominants | 107 |
| II-3-3-2- Interactions épistatiques | 108 |
| II-3-4- Probabilités de présence de l'allèle parental favorable aux gènes majeurs et QTL détectés | 108 |
| II-4- Elaboration du modèle génétique | 110 |
| II-4-1- Relation d'additivité/dominance aux gènes majeurs et QTL détectés | 111 |
| II-4-2- Effets additifs globaux des gènes majeurs et QTL détectés | 111 |
| II-4-2-1- Ajustement des données phénotypiques sur le fond génétique de chaque descendance | 111 |
| II-4-2-2- Estimation des effets additifs globaux des loci de résistance | 113 |
| II-4-3- Estimation des effets génétiques résiduels propres à chaque parent | 114 |
| II-5- Comparaison de l'efficacité relative de différentes constructions de génotypes | 115 |
| III- Résultats | 116 |
| III-1- Analyse des données phénotypiques | 116 |
| III-1-1- Symptômes de résistance | 116 |
| III-1-1-1- Ségrégation des symptômes chlorotique et nécrotique | 116 |
| III-1-1-2- Cartographie génétique des gènes majeurs <i>Vh2</i> et <i>Vh4</i> | 117 |
| III-1-2- Sévérité de sporulation | 118 |
| III-1-3- AGC et ASC | 119 |
| III-2- Détection intra-descendance des loci de résistance | 119 |
| III-3- Elaboration du modèle génétique | 120 |
| III-3-1- Relation d'additivité/dominance aux gènes majeurs et QTL détectés | 120 |
| III-3-2- Effets additifs globaux des gènes majeurs et QTL détectés | 121 |
| III-3-3- Effets génétiques résiduels | 122 |
| III-3-4- Modèle génétique global | 123 |
| III-4- Comparaison de l'efficacité relative des différentes constructions génotypiques obtenues | 124 |
| IV- Discussion | 124 |
| IV-1- Peu de loci intégrés dans le modèle génétique | 124 |
| IV-2- Caractéristiques propres aux loci de résistance détectés | 127 |
| IV-2-1- <i>Vg</i> : un gène majeur non laminé face à un mélange multi-souches | 127 |
| IV-2-2- Locus sur le GL6 : effet de filtration ou résistance à large spectre ? | 129 |
| IV-2-3- Des QTL à spectre large sur le GL11 et le GL17 | 129 |
| IV-3- Portée du modèle génétique | 130 |
| IV-4- Règles de cumul de loci de résistance | 132 |

| | |
|--|------------|
| DISCUSSION GENERALE | 134 |
| I- Rappel des principaux résultats | 135 |
| II- Expression différentielle de la résistance entre saisons | 136 |
| III- Les tests en serre sont-ils représentatifs des conditions naturelles ? | 138 |
| IV- Inoculum multi-souches | 139 |
| V- Portée des résultats obtenus | 140 |
| VI- Le "tout génétique" ou la génétique comme "composante" de la protection intégrée ? | 141 |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 143 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|--------|---|
| ADN | acide désoxyribonucléique |
| ANOVA | analyse de variance ('analysis of variance') |
| AFLP | polymorphisme de longueur de fragment amplifié ('amplified fragment length polymorphism') |
| AUDPC | aire sous la courbe de progression de la maladie ('area under disease progress curve') |
| CAPS | séquence polymorphe amplifiée par clivage ('cleaved amplification polymorphism sequence') |
| CC | domaine "coiled-coil" |
| CTPS | Comité Technique Permanent de la Sélection |
| DARE | Durable Apple Resistance in Europe |
| FAO | Organisation de l'Alimentation et de l'Agriculture ('Food and Agriculture Organization') |
| GL | groupe de liaison |
| HiDRAS | High-quality Disease Resistance Apples for a Sustainable agriculture |
| HR | réponse hypersensible ('hypersensitive response') |
| INRA | Institut National de Recherche Agronomique |
| LRR | répétitions riches en leucine ('leucine rich repeat') |
| LOD | logarithme des probabilités ('logarithm of odds ratio') |
| NBS | site de liaison aux nucléotides ('nucleotide binding site') |
| PCR | amplification enzymatique de l'ADN ('polymerase chain reaction') |
| PR | protéines liées à la pathogénicité ('pathogenesis related') |
| QTL | loci de caractères quantitatifs ('quantitative trait loci') |
| RGA | analogue de gène de résistance ('resistance gene analogue') |
| SAM | sélection assistée par marqueurs |
| SSR | séquence simple répétée ('simple sequence repeat') |

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

CHAPITRE 1 :

Figure 1. Interprétation biochimique du modèle "gène-pour-gène".

Figure 2. Cycle biologique de *Venturia inaequalis*, agent pathogène responsable de la tavelure chez le pommier.

Figure 3. Symptômes de tavelure sur (a) feuille et (b) fruit de pommier.

Figure 4. Organisation génomique des facteurs de résistance du pommier à la tavelure.

Tableau 1. Relation "gène-pour-gène" dans le cas d'un agent pathogène haploïde.

CHAPITRE 2 :

Figure 1. Distribution de l'AUDPC de la descendance entière 'Gala' x 'Dülmener Rosenapfel' (275 individus) et de la sous-population sélectionnée pour les études génétiques (166 individus), notées au premier test.

[**Figure 1.** AUDPC distributions for the entire (275 individuals) 'Gala' x 'Dülmener Rosenapfel' progeny and for the subset selected for genetic studies (166 individuals), scored at the first screen.]

Figure 2. AUDPC de la descendance 'Gala' x 'Dülmener Rosenapfel' après co-inoculation de cinq souches de *Venturia inaequalis* : (A) Distribution de l'AUDPC pour le premier test ; (B) Distribution de l'AUDPC pour le second test ; (C) Individus représentés conjointement pour les deux tests.

[**Figure 2.** AUDPC for 'Gala' x 'Dülmener Rosenapfel' progeny after co-inoculation with five *Venturia inaequalis* isolates: (A) AUDPC distribution for the first screen; (B) AUDPC distribution for the second screen; (C) Individuals plotted for both screens.]

Figure 3. Localisation génomique des QTL d'AUDPC et courbes de LOD pour les groupes de liaison 6, 11, et 17 de la carte de liaison intégrée 'Gala' x 'Dülmener Rosenapfel' (détection par cartographie par intervalle), après co-inoculation de cinq souches de *Venturia inaequalis*.

[**Figure 3.** Genomic localization of QTL for AUDPC and LOD plots for linkage groups 6, 11, and 17 of the 'Gala' x 'Dülmener Rosenapfel' integrated linkage map (interval mapping detection), after co-inoculation with five *Venturia inaequalis* isolates.]

Figure 4. Transmission des allèles des deux marqueurs encadrant le QTL de résistance à la tavelure sur le GL11, CH04h02 et CH04a12, le long des pedigrees de 'Gala' et 'Fiesta'.

Figure 5. Transmission des allèles des deux marqueurs encadrant le QTL de résistance à la tavelure sur le GL17, CH01h01 et Hi03c05, le long des pedigrees de 'Gala' et 'Fiesta'.

Figure 6. Statut des allèles au QTL de résistance à la tavelure du GL11, sous l'hypothèse d'une résistance récessive, chez différents cultivars de pommier.

Figure 7. Structure de la population en pedigree.

Figure 8. Régression curvilinéaire des moyennes génotypiques du printemps sur celles de l'automne pour les 39 génotypes de la population en pedigree phénotypés (AUDPC) aux deux saisons.

Figure 9. Modèle hiérarchique bayésien simplifié pour la détection de QTL.

Figure 10. Distribution des données phénotypiques (ajustées sur l'effet "Bloc" intra-saison), aux deux saisons, de l'ensemble des descendants de la population en pedigree.

Figure 11. Distribution des données phénotypiques (ajustées sur l'effet "Bloc" intra-saison), aux deux saisons, de quelques descendance caractéristiques : descendance globalement résistante (I-J), descendance globalement sensible (12-L), descendance à distribution étalée (12-P).

Figure 12. Cartographie des QTL de résistance à la tavelure détectés dans la population en pedigree, au printemps et à l'automne (logiciel FlexQTL™).

Figure 13. Suivi des allèles du marqueur CH-Vf1, lié au QTL de résistance à la tavelure du GL1, le long du pedigree du parent 'X6683'.

Figure 14. Suivi des allèles du marqueur CH-Vf1, lié au QTL de résistance à la tavelure du GL1, le long du pedigree du parent 'Red Winter 3177'.

Tableau 4. AUDPC moyennes des quatre classes génotypiques au pic du QTL de résistance à la tavelure sur le GL17, détecté dans la descendance 'Gala' x 'Dülmener Rosenapfel'.

Tableau 5. Plan de croisements diallèle incomplet des 13 descendance de la population en pedigree.

Tableau 6. Concentration et taux de germination des souches monoconidiales de *Venturia inaequalis* inoculées sur la population en pedigree, aux deux saisons.

Tableau 7. Echelle de notation de la sévérité de sporulation causée par *Venturia inaequalis* sur pommier.

Tableau 8. Interprétation du facteur de Bayes (logiciel FlexQTL™) pour la détection de QTL.

Tableau 9. Héritabilités individuelles (h^2_{indiv}) et héritabilités de moyennes génotypiques ($h^2_{\text{moy genot}}$) des 13 descendance de la population en pedigree.

Tableau 10. Paramètres associés aux QTL de résistance à la tavelure détectés dans la population en pedigree.

Tableau 11. Valeurs de probabilités génotypiques pour le QTL de résistance à la tavelure du GL17 (fournies par le logiciel FlexQTL™) pour les variétés fondatrices porteuses de cette résistance.

CHAPITRE 3 :

Figure 1. Symptômes de résistance du pommier à la tavelure : (a) dépressions cellulaires localisées en forme de têtes d'épingle ou 'pin-points' caractéristiques du gène *Vh4* ; (b) symptômes de type chlorotique localisés induits par le gène *Rvi14* ; (c) nécroses larges associées au gène *Vg* ; (d) nécroses en forme d'étoiles associées au gène *Vh2*.

Figure 2. Régions génomiques du pommier, portant des loci de résistance à la tavelure, ciblées dans l'étude du plan de croisements demi-diallèle.

Figure 3. Cartographie génétique des gènes majeurs *Vh4* et *Vh2* sur le GL2 de 'Russian Seedling R12740-7A' (RS), pour les trois descendances issues de ce géniteur (logiciel JoinMap®).

Figure 4. Distribution des données phénotypiques, aux deux saisons, des descendances issues du parent 'Russian Seedling R12740-7A' (RS).

Figure 5. Distribution des données phénotypiques, aux deux saisons, issues des parents 'A10-15' (A), 'Dülmener Rosenapfel' (DR), 'Fiesta' (F) et 'X6683' (X).

Tableau 1. Plan de croisements demi-diallèle réalisé entre cinq génotypes de pommier.

Tableau 2. Caractéristiques de souches de *Venturia inaequalis* inoculées sur les descendants du plan de croisements demi-diallèle.

Tableau 3. Concentration et taux de germination des souches monoconidiales de *Venturia inaequalis* inoculées sur les descendants du plan de croisements demi-diallèle, aux deux saisons.

Tableau 4. Probabilité de présence de l'allèle favorable (PPAF) au locus de résistance (gène majeur ou QTL) suivi par un seul marqueur.

Tableau 5. Probabilité de présence de l'allèle favorable (PPAF) au locus de résistance (gène majeur ou QTL) suivi par des marqueurs flanquants.

Tableau 6. Ségrégation des classes génotypiques des marqueurs CH01h01 et Hi03c05, liés au QTL de résistance à la tavelure du GL17, dans trois descendances du plan de croisements demi-diallèle.

Tableau 7. Ségrégation du symptôme phénotypique associé au gène majeur *Vg*, dans la descendance 'Russian Seedling' x 'A10-15' (RSxA), en fonction du polymorphisme du marqueur CH-Vf1 chez le parent 'A10-15'.

Tableau 8. Ségrégation du symptôme phénotypique associé au gène majeur *Vg*, dans la descendance 'Dülmener Rosenapfel' x 'A10-15' (DRxA), en fonction du polymorphisme du marqueur CH-Vf1 chez le parent 'A10-15'.

Tableau 9. Ségrégation du symptôme phénotypique associé au gène majeur *Vg*, dans la descendance 'Dülmener Rosenapfel' x 'A10-15' (DRxA), en fonction du polymorphisme du marqueur CH01h01 chez les parents 'A10-15' et 'Dülmener Rosenapfel'.

Tableau 10. Ségrégation des allèles aux gènes majeurs *Vh4* et *Vh2* dans les trois descendances issues du parent 'Russian Seedling R12740-7A' (RS).

Tableau 11. Paramètres associés aux données phénotypiques (AUDPC) aux deux saisons de six descendances du plan de croisements demi-diallèle.

Tableau 12. Valeurs des aptitudes générales à la combinaison (AGC) et des aptitudes spécifiques à la combinaison (ASC), calculées pour quatre géniteurs du plan de croisements demi-diallèle, au printemps et à l'automne.

Tableau 13. Paramètres associés aux QTL de résistance à la tavelure détectés par 'restricted Multiple QTL Mapping' (logiciel MapQTL®) dans trois descendances du plan de croisements demi-diallèle.

Tableau 14. Relation d'additivité au QTL de résistance à la tavelure du GL17 mise en évidence dans trois descendances du plan de croisements demi-diallèle.

Tableau 15. Effets et contributions à la variation phénotypique (estimés par régression) des loci de résistance à la tavelure détectés dans trois descendances du plan de croisements demi-diallèle.

Tableau 16. Comparaison de l'efficacité des combinaisons génotypiques par un test de Student Newman-Keuls (SNK).

Tableau 17. Moyennes phénotypiques (AUDPC) des descendances du plan de croisements demi-diallèle ségrégeant pour le gène majeur *Vg*.

INTRODUCTION GENERALE

Le pommier est l'hôte de nombreux parasites nécessitant d'être contrôlés pour permettre une production commerciale correcte. Les différentes régions de production présentent des conditions climatiques favorables au développement de la tavelure (causée par le champignon phytopathogène *Venturia inaequalis*) qui font de cette maladie la principale source des pertes économiques en verger. A l'échelle mondiale, toutes les variétés cultivées (*Malus x domestica*) sont ainsi sensibles à la tavelure. Elles doivent donc subir des traitements phytosanitaires fréquents pour atteindre une qualité commerciale satisfaisante. Ajoutons que *V. inaequalis* développe des résistances à certains fongicides. Un des défis majeurs à relever en arboriculture est de baisser drastiquement le nombre d'applications de fongicides. Réduire le nombre de traitements phytosanitaires en vergers commerciaux permettrait à la fois de baisser le coût de production, et de diminuer les impacts négatifs des fongicides sur l'environnement et la santé humaine. La lutte génétique représente une des voies privilégiées pour y parvenir, sous réserve de pouvoir proposer des variétés résistantes dont l'efficacité se maintienne dans le temps et l'espace.

Les programmes d'amélioration génétique du pommier pour la résistance à la tavelure développés à travers le monde ont débuté il y a plus de 60 ans aux Etats-Unis surtout (Janick 2006) et en Allemagne. Ils se sont essentiellement basés sur l'utilisation de résistances à contrôle génétique simple. Une douzaine de gènes races-spécifiques conférant une résistance majeure envers *V. inaequalis* a été identifiée au sein du genre *Malus*. Le gène majeur *Vf*, apporté par l'espèce sauvage *Malus floribunda*, fut le plus employé : il est présent chez plus de 80% des variétés résistantes à la tavelure inscrites aujourd'hui dans le monde (Laurens 1999). Dès les années 70-80, des variétés portant le gène *Vf* ont été lancées, mais elles n'atteignaient pas encore un niveau agronomique suffisant pour qu'elles percent sur le marché. Et... dès la fin des années 80, deux nouvelles races de *V. inaequalis* capables de contourner le gène majeur *Vf* sont apparues en Allemagne (Parisi et al. 1993) et en Angleterre (Roberts and Crute 1994), puis elles ont été observées progressivement dans d'autres pays de l'Europe (Parisi et al. 2004). Cette perte d'efficacité du gène *Vf* montre la vulnérabilité d'une résistance monogénique face à l'adaptabilité de l'agent pathogène. Ce risque de contournement d'une résistance monogénique est d'autant plus prononcé chez les plantes pérennes car la pression de sélection reste constante au cours du temps, contrairement aux cultures annuelles où la pression de sélection exercée sur l'agent pathogène peut varier en fonction du renouvellement des variétés. En outre, la fréquence des populations pathogènes virulentes augmente d'autant plus que les plantes sont cultivées de façon homogène sur de grandes surfaces.

En plus de ces résistances majeures à déterminisme monogénique, il existe chez le pommier des résistances partielles à déterminisme polygénique supposées plus durables. Les loci à effet quantitatif ou QTL ('quantitative trait loci'), peuvent conférer une résistance

spécifique (efficace vis-à-vis d'une ou de quelques souches pathogènes) ou une résistance générale (efficace vis-à-vis de la (quasi-)totalité des souches testées).

Des études de cartographie génétique menées à notre Unité et par des équipes étrangères ont porté sur plusieurs génotypes de pommier ('Prima', 'Fiesta', 'Discovery', 'TN10-8', 'Durello di Forlì', 'Russian Seedling R12740-7A', ...). La variabilité génétique de *V. inaequalis* a été prise en compte pour la recherche de loci de résistance. Des loci présentant un spectre d'action large vis-à-vis de la variabilité de l'agent pathogène (QTL généraux ou à spectre large) et des loci présentant un spectre d'action restreint à certaines souches (gènes majeurs et QTL spécifiques ou à spectre étroit) ont ainsi pu être localisés sur la carte génétique du pommier (Bus et al. 2005b ; Bus et al. 2005a ; Calenge et al. 2004 ; Durel et al. 2000a ; Durel et al. 2003 ; Gygax et al. 2004 ; Hemmat et al. 2003 ; Maliepaard et al. 1998 ; Patocchi et al. 2004 ; Patocchi et al. 2005 ; Tartarini et al. 2004).

Une résistance durable à la tavelure doit posséder un spectre d'action complet et surtout stable envers les souches de *V. inaequalis* existantes (et à venir...). Comment construire des génotypes de pommier porteurs d'une résistance stable face à la variabilité et l'évolution potentielle de l'agent pathogène ?

Deux approches peuvent être envisagées pour définir des "règles de construction de génotypes" portant une résistance potentiellement durable. D'une part, on peut analyser en détails l'architecture génétique de variétés considérées comme porteuses d'une résistance durable (fort niveau de résistance avéré dans différentes conditions environnementales et face à la (quasi-)totalité de souches pathogènes rencontrées). L'objectif est alors d'identifier les loci de résistance et les éventuelles interactions entre ces loci qui pourraient être à l'origine d'une telle résistance. En vertu du principe que "le tout peut être plus que la somme des parties", l'objectif est bien d'identifier sur quelques génotypes 'durablement' résistants s'il existe une combinatoire particulière de facteurs de résistance qui représenterait une 'signature' potentielle d'architecture génétique durablement résistante. Cette démarche repose bien évidemment sur l'hypothèse que la durabilité résiderait davantage sur cette architecture génétique (combinaison particulière de gènes majeurs et de QTL à spectre d'action spécifique et/ou général) que sur la fonction (ou combinaison de fonctions) des loci impliqués ou sur le mode de déploiement spatio-temporel des génotypes face aux caractéristiques démo-génétiques de l'agent pathogène. Deux exemples de telles variétés de pommier à résistance à la tavelure potentiellement durable sont 'Discovery' et 'Dülmener Rosenapfel'. D'autre part, on peut chercher à construire différentes combinaisons génétiques contrastées puis rechercher et caractériser des souches pathogènes capables de contourner les constructions génétiques cumulant un nombre élevé de loci de résistance. L'analyse des pressions de sélection exercées sur les populations pathogènes par ces différentes

combinaisons et la recherche d'un coût de *fitness* potentiellement associé à la virulence des souches contournantes peuvent alors apporter des éléments pour identifier les combinaisons qui empêcheraient ou limiteraient durablement le développement ou le maintien de ces souches.

Dans ce contexte, mes travaux de recherche ont été orientés selon deux axes :

- recherche et caractérisation de nouveaux loci de résistance, en privilégiant les loci à large spectre d'action, dans (i) une variété connue pour sa forte résistance, et (ii) un ensemble de descendances du programme d'amélioration de l'INRA d'Angers connectées par leur pedigree ;

- construction de génotypes porteurs de différentes sources de résistance (majeure/partielle, spécifique/générale), identifiées préalablement et au cours de cette thèse, et comparaison de l'efficacité de ces combinaisons génétiques vis-à-vis de la variabilité de l'agent pathogène. Ces données nous ont servi de base à l'initiation d'un projet de modélisation du niveau de résistance des génotypes en fonction des loci de résistance portés et de la variabilité des souches de *V. inaequalis* rencontrées.

Les résultats obtenus dans ces deux axes nous ont apporté des premiers éléments de réponse sur la construction de génotypes porteurs d'une résistance efficace.

Le premier chapitre de ce manuscrit est une synthèse bibliographique, organisée en six parties posant le contexte dans lequel s'insère ce travail. Elles portent sur : (i) les bases génétiques de l'interaction hôte-agent pathogène, (ii) les facteurs pouvant moduler la durabilité des résistances, (iii) les différentes méthodologies d'exploration du déterminisme génétique d'un caractère agronomique complexe, (iv) les protagonistes de l'étude, à savoir le pommier cultivé (*Malus x domestica*) et l'agent pathogène responsable de la tavelure (*Venturia inaequalis*), (v) les connaissances acquises sur les bases génétiques de la résistance du pommier à la tavelure, et enfin (vi) les principes de sélection de la résistance du pommier à cette maladie.

Les deux chapitres suivants reprennent chacun des axes de recherche, comme décrit ci-dessus.

Enfin, le dernier volet de ce manuscrit reprend les principaux résultats obtenus durant cette thèse. Ces résultats sont le support d'une réflexion sur l'efficacité des méthodes de détection des loci de résistance, et sur l'utilisation de ces loci en vue d'une gestion durable de la résistance du pommier à la tavelure. En dernier lieu, nous évoquons la contribution essentielle mais non exclusive de la génétique dans le contexte global de la protection fruitière intégrée.

CHAPITRE 1 :

**SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE**

Cette synthèse bibliographique vise à souligner un certain nombre d'éléments qui constituent le cadre thématique et méthodologique dans lequel mon travail de thèse s'est déroulé. Une description totalement exhaustive des différents thèmes abordés n'a cependant pas été recherchée.

I- GENETIQUE DE L'INTERACTION PLANTE HOTE-AGENT PATHOGENE

Les plantes sont confrontées en permanence à d'innombrables parasites qui mettent potentiellement en danger leur survie. Elles ont donc développé des systèmes de défense sophistiqués qui agissent de manière passive ou active. A ce titre, il est intéressant de constater que la résistance est la règle et la sensibilité l'exception (Staskawicz et al. 1995).

I-1- Résistance non-hôte

La résistance non-hôte est définie comme la résistance développée par une espèce végétale entière envers toutes les souches ou races connues d'un agent pathogène donné (Heath 2000). La majorité des interactions plantes-agents pathogènes se produisant dans la nature est de type non-hôte. La résistance non-hôte a souvent été qualifiée de protection passive du fait de l'absence générale d'interaction visible (Dangl and Jones 2001 ; Osbourn 1996). Il semble que les défenses constitutives soient une composante importante de cette résistance non-hôte, particulièrement chez les plantes non domestiquées (Heath 2000). Ces défenses sont dites "constitutives" car elles pré-existent à la présence de l'agent pathogène. Les mécanismes de défense constitutive impliqueraient des barrières physiques (épaisseur de la cuticule, ...) et biochimiques (réservoirs de composés antimicrobiens) qui empêcheraient la colonisation des tissus végétaux par l'agent pathogène (Hutcheson 1998 ; Osbourn 1996). Par ailleurs, il est aussi admis que la résistance non-hôte peut impliquer des réactions de défense active basées soit sur une résistance basale induite par des éliciteurs généraux de l'agent pathogène ou 'pathogen-associated molecular patterns' (PAMP), soit sur des protéines végétales de type 'nucleotide binding site'-'leucine rich repeat' (NBS-LRR) codées par des gènes de résistance (*R*-genes) (Jones and Dangl 2006). Il a été démontré que les systèmes de perception des PAMP et les voies de signalisation impliquant ces PAMP chez les plantes étaient partiellement similaires à la résistance innée chez les animaux (Nomura et al. 2005 ; Nurnberger and Lipka 2005 ; Zipfel and Felix 2005). Des exemples de PAMP sont les lipopolysaccharides et les flagellines bactériennes, et les composés de la membrane cellulaire

fongique (Jones and Takemoto 2004). D'autre part, plusieurs protéines végétales de type NBS-LRR pourraient reconnaître simultanément les facteurs fongiques d'avirulence correspondants, et ainsi activer les systèmes de défense de la plante (Dangl and Jones 2001). Plusieurs gènes de résistance non-hôte pourraient aussi intervenir dans la résistance hôte ; par exemple, Aarts et al. (1998) ont montré que la protéine 'enhanced disease susceptibility 1' (EDS1), nécessaire pour la résistance à des agents pathogènes hôtes d'*Arabidopsis thaliana*, intervient également dans la résistance non-hôte à *Peronospora parasitica* et *Albugo candida* qui sont pathogènes des *Brassica*. La résistance non-hôte constitutive ne produit aucun symptôme visible, d'où la dénomination de protection passive ; en revanche, la résistance non-hôte induite ou active résulte en une réponse hypersensible (HR) (Mysore and Ryu 2004).

I-2- Résistance hôte

La résistance hôte est exprimée par certains génotypes d'une même espèce végétale, par ailleurs sensible, soit envers tous les génotypes connus d'un agent pathogène donné (résistance non spécifique) soit envers certains génotypes de cet agent pathogène (résistance spécifique). Cette résistance est dite induite car elle est déclenchée par l'attaque de l'agent pathogène, ce qui implique une reconnaissance de ce dernier (ou des perturbations métaboliques qu'il provoque) par la plante.

I-2-1- Résistance qualitative

La résistance des plantes est souvent contrôlée par des gènes conférant de hauts niveaux de résistance (résistance totale, le plus souvent) mais seulement envers certains génotypes pathogènes : on parle de résistance qualitative race-spécifique. Ce type de résistance est à hérédité mendélienne et sous le contrôle d'un seul gène (résistance monogénique) : la présence de l'allèle favorable confère la résistance, et réciproquement, l'allèle défavorable entraîne la sensibilité.

Ces résistances monogéniques qualitatives sont faciles à sélectionner dans les descendance de croisements, d'où leur large utilisation dans la création des nouvelles variétés résistantes. De plus, les gènes contrôlant ces résistances, aussi appelés gènes majeurs (ou *R-genes* en anglais), peuvent être facilement positionnés sur une carte génétique au voisinage de marqueurs moléculaires.

Tableau 1. Relation "gène-pour-gène" dans le cas d'un agent pathogène haploïde (d'après Flor 1971). Une résistance efficace n'est déclenchée que si l'agent pathogène possède un allèle d'avirulence (*Avr*) qui est reconnu par un allèle de résistance (*R*) de la plante hôte (interaction incompatible). Si l'un ou les deux partenaires possèdent les allèles non fonctionnels ou récessifs, la maladie se développe (interaction compatible).

| | | Plante | |
|-----------|--------------------------|---------------------------------------|------------------------|
| | | Résistante (<i>RR</i> ou <i>Rr</i>) | Sensible (<i>rr</i>) |
| Pathogène | Avirulent (<i>Avr</i>) | Résistance | Maladie |
| | Virulent (<i>avr</i>) | Maladie | Maladie |

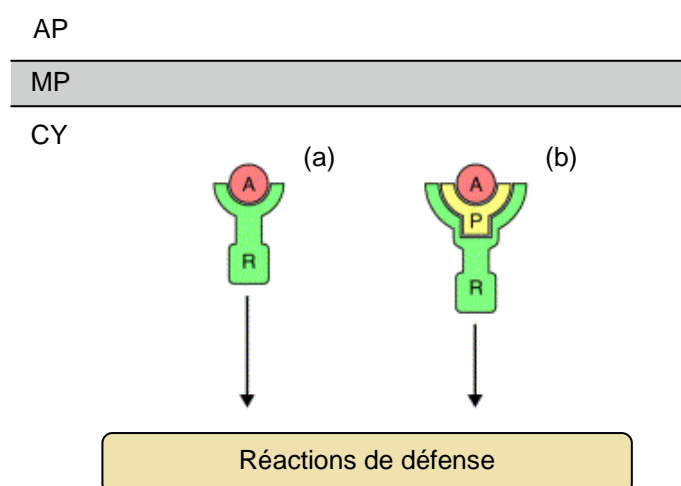


Figure 1. Interprétation biochimique du modèle "gène-pour-gène" (d'après Bonas and Lahaye 2002). **(a)** Le modèle de base ligand-récepteur suppose une interaction directe entre une protéine codée par le gène d'avirulence (*A*) de l'agent pathogène et une protéine codée par le gène de résistance (*R*) de la plante hôte. **(b)** Selon la théorie de la "protéine de garde", la protéine *A* se fixe sur une cible moléculaire *P* de la plante hôte, et ce complexe est perçu par la protéine *R*. AP : apoplaste ; MP : membrane plasmique ; CY : cytoplasme.

I-2-1-1- Relation "gène-pour-gène"

La majorité des gènes majeurs de résistance sont impliqués dans une relation dite "gène-pour-gène". Flor (1971) est le premier à avoir proposé le modèle "gène-pour-gène" pour l'interaction lin (*Linum usitatissimum*)-rouille (*Melampsora lini*). Le concept de Flor prédit que ces gènes interagissent par paire : "A chaque gène (*R*) conditionnant la résistance chez l'hôte, il existe chez le parasite un gène (*Avr*) correspondant qui dicte sa pathogénicité", la résistance étant dominante sur la sensibilité et l'avirulence dominante sur la virulence. L'interaction est incompatible tant que les deux protagonistes sont porteurs d'un allèle dominant et fonctionnel du gène *R* et du gène *Avr* ; dans tous les autres cas, l'interaction est compatible, autrement dit la maladie se développe (Tableau 1). Ce modèle génétique des relations entre plantes hôtes et agents pathogènes a ensuite été confirmé dans de nombreuses interactions impliquant des champignons, notamment *Venturia inaequalis*, mais également des oomycètes, des bactéries, des virus, des nématodes et des insectes (Behura et al. 2004 ; Van't Slot and Knogge 2002). L'interaction *Malus-Venturia inaequalis* fut l'un des premiers exemples pour lesquels la relation "gène-pour-gène" a été suggérée en se basant sur la ségrégation des gènes d'avirulence chez ce champignon (Boone and Keitt 1957 ; Williams and Shay 1957). Au moins trois des gènes majeurs identifiés sont impliqués dans une relation "gène-pour-gène" : *Vf*, *Vg* et *Vh8* (Bénaouf and Parisi 2000 ; Bus et al. 2005b).

La relation "gène-pour-gène" est supposée être un événement de reconnaissance spécifique, directe ou indirecte, entre la protéine codée par le gène de résistance de l'hôte (protéine *R*) et la protéine codée par le gène d'avirulence correspondant de l'agent pathogène (protéine *Avr*) (Dangl and McDowell 2006). Le modèle de base ligand/récepteur suppose une reconnaissance directe entre une protéine élicitrice de l'agent pathogène et une protéine réceptrice de l'hôte (Figure 1 (a)). Ces interactions physiques entre protéine *Avr* et protéine *R* ont été beaucoup recherchées mais rarement observées. Elles ont ainsi été mises en évidence dans le cas de l'interaction entre *AvrPita*, isolée de *Magnaporthe grisea*, et *Pita* du riz (Jia et al. 2000), de l'interaction entre la protéine de résistance d'*Arabidopsis thaliana* *RRS1-R* et la protéine d'avirulence de *Ralstonia solanacearum* *PopP2* (Deslandes et al. 2003), ou de l'interaction entre les protéines *L5*, *L6* et *L7* du lin et les produits des gènes *AvrL567* de *Melampsora lini* (Dodds et al. 2006). Le modèle ligand/récepteur n'est donc pas satisfaisant dans la plupart des interactions pour lesquelles les protéines *Avr* et les protéines *R* ont été caractérisées au niveau moléculaire. D'autres hypothèses, se basant sur une interaction indirecte et non plus directe, ont alors été formulées (Bonas and Lahaye 2002). La théorie de la "protéine de garde" (Dangl and Jones 2001) est privilégiée : le facteur d'avirulence se fixerait sur une cible moléculaire de la plante hôte, et ce complexe serait perçu par la protéine de résistance (Figure 1 (b)). Ce phénomène a été observé pour l'interaction *Avr2-Cf-2* chez le

pathosystème tomate (*Solanum lycopersicum*)-moisissure brune (*Cladosporium fulvum*). L'éliciteur Avr2 de *C. fulvum* se lie à la protéase Rcr3 de la tomate pour former un complexe, lequel induit une réponse de type hypersensible sous le contrôle de Cf-2 (Rooney et al. 2005).

I-2-1-2- Gènes de résistance

Au cours des quinze dernières années, plus de 40 gènes de résistance ont été caractérisés chez des espèces de plantes modèles ou cultivées. Ces gènes confèrent une résistance à des agents pathogènes divers, incluant des champignons, des oomycètes, des bactéries, des virus, des nématodes ou des insectes. Malgré cette diversité phylogénétique, la grande majorité des protéines prédites à partir de ces gènes de résistance partagent des structures similaires, ce qui souligne le maintien des modes fondamentaux de reconnaissance et de défense au cours de l'évolution et de la diversification des espèces végétales (Hammond-Kosack and Parker 2003 ; Martin et al. 2003). La majorité des protéines de résistance possèdent des domaines NBS ('nucleotide binding site') et LRR ('leucine rich repeat'), à localisation cytoplasmique. L'homologie des régions NBS avec celles des protéines de la famille des ATPases ou des protéines G indique que la fonction de telles protéines impliquerait la fixation et l'hydrolyse de nucléotides triphosphates ATP ou GTP. Le domaine LRR serait impliqué dans des interactions protéine-protéine, d'où son rôle potentiel dans la reconnaissance de l'agent pathogène. Les protéines NBS-LRR peuvent être différenciées en deux classes selon le domaine présent à leur extrémité N-terminal. Certaines possèdent un domaine TIR ('tol interleukin receptor'), domaine présentant des homologies avec la protéine Toll de la *Drosophila* et avec la protéine interleukine-1 (IL-1) des mammifères. Toll et IL-1 sont connues pour participer à l'activation de facteurs de transcription ; le domaine TIR serait donc impliqué dans les cascades de signalisation cellulaire. D'autres protéines NBS-LRR possèdent un domaine CC ('coiled coil'), domaine qui interviendrait dans les processus de signalisation cellulaire par homo- ou hétérodimérisation de protéines. Moins communes sont les protéines de résistance ayant un domaine sérine/thréonine kinase ou un domaine LRR extracellulaire. Ces dernières possèdent un domaine transmembranaire et une extrémité C-terminal cytoplasmique courte ou un domaine kinase. Le domaine sérine/thréonine kinase est potentiellement impliqué dans des réactions de phosphorylation associées aux cascades de signalisation.

Les gènes de résistance sont généralement considérés comme des déterminants de la spécificité de certains cultivars d'une espèce hôte donnée. Cependant les interactions "gène-pour-gène" peuvent aussi déterminer la spécificité d'espèce hôte. Par exemple, Fillingham et al. (1992) ont montré que des souches de l'agent pathogène du pois *Pseudomonas syringae* pv

pisi, portant le gène *avrPph3* de l'agent pathogène du haricot *P. syringae* pv *phaseolicola*, étaient avirulentes envers tous les cultivars de pois testés.

I-2-1-3- Gènes d'avirulence

La plupart des gènes d'avirulence clonés actuellement sont d'origine bactérienne. Plus de 40 gènes d'avirulence bactériens ont été caractérisés (Bonas and Lahaye 2002) depuis le clonage du premier gène (*AvrA*) isolé chez *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, pathogène du soja (Staskawicz et al. 1984). Les gènes d'avirulence fongiques sont plus difficiles à isoler, principalement du fait de la taille des génomes et des difficultés rencontrées pour manipuler génétiquement les champignons. L'isolement du premier gène d'avirulence fongique date de 1991 (Van Kan et al. 1991) : *Avr9* isolé chez *Cladosporium fulvum*, pathogène de la tomate. A ce jour, une dizaine de gènes d'avirulence fongiques a pu être caractérisée. Contrairement aux gènes de résistance, les gènes d'avirulence ne présentent généralement pas d'homologie de séquences (Bonas and Lahaye 2002).

Il est communément accepté que les gènes d'avirulence sont impliqués dans le pouvoir pathogène (Van't Slot and Knogge 2002). Cette hypothèse est confortée par l'induction de l'expression de gènes *Avr* et par la sécrétion de protéines *Avr* au cours de l'infection. Il est proposé que des gènes d'avirulence inhibent les réactions de défense de l'hôte ou protègent l'agent pathogène de celles-ci, interviennent dans la nutrition de l'agent pathogène au cours du processus infectieux ou pendant les phases de vie saprophytique, ou encore améliorent la compétitivité de l'agent pathogène vis-à-vis d'autres microorganismes avant et pendant l'infection.

De nombreuses interactions entre plantes et champignons, bactéries, virus, nématodes ou insectes se conforment à ce modèle "gène-pour-gène". Pourtant, ces interactions peuvent aussi faire appel à des mécanismes de résistance à caractère récessif comme le gène *Mlo* de résistance de l'orge à l'oidium (Jørgensen 1992), les gènes de type *eIF4E* chez le piment (Ruffel et al. 2002) et d'autres solanacées vis-à-vis de potyvirus, ou encore le gène *LOV1* de sensibilité au champignon *Cochliobolus victoriae* chez *Arabidopsis thaliana* (Lorang et al. 2007). Ces interactions peuvent encore faire appel à des mécanismes de résistance multigénique, ou à des mécanismes de résistance monogénique mais pouvant être modulés par des activateurs ou des inhibiteurs (Brown 2002).

I-2-2- Résistance quantitative

La résistance quantitative varie de façon continue d'une résistance presque imperceptible à une résistance relativement forte. Elle peut se manifester à différents niveaux : fréquence d'infection, taille des lésions, et taux de sporulation par lésion (Do Vale et al. 2001). Ce type de résistance est souvent à déterminisme oligo- (nombre restreint de gènes) ou polygénique et résulte donc de l'effet combiné de plusieurs facteurs de résistance. Mais des résistances quantitatives monogéniques sont bien sûr aussi observables. Ces facteurs de résistance à effet quantitatif sont appelés QTL ('quantitative trait loci'), ou loci de caractères quantitatifs en français.

Les résistances polygéniques quantitatives sont plus difficiles à sélectionner que les résistances monogéniques qualitatives, et ont donc été longtemps négligées. La cartographie génétique de QTL ('QTL mapping') et l'estimation de leur contribution dans la variation phénotypique ont été permises grâce au développement des marqueurs moléculaires (Young 1996).

Différents qualificatifs ont été utilisés au cours du temps pour distinguer les différents types de résistance. Une association préférentielle mais non systématique entre les concepts de résistance horizontale, quantitative, partielle, polygénique, non spécifique, et inversement, entre résistance verticale, qualitative, complète, monogénique, spécifique a été suggérée (Van der Plank 1968). Toutefois des arguments viennent infirmer, du moins partiellement, cette association terminologique. En effet, la distinction entre résistances horizontale et verticale suggère qu'elles ne peuvent coexister dans un même génotype, or cela peut être observé. De même, certains gènes "seuls" ne peuvent conférer qu'une résistance partielle, tel est le cas du gène *Lr34* du blé qui confère une résistance partielle insuffisante lorsque la pression de maladie devient trop forte (Singh and Gupta 1992). A l'inverse, les résistances polygéniques peuvent être très efficaces voire totales. Enfin, certaines résistances polygéniques montrent un certain degré de spécificité. Par exemple, chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*), huit des dix QTL détectés par Geffroy et al. (2000) pour la résistance au champignon *Colletotrichum lindemuthianum* ont montré des spécificités de souches. Le même type de résultats a été obtenu pour de très nombreux pathosystèmes (e.g., pommier-tavelure, Calenge et al. 2004 ; peuplier-rouille, Jorge et al. 2005 ; orge-rouille, Marcel et al. 2008). Cette spécificité supporte l'hypothèse posée par Parlevliet et Zadoks (1977) selon laquelle la résistance polygénique pourrait se baser sur des interactions "gène-pour-gène" nommées alors interactions "gène-mineur-pour-gène mineur".

I-2-3- Organisation génomique des loci de résistance

On sait de longue date que les gènes majeurs de résistance peuvent se regrouper à un même locus génétique. On parle de "cluster" pour désigner le regroupement de gènes génétiquement (et physiquement) liés sur une région génomique particulière. Les premiers travaux ayant abouti à cette conclusion sont des études génétiques. Le locus *M* du lin compte ainsi au moins sept spécificités de résistance vis-à-vis de *Melampsora lini*. Des recombinaisons peuvent avoir lieu entre des membres de ce groupe de gènes, lesquels sont donc séparés mais étroitement liés (Flor 1965). Le locus *L* de la même espèce présente au moins treize spécificités de résistance. L'absence de recombinants possédant deux spécificités de résistance a conduit à la conclusion que les gènes de ce groupe étaient probablement alléliques les uns des autres (Flor 1965). C'est la cartographie physique et l'isolement des gènes de résistance qui ont véritablement démontré que la plupart des gènes appartiennent soit à des familles multigéniques soit à des séries alléliques avec plus ou moins d'allèles fonctionnels. En outre, les gènes d'un même cluster peuvent conférer des spécificités de résistance différentes vis-à-vis de diverses souches d'un même agent pathogène (ou de pathogènes différents).

De manière similaire, pour la détection de QTL, il arrive fréquemment que lorsque plusieurs notations de la résistance sont effectuées dans la même population envers plusieurs souches d'un même agent pathogène (e.g., Caranta et al. 1997 ; Chen et al. 2003), ou bien à différents stades de croissance de la plante (e.g., Qi et al. 1998), ou encore sur des organes différents de la plante (e.g., Visker et al. 2003), des QTL détectés à partir de composantes différentes soient localisés, à l'aide de marqueurs moléculaires communs, dans une même région génomique. Dès lors, on peut se demander si les QTL identifiés n'en sont qu'un (avec présence d'une série allélique éventuelle), ou si plusieurs QTL physiquement liés coexistent. Pour répondre à cette question, une cartographie fine voire un clonage du (des) QTL identifié(s) seraient nécessaires.

La co-localisation de gènes majeurs avec des QTL de résistance a été observée chez de nombreuses espèces végétales tels le colza (Manzanares-Dauleux et al. 2000), le haricot (Kelly and Vallejo 2004) et le peuplier (Jorge et al. 2005). Si un gène majeur et un QTL ont été identifiés dans la même descendance envers des souches différentes d'un même agent pathogène, dans des environnements différents, à différents stades de croissance, ou sur des organes végétaux différents, l'hypothèse que le QTL corresponde à un effet résiduel du gène majeur de résistance est souvent évoquée (Koch and Parlevliet 1991 ; Chantret et al. 1999). Cette hypothèse n'est bien sûr plausible que si le même allèle favorable intervient pour le QTL et le gène majeur. Certains envisagent d'utiliser les effets résiduels hypothétiques des gènes majeurs contournés en sélection (Michelmore 1995). La fréquence des co-localisations

génétiques entre gènes majeurs et QTL de résistance suggère fortement que certains QTL pourraient être semblables à des gènes majeurs d'un point de vue structural et vraisemblablement fonctionnel (Gebhardt and Valkonen 2001). L'allèle favorable d'un QTL pourrait être un membre d'une famille multigénique ou d'une série allélique. De tels QTL pourraient ainsi être impliqués dans la phase de reconnaissance de l'agent pathogène. Comment expliquer alors la différence d'efficacité entre des gènes majeurs et des QTL ? Il se peut que les QTL soient moins efficaces parce qu'ils codent pour des protéines montrant une plus faible affinité pour leur(s) ligand(s) (pathogène ou végétal). On imagine aisément que des modifications du ou des sites de fixation au(x) ligand(s) conduisent à une reconnaissance moins efficace. On peut également imaginer que les QTL reconnaissent des ligands présents en plus faible concentration : le manque d'évènements de reconnaissance conduirait à une plus faible réponse de défense. On peut rajouter un degré de complexité à ces hypothèses en supposant que les produits des gènes majeurs et QTL forment des oligomères, comme l'évoque Gebhardt et Valkonen (2001). De fait, les gènes clonés à ce jour possèdent souvent des motifs permettant une oligomérisation (domaine LRR). Une co-localisation génétique n'apporte cependant pas la preuve d'une similarité fonctionnelle entre gènes majeurs et QTL de résistance. Les preuves définitives d'une telle similarité sont rares puisque les QTL sont difficiles à cloner. Elles sont fortuites et proviennent jusqu'à présent de travaux de caractérisation d'un cluster de gènes de résistance (Ori et al. 1997). Le clonage en cours de plusieurs QTL de résistance devrait apporter des éléments supplémentaires sur cette question.

Des exemples de co-localisation entre des QTL et des gènes de défense ont été reportés dans plusieurs pathosystèmes (Gebhardt and Valkonen 2001 ; Geffroy et al. 2000 ; Pflieger et al. 2001 ; Vergne et al. 2008). Si des QTL correspondent à des gènes de défense, on peut s'interroger sur la façon dont les variations alléliques conduisent à des variations phénotypiques. Si les produits de ces gènes sont des enzymes, des modifications des sites de fixation aux substrats ou des sites effecteurs de ces enzymes pourraient aboutir à une moindre efficacité. On peut également imaginer des modifications d'éléments régulateurs des promoteurs de ces gènes influençant la régulation de l'activité de ces gènes. On sait déjà que certains gènes de défense sont présents en plusieurs copies dans le génome, et que leur expression est régulée différemment dans le temps ou dans l'espace (tissus végétaux).

Il semble que l'organisation en clusters de facteurs de résistance présente des avantages évolutifs qui permettent à la plante hôte de s'adapter plus rapidement à la variabilité de l'agent pathogène (Richter and Ronald 2000).

I-2-4- Voies de défense déclenchées

Les réponses incompatibles sont fréquemment associées à l'induction rapide d'une mort cellulaire localisée au site d'infection de l'agent pathogène, réaction qualifiée de réponse hypersensible (HR). La HR se manifeste par une nécrose localisée des tissus infectés empêchant la prolifération de l'agent pathogène dans la plante. Ces manifestations phénotypiques peuvent grandement varier, allant de la mort d'une seule cellule, et donc pas visible à l'œil nu, à une nécrose plus étendue. La mort cellulaire hypersensible des plantes est assimilée à la mort cellulaire programmée rencontrée chez les animaux (Heath 2000).

La HR est précédée de flux d'ions (influx de calcium et efflux de potassium) et de la production rapide de formes actives de l'oxygène. L'induction de la HR est souvent associée à des niveaux élevés d'acide salicylique (SA), un régulateur clé des mécanismes de défense, à la synthèse de protéines PR ('pathogenesis-related') qui possèdent des propriétés antimicrobiennes (glucanases, chitinases), à un épaissement des parois cellulaires, et à la production de composés antimicrobiens appelés phytoalexines (Watanabe and Lam 2006).

En plus de ces réactions de défense locales face à l'attaque d'un agent pathogène, la plante déclenche des mécanismes de défense systémique. La SAR ('systemic acquired resistance') est ainsi activée lorsqu'un agent pathogène induit une nécrose localisée pendant la phase d'infection initiale. Ceci active alors des réactions de défense dans les tissus non infectés de la plante. La SAR confère une résistance accrue de la plante entière (ou des organes voisins) face à une attaque pathogène ultérieure vis-à-vis non seulement de l'agent pathogène responsable de la première infection mais également d'autres agents pathogènes. La SAR est SA-dépendante et est associée à l'accumulation de protéines PR (Hammond-Kosack and Parker 2003 ; Métraux et al. 2002 ; Vallad and Goodman 2004).

I-3- Evolution des pathosystèmes

I-3-1- Coévolution en milieu naturel

Dans les écosystèmes naturels, deux scénarii évolutifs, non exclusifs, sont souvent retenus pour expliquer la biodiversité des populations végétales et pathogènes. La "course aux armements" ('arms race') se définit comme un phénomène d'escalade évolutive (on parle aussi de sélection positive) : les hôtes et les agents pathogènes sont sélectionnés continuellement sur la base de l'apparition de nouvelles résistances ou de nouvelles virulences, respectivement. L'évolution des populations hôtes est en effet contrainte et les

plantes doivent régulièrement développer de nouvelles résistances en réponse à l'évolution de nouvelles virulences dans les populations pathogènes. Ce modèle évolutif prédit également que les gènes de résistance seraient relativement récents et qu'une succession de balayages sélectifs des loci de résistance se serait produite dans les populations hôtes, conduisant à la perte des résistances contournées (Michelmore and Meyers 1998 ; Stahl and Bishop 2000). Ce modèle ne permet donc pas d'expliquer le polymorphisme observé aux loci de résistance. A l'inverse, le modèle de la "guerre des tranchées" ('trench warfare') explique le polymorphisme des loci de résistance et d'avirulence par l'effet d'une sélection équilibrante, ou sélection fréquence-dépendante (Stahl et al. 1999). Ce modèle repose sur un équilibre entre la sélection de résistances/virulences et le coût de résistance/virulence occasionné. Les résistances et les avirulences seraient ainsi conservées dans un pool global dans les populations hôtes et pathogènes. La fréquence des résistances fluctue en fonction de la fréquence des virulences correspondantes, les résistances ou virulences inutiles tendant à devenir rares dans les populations hôtes ou pathogènes. Cela crée un système dynamique dans lequel les allèles de résistance rares présentent un avantage évolutif transitoire avant d'être contre-sélectionnés du fait de l'augmentation de la fréquence des virulences correspondantes. Le niveau de polymorphisme élevé observé à certains loci de résistance est cohérent avec ce modèle de sélection équilibrante et indique qu'une variabilité génétique très ancienne peut être maintenue pendant de nombreuses années, comme ce fut le cas du locus *Rpm1* d'*Arabidopsis thaliana* (Stahl et al. 1999). En outre, dans le pathosystème *A. thaliana*-*Poronospora parasatica*, un niveau de polymorphisme élevé a été observé aux loci *ATR13-RPP13*, ce qui indique qu'une sélection équilibrante s'exerce non seulement sur les gènes de résistance mais également sur les gènes d'avirulence dans les populations hôtes et pathogènes sauvages (Allen et al. 2004). En dernier lieu, le mode d'interaction, directe ou indirecte, entre le produit du gène de résistance et le produit du gène d'avirulence pourrait conduire la coévolution hôte-agent pathogène, une interaction directe favorisant une sélection positive alors qu'une interaction indirecte favoriserait une sélection équilibrante (Dangl and McDowell 2006 ; Dodds et al. 2006). Enfin, une analyse de la littérature montre que la forme dominante de sélection agissant sur les différents gènes impliqués dans la défense semble différer selon les différentes étapes de sa mise en place (reconnaissance, transmission du signal, déclenchement des mécanismes de défense) (Tiffin and Moeller 2006).

I-3-2- Adaptation en systèmes cultivés

Dans les écosystèmes cultivés, il n'y a pas de coévolution naturelle des relations plantes-agents pathogènes dans la mesure où la variabilité génétique de la population hôte

est quasiment nulle et imposée par les variétés cultivées. Les gènes de résistance impliqués dans une relation "gène-pour-gène" sont souvent utilisés pour protéger de nombreuses plantes cultivées contre les agents pathogènes. Ces variétés résistantes sont ensuite exploitées sur de grandes surfaces, le plus souvent en monoculture. Une telle homogénéité des populations hôtes exerce alors une très forte pression de sélection sur les populations pathogènes qui s'adaptent rapidement à la résistance par la sélection de souches virulentes. Ces contournements ont souvent conduit à une perte d'efficacité à plus ou moins brève échéance des nouvelles résistances (Crute and Pink 1996), et contraint les sélectionneurs à des cycles répétés de remplacements de cultivars (cycles 'boom and bust', McDonald and Linde 2002) nécessitant l'introgression continue de nouvelles résistances. Des stratégies alternatives de déploiement des gènes de résistance spécifique sont proposées et consistent, par exemple, à cumuler des résistances spécifiques dans une même variété, à cultiver en mélange des variétés portant différents gènes de résistance ou à alterner dans l'espace et/ou le temps les gènes de résistance utilisés (Mundt 2002 ; Ohtsuki and Sasaki 2006 ; Pink 2002).

II- DURABILITE DES RESISTANCES

Une résistance est dite durable "lorsqu'elle reste efficace dans une variété cultivée sur de grandes surfaces, pendant une longue période de temps et dans des conditions favorables à la maladie" (Johnson 1981). Les termes de cette définition restent vagues. "Pendant une longue période de temps" peut représenter une valeur très variable selon l'échelle à laquelle on se place et le type de culture (annuelle ou pérenne). Le terme de la durabilité peut être un objectif "économique" : l'échelle de temps pendant laquelle la résistance devrait être efficace dépendrait de la durée d'exploitation d'une variété. Ainsi pour des espèces à fort taux de renouvellement variétal, tel le blé, on pourra tolérer une durabilité plus faible que pour des espèces à faible taux de renouvellement, telles les espèces fruitières ou la vigne. L'efficacité d'une résistance est également une notion floue qui dépend directement du contexte économique et des exigences commerciales. L'efficacité pourrait alors être définie comme le niveau de résistance minimal requis pour ne pas occasionner de pertes économiques. Dans le cas du pommier, une pomme présentant la moindre tache de tavelure n'est pas vendable en première catégorie, l'arboriculteur doit ainsi éradiquer cette maladie des vergers.

La validation de la durabilité d'une résistance est difficile étant donné qu'elle est établie *a posteriori* : l'introduction d'une nouvelle résistance reste d'une certaine manière un pari sur sa durabilité. Les chercheurs tentent de définir des prédictors de la durabilité potentielle d'une résistance (c'est-à-dire avant qu'elle ne soit déployée dans les cultures) (Compte-rendu Séminaire "Durabilité des résistances aux bioagresseurs des cultures", mai

2008,

http://www.inra.fr/sante_plantes_environment/actualites/durabilite_des_resistances_aux_bioagresseurs_des_cultures). En se positionnant du côté de l'hôte, des prédicteurs de la durabilité peuvent être la nature polygénique de la résistance, la diversité des mécanismes contrôlés par les facteurs de résistance et la largeur de leur spectre d'action. Du côté de l'agent pathogène, le nombre d'évènements mutationnels menant à la virulence, le coût de *fitness* associé à la virulence sont parfois corrélés à la durabilité de la résistance. Il convient de prendre conscience que chacun des prédicteurs ne fera que participer à la prédiction globale de la durabilité. La durabilité n'est pas une propriété limitée au gène ou au génotype : elle dépend également du déploiement temporel et spatial de ces génotypes, de l'environnement biotique et de la conduite des cultures. Plusieurs facteurs modulant la durabilité d'une résistance ont ainsi été identifiés : type de loci de résistance, type de cumuls de loci de résistance, variabilité et cycle de reproduction de l'agent pathogène, épidémiologie, conditions de développement de la maladie, état physiologique des plantes, mode de conduite culturale, étendue des surfaces cultivées, degré d'intensification des cultures, gestion des résistances, ... (Johnson 1984 ; Zadocks 1993). Au-delà de leur identification, il faut hiérarchiser ces facteurs (et évaluer leurs interactions) selon leur importance effective dans les systèmes agricoles et déterminer les leviers sur lesquels il est possible d'agir ("on ne peut pas modifier un taux de mutation, mais on peut décider de labourer ou non").

II-1- Potentiel évolutif d'un agent pathogène

La durabilité d'une résistance correspond à un risque de contournement par la population pathogène après introduction du cultivar dans l'agrosystème. La population pathogène peut être capable d'adaptations plus ou moins rapides selon ses caractéristiques biologiques et dynamiques. McDonald et Linde (2002) ont ainsi classé les bioagresseurs (bactéries, champignons et nématodes) en fonction de leur potentiel évolutif et ont établi des classes de risque de contournement des résistances. Le potentiel évolutif d'une population pathogène prend en compte son système de reproduction, les flux de gènes, le taux de mutations et la taille efficace de la population. Les populations pathogènes avec un fort potentiel évolutif contournent plus facilement les résistances que les populations à faible potentiel évolutif. Les agents pathogènes présentant le risque le plus élevé correspondent alors à des agents pathogènes possédant un système de reproduction mixte (sexuée et asexuée), un fort potentiel de flux génétiques, un fort taux de mutations et une taille efficace de population grande. Prenons l'exemple du champignon responsable de la tavelure du pommier, *Venturia inaequalis*. Selon l'échelle de risque de 1 à 9 élaborée par les auteurs sus cités, cet agent pathogène est noté 6. Un risque considérable lui est attribué en raison d'un

système de reproduction mixte, d'une capacité de dispersion moyenne (~100 m) et d'une taille efficace de population moyenne. Le potentiel évolutif d'une population pathogène nous informe quant au risque global de contournement mais ne prédit pas de manière absolue si une résistance particulière sera effectivement contournée. Par exemple, le champignon *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* responsable de l'oïdium de l'orge présente un fort potentiel évolutif (note 9 selon l'échelle de McDonald et Linde), or la résistance apportée par le gène majeur *mlo* à cet agent pathogène s'est révélée durable chez l'orge (Jørgensen 1992).

II-2- Gamme d'hôtes

Les agents pathogènes présentant une gamme d'hôtes étroite sont essentiellement des microorganismes biotrophes ou hémi-biotrophes. La résistance à ces agents pathogènes est principalement race-spécifique, résistance qui se traduit par une HR. Les résistances les plus durables vis-à-vis de ces agents pathogènes à gamme d'hôtes étroite sont partielles et additives. Par ailleurs, les résistances vis-à-vis des agents pathogènes ayant une plus large gamme d'hôtes et des conditions de croissance moins contraignantes sont principalement races-non-spécifiques et apparemment plus durables (Boyd 2006).

II-3- Coût de *fitness*

Les gènes majeurs ayant été, jusqu'à présent, les principaux outils utilisés dans la sélection pour la résistance, les "coûts de virulence" observés sont principalement dus à des mutations de gènes d'avirulence. Aussi, l'impact sur la valeur sélective des agents pathogènes associé à des résistances quantitatives n'a généralement pas été rapporté.

Il est désormais admis que de nombreux gènes d'avirulence sont des facteurs de pathogénicité, requis par l'agent pathogène pour infecter et établir une interaction compatible avec la plante hôte (Jones and Dangl 2006). L'apparition d'une virulence est potentiellement associée à une diminution de la valeur sélective (aussi appelée "coût de virulence") chez un agent pathogène. La valeur sélective (*fitness*) est l'aptitude d'un organisme à survivre et à se reproduire. Chez les phytopathogènes, plusieurs critères tels le taux de multiplication, la capacité à infecter, la quantité de maladie causée (agressivité) et l'efficacité de dispersion de l'agent pathogène sont utilisés pour mesurer la valeur sélective (Leach et al. 2001). Van der Plank (1968) considère que la *fitness* est la force qui guide l'évolution et la stabilité des pathosystèmes en agriculture, et il suggère que le passage de l'avirulence à la virulence n'aurait lieu que si le contournement de la résistance est nécessaire à la survie ou la persistance de l'agent pathogène. Un "coût de virulence" a été mis en

évidence pour la première fois chez la bactérie *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Une mutation dans le gène d'avirulence *AvrBs2* se traduit non seulement par l'acquisition de la virulence sur des piments portant le gène de résistance *Bs2* mais également par une diminution du taux de multiplication de la bactérie sur des piments sensibles (Swords et al. 1996). Les exemples se sont multipliés chez les bactéries, et dans une moindre mesure chez les champignons. Récemment Huang et al. (2006) ont montré que les souches avirulentes *AvrLm4* de *Leptosphaeria maculans* produisaient, chez le colza, des lésions plus importantes en nombre et en taille que les souches devenues virulentes à ce locus. Le "coût de virulence" affecté à un agent pathogène conduit ainsi à accroître la durabilité du gène de résistance correspondant chez la plante hôte comme dans le cas du pathosystème riz-*Xanthomonas oryzae* (Vera-Cruz et al. 2000 ; Leach et al. 2001). Toutefois, le coût associé à l'acquisition d'une virulence n'est pas une loi générale. De plus, il peut être dans certains cas compensé par une fonction redondante ou par des mutations compensatoires (Hartl and Taubes 1996 ; Yang et al. 1996).

En lien avec le coût de *fitness*, le nombre et le type de mutations nécessaires pour le passage du statut avirulent au statut virulent d'un gène d'avirulence peuvent aussi devenir des critères prédictifs de la durabilité du gène de résistance correspondant, comme proposé dans le cas du pathosystème piment-virus Y de la pomme de terre (Ayme et al. 2007).

II-4- Nature de la résistance

Les résistances monogéniques qualitatives sont généralement considérées comme moins durables que les résistances polygéniques quantitatives car l'effet du gène de résistance de la plante est principalement neutralisé par une perte de fonction du gène d'avirulence correspondant chez l'agent pathogène. Le facteur d'avirulence n'est plus reconnu par le facteur de résistance, et l'agent pathogène peut alors infecter la plante. Pourtant, certains exemples montrent la durabilité d'une résistance de type monogénique. Tel est le cas de la résistance au jaunissement du chou causé par *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* : cette résistance monogénique est restée efficace depuis son introduction il y a 90 ans (Bosland and Williams 1988). La résistance à la rouille du blé (causée par *Puccinia triticina*), conférée par le gène *Lr34*, s'est montrée hautement efficace pendant plus de 30 ans en Amérique du Nord, du Sud, et en Australie. Bien que la résistance due à *Lr34* soit améliorée par la combinaison avec d'autres gènes *Lr*, *Lr34* permet à lui seul une résistance faible mais durable et à large spectre (Kolmer and Liu 2001). Le gène *Rx* d'extrême résistance au virus X de la pomme de terre est un autre exemple (Lecoq et al. 2004). Ces exemples de résistances durables conférées par des gènes majeurs montrent que d'autres résistances

similaires peuvent exister. En outre, ces gènes majeurs peuvent facilement être utilisés dans les programmes d'amélioration.

Les résistances polygéniques quantitatives sont supposées plus durables pour les raisons suivantes :

(i) l'action conjuguée de plusieurs gènes qui limiteraient le développement de l'agent pathogène en intervenant vraisemblablement sur différentes étapes de l'infection (Parlevliet 1993 ; Parlevliet 2002) et faisant probablement intervenir différents facteurs d'avirulence, ce qui nécessiterait pour l'agent pathogène de muter à plusieurs loci afin de pouvoir contourner cette résistance ;

(ii) une pression de sélection moindre sur la population pathogène. La sélection exercée est alors une sélection pour l'agressivité et non la virulence (Burdon 1993). La perte d'efficacité d'une résistance polygénique serait donc progressive, par opposition au contournement rapide des gènes majeurs, c'est pourquoi il est préférable de parler d'"érosion" plutôt que de contournement (McDonald and Linde 2002).

Par exemple, la résistance à la rouille de l'orge (causée par *Puccinia hordei*) trouvée chez les cultivars 'Minerva' et 'Vada' est une résistance polygénique partielle qui est aussi efficace de nos jours que depuis sa première utilisation en 1955 (Parlevliet 2002). Chen et al. (2003) ont montré que la durabilité d'une résistance quantitative pouvait dépendre du spectre d'action des loci impliqués. En effet, la résistance totale à *Magnaporthe grisea* observée chez le riz serait due à la combinaison de plusieurs QTL races-spécifiques. Castro et al. (2003) ont montré, quant à eux, que la durabilité de la résistance de l'orge à *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei* pourrait être due à la combinaison d'un gène majeur et de QTL. En cas de contournement de la résistance qualitative, les loci de résistance quantitative pourraient toujours agir (Castro et al. 2003), ou bien la résistance qualitative serait renforcée par la présence des facteurs à effet quantitatif. La durabilité de la résistance polygénique pourrait aussi venir du cumul de mécanismes de résistance distincts agissant à des étapes différentes du développement de la plante comme décrit pour la variété de blé 'Camp Rémy' vis-à-vis de la rouille (Mallard et al. 2005).

En définitive, le paramètre qui semble le plus impliqué dans la durabilité d'une résistance correspond à l'aspect polygénique de la résistance. Il paraît donc essentiel de comprendre non seulement les effets individuels des facteurs de résistance mais également les effets de leurs combinaisons (épistasie) et du fond génétique afin d'utiliser ces facteurs de résistance de manière durable.

II-5- Déploiement spatial de la résistance

La perte de la biodiversité du fait de l'uniformité des cultures était une caractéristique de l'agriculture du 20^{ème} siècle qui favorisa le développement d'épidémies.

L'utilisation de lignées isogéniques, c'est-à-dire un mélange de lignées génétiquement identiques pour tous les caractères agronomiques excepté pour la résistance, ou de mélanges variétaux, c'est-à-dire de mélanges de différents cultivars ayant des caractères agronomiques similaires mais différant dans leurs loci de résistance, s'avère réduire la sévérité de la maladie. En prenant l'exemple du riz, Zhu et al. (2000) ont montré qu'un mélange de différents cultivars réduisait l'infection par *Magnaporthe grisea*. Ce résultat a aussi été montré par Abe (2004) vis-à-vis du même champignon dans des cultures de lignées isogéniques. La culture de lignées isogéniques ou de mélanges de cultivars met la population pathogène face à une hétérogénéité de résistances difficile à contourner et réduisant la pression de sélection sur les gènes ou les combinaisons de gènes d'avirulence.

Aucune généralisation n'est possible pour expliquer la durabilité d'une résistance : elle dépend du couple plante-agent pathogène. La création de variétés résistantes doit alors se raisonner en intégrant la génétique et la dynamique de la population pathogène, la variabilité et l'exploitation temporelle/spatiale des résistances de l'hôte. Il est bien évidemment essentiel de tenir compte des contraintes techniques spécifiques à chaque culture.

La modélisation mathématique s'appuyant sur ces paramètres doit permettre de tester *a priori* l'adéquation d'un système de gestion donné pour un pathosystème d'intérêt, sans avoir recours immédiatement à l'application en vraie grandeur. De tels modèles pourraient avoir des applications sur le choix de stratégies optimales de construction de variétés résistantes (l'intérêt étant d'éviter d'investir sur des solutions *a priori* peu prometteuses) ainsi que sur les stratégies de déploiement (par exemple en testant par simulation la taille des dispositifs de déploiement nécessaires à une efficacité suffisante, ou les arrangements spatiaux les plus pertinents et leurs adéquations aux contraintes notamment culturelles). Des modèles épidémiologiques prenant en compte la génétique et la dynamique des populations pathogènes ainsi que la variabilité des résistances des plantes hôtes se sont succédés (Ohtsuki and Sasaki 2006 ; Van den Bosch and Gilligan 2003). Mais ce n'est que récemment que le déploiement spatial des résistances a été intégré dans un modèle (Sapoukhina et al. in prep).

III- METHODOLOGIES D'EXPLORATION DE L'ARCHITECTURE GENETIQUE D'UN CARACTERE COMPLEXE COMME LA RESISTANCE

III-1- Cartographie en population simple

L'architecture génétique de la résistance des plantes à leurs agents pathogènes a été longtemps et est toujours largement explorée grâce à l'approche de cartographie génétique classiquement menée sur une descendance en ségrégation (e.g., Young 1996 ; Collard et al. 2005). L'évaluation du niveau de résistance peut être menée en champ (e.g., Pilet et al. 1998), en conditions contrôlées (e.g., Sallaud et al. 2003 ; Le Guen et al. 2007) ou dans les deux conditions en parallèle (e.g., Mallard et al. 2005). Dans le premier cas, l'inoculum est plus difficile voire impossible à contrôler en fonction des pathosystèmes. Le fait de travailler en conditions contrôlées permet de tester successivement différents inocula et par là même de détecter éventuellement plusieurs gènes majeurs/QTL spécifiques d'un ou de certains inocula ségrégeant dans une même descendance (e.g., Sallaud et al. 2003 ; Calenge et al. 2004). Certains gènes majeurs ou QTL peuvent s'exprimer à des stades de croissance différents comme chez le colza vis-à-vis du phoma, ou chez l'orge et le blé vis-à-vis de la rouille (Delourme et al. 2006 ; Qi et al. 2000 ; Mallard et al. 2005, respectivement). Différents paramètres épidémiologiques peuvent aussi être mesurés pour disséquer plus finement la résistance observée : des QTL du nombre de sores, de la taille des sores, et de la période de latence ont, par exemple, pu être distingués chez le peuplier vis-à-vis de la rouille (Jorge et al. 2005).

III-2- Cartographie en populations multiples

Depuis la fin des années 1990, des stratégies de cartographie en populations multiples ont été développées afin d'explorer plus largement les bases génétiques de la variabilité disponible, et ainsi de rechercher plus de gènes majeurs ou QTL (Liu and Zeng 2000). L'exploitation de plans de croisements diallèles a en particulier été analysée (Rebaï et al. 1997 ; Rebaï and Goffinet 2000). Des logiciels de cartographie adaptés ont été proposés (e.g., MCQTL, Jourjon et al. 2005 ; MultiQTL, <http://www.multiqtl.com/>) et ont permis la détection effective de QTL dans ce type de plan de croisements (Blanc et al. 2006). Cette approche en populations multiples s'est étendue plus récemment à la prise en compte globale des relations d'apparentement au sein d'un pedigree (Bink et al. 2002 ; Van de Weg et al. 2003 ; Bink et al. 2008). Cette démarche de cartographie en pedigree est rendue possible grâce à l'utilisation du cadre bayésien qui permet, entre autres, de traiter le nombre de QTL

comme une variable aléatoire grâce à un échantillonnage à saut réversible (nombre de QTL pouvant varier d'une itération à l'autre au cours du processus de la chaîne de Markov). Il est à noter que, depuis plusieurs années, ces approches bayésiennes tendent à se généraliser en cartographie de QTL (Yi and Shriener 2008).

Une autre démarche a visé à intégrer les résultats de cartographie de QTL acquis dans plusieurs expérimentations indépendantes. Le recours à la méta-analyse de QTL permet en effet de synthétiser et préciser l'emplacement de QTL (méta-QTL). Cette démarche a été appliquée avec succès chez le maïs et le blé par exemple (Chardon et al. 2004 ; Hanocq et al. 2007). Elle a été très récemment appliquée sur l'ensemble des QTL identifiés chez le riz pour la résistance à la pyriculariose (*Magnaportheae grisea*) par Ballini et al. (2008), ce qui a permis de tester l'existence de co-localisations significatives entre ces méta-QTL et certains types de gènes impliqués dans les mécanismes de résistance/défense (Vergne et al. 2008).

III-3- Génétique d'association et cartographie en déséquilibre de liaison

Une nouvelle voie de recherche s'est développée ces dernières années pour caractériser les bases génétiques des caractères dans des populations dont les apparentements ne sont pas nécessairement connus : les études d'association visent en effet à identifier une association statistique entre polymorphisme phénotypique et polymorphisme génétique dans tous types de populations. Elles sont souvent basées sur l'étude d'une collection de ressources génétiques choisie pour rassembler une large diversité d'allèles et une grande variabilité phénotypique, en y exploitant les événements ancestraux de mutation et de recombinaison (Buckler and Thornsberry 2002 ; Rafalski 2002). Cette méthode est particulièrement adaptée pour échantillonner, avec une bonne résolution, une large gamme d'allèles au sein d'une population de taille modérée. Cependant, les études d'association requièrent certaines précautions concernant à la fois la structure de la population étudiée et l'étendue du déséquilibre de liaison (DL) au sein de l'espèce d'intérêt. La cartographie de QTL basée sur le déséquilibre de liaison ('LD mapping') permet de localiser un QTL à une résolution bien meilleure que celle d'une étude de liaison classique (LA pour 'linkage analysis') comme décrite aux paragraphes III-1 et III-2 ci-dessus (Rafalski 2002 ; Gupta et al. 2005). Du fait d'une éventuelle existence d'un fort DL lié à une histoire récente de l'espèce (par exemple, domestication ou sélection récente), il semble préférable de combiner les deux approches pour la cartographie de QTL ('LDLA' pour 'linkage disequilibrium linkage association' ; Wu et al. 2002 ; Uleberg and Meuwissen 2007). Le fait de disposer d'un nombre croissant de marqueurs SNP ('single nucleotide polymorphism') permet maintenant

d'envisager ces types d'approches sur l'ensemble du génome ('whole-genome association scanning', comme par exemple chez les bovins laitiers : Kolbehdari et al. 2008).

IV- PATHOSYSTEME *MALUS-VENTURIA INAEQUALIS*

IV-1- Pommier cultivé, *Malus x domestica*

IV-1-1- Origine et domestication

Les espèces du genre *Malus* se rencontrent des Balkans en Europe, à la Chine et au Japon en Asie, en passant par le Caucase, le Turkestan, les montagnes de l'Altaï et la Sibérie. Quelques espèces sont également originaires de l'Amérique du Nord (Lespinasse 1990). Le centre de plus grande diversité semble toutefois être l'Asie du Sud-Ouest, en particulier les forêts du Caucase et du Turkestan, si bien que cette région est considérée comme le berceau d'origine du pommier cultivé (Janick et al. 1996).

Vavilov (1926) a suggéré que le pommier sauvage d'Asie Centrale, *M. sieversii* (L.) Roem., était le principal géniteur du pommier cultivé. Il basait son hypothèse sur la similarité des fruits entre ce pommier sauvage et le pommier cultivé. Des travaux d'observation plus récents dans cette région ont montré que la diversité présente chez *M. sieversii*, notamment au niveau de la forme, du goût et de la couleur des fruits, se retrouvait chez le pommier cultivé (Dickson and Forsline 1994 ; Forsline et al. 2003 ; Forsline et al. 1994 ; Forstline 1995 ; Juniper and Mabberley 2006 ; Juniper et al. 1999). De même, les analyses moléculaires de séquences d'ADN ribosomiques et chloroplastiques réalisées par Harris et al. (2002) ont montré que le pommier cultivé était phylogénétiquement proche du pommier sauvage de l'Asie Centrale.

L'espèce sauvage européenne, *M. sylvestris* (L.) Mill., aurait, elle aussi, pu contribuer au pool génétique du pommier cultivé. Des études menées par Coart et al. (2003 et 2006) sur le polymorphisme de marqueurs génétiques nucléaires et de gènes chloroplastiques ont révélé que des hybrides entre *M. sylvestris* et le pommier cultivé existaient mais que ces pommiers sauvage et cultivé possédaient des pools génétiques différenciés en Europe.

Dès le Néolithique, les anciennes voies commerciales connues sous le nom de routes de la soie ont joué un rôle important dans l'évolution du pommier cultivé. Les voyageurs et leurs animaux domestiques ont ainsi véhiculé des pépins de l'Asie Centrale vers la Chine à l'Est, et vers l'Europe à l'Ouest (Harris et al. 2002 ; Juniper et al. 1999). Les pépins de ces

espèces sauvages asiatiques auraient pu être disséminés aléatoirement le long de ces routes, et s'hybrider avec d'autres espèces de pommier jusqu'ici isolées (Janick et al. 1996 ; Juniper et al. 1999). La domestication a bénéficié de la technique de greffage (décrite comme "domestication instantanée", Zohary and Spiegel-Roy 1975), découverte en Mésopotamie il y a 3800 ans (Harris et al. 2002). Le pommier aurait ensuite été introduit en Europe et en Afrique du Nord par les Grecs et les Romains il y a 2000 ans environ (Juniper and Mabberley 2006), puis dans les autres régions tempérées durant les 500 dernières années (Morgan and Richards 1993). Ce n'est qu'avec T.A. Knight (1759-1838) que commence la création de nouvelles variétés grâce à l'hybridation contrôlée (Janick et al. 1996).

Le pommier cultivé a longtemps été appelé *M. pumila* Mill.. Depuis près d'un siècle, de nombreux travaux sont effectués afin d'introduire par hybridation chez le pommier cultivé des résistances aux maladies provenant d'espèces sauvages (*M. floribunda* Sieb., *M. micromalus* Mak., *M. prunifolia* Borkh., *M. atrosanguinea* Schneid.) ; ceci a alors conduit Korban et Skirvin (1984) à dénommer le pommier cultivé *Malus x domestica* Borkh..

Malgré une très grande diversité génétique au sein de l'espèce pommier, les cultivars actuels ont une base génétique très étroite et l'essentiel de la production est basé sur un nombre restreint de cultivars. *M. sieversii* pourrait constituer une ressource utile pour le pommier cultivé, hébergeant potentiellement une grande variabilité dans les caractères importants d'un point de vue horticole ou environnemental (Forsline et al. 2003).

IV-1-2- Biologie

Le pommier appartient à la division des Angiospermes et à la classe des Dicotylédones. Il fait partie de la famille des *Rosaceae*, de la sous-famille des *Maloideae*, et du genre *Malus*. Le genre *Malus* compterait de 7 à 78 espèces, suivant les botanistes (Janick et al. 1996 ; Juniper and Mabberley 2006), mais 25 espèces est souvent le nombre retenu (Phipps et al. 1990). La classification en espèces est difficile du fait de la grande diversité génétique, de l'hybridation potentielle, et de la présence d'apomixie et de polyploïdie (Campbell et al. 1991).

Le régime de fécondation est l'allogamie car le pommier présente une auto-incompatibilité de type gamétophytique (Lespinasse 1990). Ce mode de reproduction est à l'origine d'une forte hétérozygotie et d'une variabilité intraspécifique importante du pommier. L'inter-incompatibilité entre variétés est assez rare tandis que l'auto-incompatibilité intervient toujours à un degré plus ou moins important. Il est alors nécessaire de planter des variétés pollinisatrices en verger commercial. Il existe quelques variétés ou hybrides présentant une certaine auto-compatibilité mais le taux de réussite reste très faible (Janick et al. 1996) et les individus issus de ces auto-fécondations présentent une faible

vigueur. Une dépression de consanguinité est observée lorsque les parents d'un croisement ont un ancêtre commun, aussi il est recommandé de ne pas utiliser trop fréquemment une même variété dans un plan de croisements.

IV-1-3- Cytogénétique

Le nombre chromosomique de base des *Maloideae* est $n=17$. Le pommier est diploïde et comporte alors $2n=34$ chromosomes. Quelques variétés de pommier sont triploïdes, par exemple 'Belle de Boskoop' et 'Reinette du Canada' (Lespinasse 1990). Le nombre chromosomique de base des *Maloideae* est élevé par rapport à celui des autres *Rosaceae* ($n=7$ chez les *Rosoideae*, $n=8$ chez les *Amygdaloideae*, $n=9$ chez les *Spiraeoideae*). Les *Maloideae* sont donc considérés comme des polyploïdes secondaires. La nature de cette polyploïdie a fait l'objet de plusieurs hypothèses :

- allopolyploïdie : le pommier dériverait de la fusion des génomes de formes primitives appartenant aux *Amygdaloideae* ($n=8$) et aux *Spiraeoideae* ($n=9$) (Sax 1933). Stebbins (1950) fonda l'origine allopolyploïde grâce à des arguments morphologiques et anatomiques. Challice (1981) fit une synthèse des données chimiotaxonomiques et apporta des arguments déterminants en faveur de l'origine allopolyploïde. Enfin, une hérédité disomique bigénique a été mise en évidence (Chevreau and Laurens 1987 ; Chevreau et al. 1985), et de nombreuses amorces microsatellites amplifient des loci dupliqués (Liebhard et al. 2002 ; Silfverberg-Dilworth et al. 2006). Cette hypothèse d'une origine allopolyploïde du pommier s'est maintenue pendant 70 ans, puis une seconde hypothèse a été posée plus récemment ;

- autopolyploïdie : le pommier dériverait de l'autoploïdisation du génome d'un *Spiraeoideae* ($n=9$) suivie de la perte aneuploïde d'une paire de chromosomes homologues. Cette hypothèse est basée sur des données phénotypiques et non moléculaires (association avec un agent pathogène fongique, morphologie florale et fleurs fossilisées ; Evans and Campbell 2002).

IV-1-4- Importance économique

Le pommier est aujourd'hui cultivé dans tous les pays tempérés des deux hémisphères (Juniper and Mabblerley 2006 ; Morgan and Richards 1993). La pomme peut être consommée de diverses façons : crue ou transformée sous forme de jus, compotes, tranches (séchées, fraîches ou en conserve), cidres. La capacité de stockage du fruit, la mondialisation des variétés, la faiblesse des coûts de transport maritime, l'annualisation de la consommation favorisent le marché mondial de la pomme.

La pomme est l'une des principales productions fruitières mondiales, après la banane et les agrumes. D'après les données fournies par la FAO, la production mondiale excédait 63 millions de tonnes en 2005. Elle a réalisé un véritable bond dans les années 1990 en raison de l'explosion de la production chinoise, et dans une moindre mesure, de la progression des pays de l'hémisphère sud. Les volumes produits dans l'hémisphère nord représentent 90% de la production mondiale. Les principaux pays producteurs sont la Chine (24 millions de tonnes par an), les Etats-Unis (5 millions de tonnes par an) ; l'Europe des 25 produit environ 12 millions de tonnes par an, dont la moitié est répartie, à parts égales, entre la France, l'Italie et la Pologne. La France est le troisième pays exportateur mondial de pommes, avec 630 000 tonnes par an, juste derrière la Chine (775 000 tonnes par an) et le Chili (740 000 tonnes par an). L'Europe reste toutefois un grand marché d'importation (moitié des importations) : l'Allemagne est le premier pays importateur mondial (700 000 tonnes par an).

Les variétés 'Delicious Rouge' et 'Golden Delicious' demeurent dominantes sur le marché mondial, même si elles tendent à céder la place aux variétés bicolores dans de nombreux pays.

IV-1-5- Amélioration génétique

IV-1-5-1- Objectifs de sélection

Dans cette partie, nous aborderons uniquement la sélection des variétés greffons et non celle des variétés porte-greffe. Les objectifs de sélection du pommier sont assez uniformes à travers le monde (Laurens 1999). Ils seront présentés ci-après par ordre d'importance.

- La qualité du fruit

C'est le premier objectif de tout sélectionneur. Les critères de qualité pris en compte sont : couleur, forme et taille du fruit, et qualité organoleptique mesurée par texture de la chair, fermeté, jutosité, teneur en sucres, acidité et arôme. Une bonne aptitude à la conservation est également recherchée.

- La résistance aux maladies et parasites

Dans la majorité des pays, la tavelure est la principale maladie rencontrée, aussi c'est la première maladie ciblée dans les programmes de sélection. Bien que diverses sources de résistance aient été identifiées, seul le gène majeur *Vf* a été très largement déployé dans les programmes de sélection : plus de 80% des nouveaux cultivars résistants à la tavelure

commercialisés et des géniteurs inclus dans les programmes de sélection portaient ce gène à la fin du siècle dernier (Laurens 1999). Toutefois, la découverte à la fin des années 1980 de deux nouvelles races de *V. inaequalis* capables de contourner Vf (Parisi et al. 1993 ; Roberts and Crute 1994) a conduit les sélectionneurs à modifier leurs stratégies d'amélioration pour la résistance à la tavelure : il s'agit à présent de cumuler différentes sources de résistance dans un même génotype en vue d'une résistance durable. Les sélectionneurs cherchent à introduire d'autres gènes majeurs et/ou des loci à effet partiel.

L'oïdium est également une maladie importante à travers le monde. Les gènes majeurs *Pl1* (issu de *Malus robusta*) et *Pl2* (issu de *Malus zumi*) sont les plus fréquemment utilisés dans les programmes de sélection. Cependant, les cultivars résistants à l'oïdium, mis sur le marché jusqu'à la fin des années 1990, étaient issus de parents partiellement résistants.

La résistance au feu bactérien, aux pucerons et au chancre à *Nectria* est aussi un critère de sélection important.

- L'adaptation climatique

Les principaux programmes sont basés dans les pays nordiques et au Canada. Ils visent à obtenir des cultivars adaptés à des saisons de croissance courte et froide. Au Brésil et en Afrique du Sud, d'importants programmes de sélection visent à la création de cultivars à moindres besoins en froid, adaptés aux principales régions où les hivers sont doux.

- Le port de l'arbre et la régularité de production

La plupart des améliorateurs sélectionnent des arbres à port compact. Néanmoins, ce type de port est souvent associé à une forte alternance de production. Le programme d'amélioration mené au centre INRA d'Angers a de ce fait pour objectif de sélectionner des arbres retombants et peu vigoureux qui favorisent une production régulière et facilitent la récolte.

IV-1-5-2- Méthodes d'amélioration

IV-1-5-2-1- Hybridation

L'hybridation reste la méthode d'amélioration la plus pratiquée dans les programmes de sélection du pommier. Jusqu'à la première moitié du 20^{ème} siècle, la plupart des cultivars commercialisés étaient issus de semis au hasard. C'est le cas de l'une des variétés les plus cultivées dans le monde, 'Golden Delicious'. L'origine de l'hybridation contrôlée est attribuée à T.A. Knight (1759-1838) qui produisit les premiers cultivars dont l'origine était

connue (Janick et al. 1996). Pourtant, ce n'est qu'au cours des 40 dernières années que les cultivars issus de croisements contrôlés se sont fait une place sur le marché mondial de la pomme. C'est le cas, par exemple, de 'Elstar', 'Gala', 'Jonagold' ou 'Pink Lady'.

L'hybridation entre variétés préexistantes a été pratiquée depuis le début du siècle, et a conduit à quelques uns des cultivars cités précédemment tels que 'Elstar' ('Golden' x 'Ingrid Marie') ou 'Jonagold' ('Golden' x 'Jonathan'). De tels programmes existent encore mais ont été largement relayés par des programmes faisant appel à l'hybridation interspécifique suivie de rétrocroisements modifiés ; il faut en effet changer de géniteur récurrent à chaque génération pour éviter la consanguinité. Ainsi, le gène majeur *Vf* de résistance à la tavelure a été introgressé avec succès chez le pommier cultivé à partir du clone #821 de l'espèce sauvage *M. floribunda*, donnant naissance à de nombreux cultivars porteurs de ce gène (Crosby et al. 1992).

IV-1-5-2-2- Mutagenèse

La mutagenèse permet de modifier légèrement une variété ayant déjà fait ses preuves en culture. Des mutations affectant spontanément certains caractères sont fréquemment exploitées. Tel est le cas du changement de couleur de la peau du fruit, ou de la modification de l'architecture de l'arbre. Ce dernier type de mutation a permis la sélection de mutants 'Delicious' et 'Golden Delicious' (Janick et al. 1996). Il est possible d'augmenter le taux naturel de mutations par irradiation aux rayons X ou gamma. L'irradiation est généralement réalisée sur des bourgeons dormants (Lespinasse 1990). Une plante est alors régénérée par culture *in vitro*, puis les mutations d'intérêt agronomique sont alors sélectionnées. La principale difficulté, associée à cette méthode, est la formation de chimères comprenant à la fois des tissus mutés et des tissus non mutés.

IV-1-5-2-3- Transformation génétique

L'amélioration génétique du pommier par la méthode de sélection classique est un processus lent du fait de la longue période juvénile (4-5 ans) et de la forte hétérozygotie de cette espèce fruitière pérenne. La transformation génétique est une alternative prometteuse qui permet de modifier un caractère particulier tout en maintenant l'ensemble des autres caractéristiques d'une variété déjà renommée.

Le pommier a été transformé pour la première fois par James et al. (1989). Depuis, la transformation génétique via *Agrobacterium tumefaciens* est bien maîtrisée chez le pommier, toutefois elle doit être ajustée à chaque variété (Bolar et al. 1999). La transformation

génétique chez le pommier vise notamment à introduire une résistance aux maladies et ravageurs (James et al. 1993 ; Faize et al. 2004 ; Malnoy et al. 2007), à modifier l'architecture de l'arbre (Zhu et al. 2008), et à raccourcir la période juvénile (Flachowsky et al. 2007).

La propagation des arbres de pommier se faisant par multiplication végétative, il serait facile de maintenir un nouveau caractère une fois que le génotype a été sélectionné.

Jusqu'à présent, la transformation génétique repose sur l'utilisation de gènes marqueurs de sélection, lesquels sont co-introduits avec les gènes d'intérêt afin de distinguer les tissus transformés des tissus non transformés. Différentes équipes de par le monde envisagent des méthodes dites "alternatives" visant à éliminer les gènes de sélection des plantes transformées et à éviter la sélection de ces plantes avec des antibiotiques ou des herbicides (e.g., Degenhardt et al. 2006). Par ailleurs, l'introduction de "transgènes" ou gènes "étrangers" dans une plante (c'est-à-dire des gènes ne provenant pas de la plante elle-même ou de plantes interfertiles) n'est pas un concept facilement acceptable par les consommateurs. L'information croissante sur les séquences d'ADN des plantes cultivées a alors facilité l'isolement et l'utilisation de "cisgènes" potentiellement acceptables (gènes provenant de la plante elle-même ou de plantes interfertiles ; Jacobsen and Schouten 2007). Belfanti et al. (2004) ont ainsi introduit le gène *HcrVf2*, candidat probable pour le gène majeur *Vf* de résistance à la tavelure issu de l'espèce sauvage *M. floribunda*, chez une variété de pommier cultivée sensible : la résistance à la tavelure a été restaurée.

IV-2- La tavelure, maladie du pommier causée par le champignon *Venturia inaequalis*

IV-2-1- Importance économique

La tavelure est la maladie du pommier la plus importante économiquement ; elle est rencontrée partout où le pommier est cultivé tout en étant moins présente dans les régions semi-arides (MacHardy 1996). Les attaques les plus sévères sont observées lorsque le climat est humide et frais durant la saison printanière. De nombreux facteurs influencent le niveau de développement de la maladie : l'état sanitaire du verger, sa topographie, la sensibilité des cultivars, la fréquence des périodes d'infection, ... Les pertes économiques résultent principalement des infections sur fruits, détériorant leur aspect visuel et les rendant ainsi impropres à la commercialisation bien que potentiellement consommables puisque le champignon ne produit pas de toxines. Comme le notait Nelson (1979), cité par MacHardy et al. (2001), "While natural populations of hosts learned to live with their parasites, man could not or would not". Plus indirectement, des défoliations répétées provoquées par la maladie

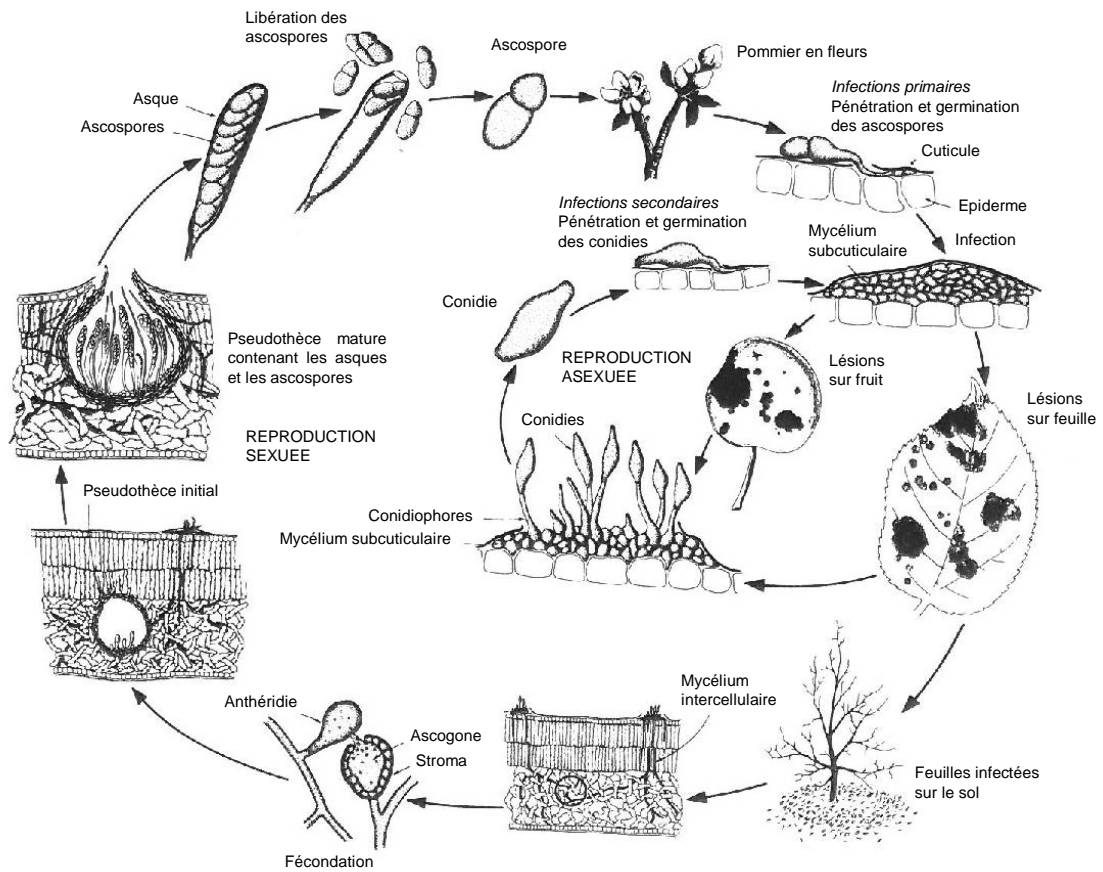


Figure 2. Cycle biologique de *Venturia inaequalis*, agent pathogène responsable de la tavelure chez le pommier (d'après Agrios 1988).

peuvent diminuer la vigueur de l'arbre ainsi que son rendement et sa résistance aux froids hivernaux. L'impact économique de la tavelure est surtout lié au fait qu'aucun symptôme n'est toléré dans les circuits de distribution des pays occidentaux.

IV-2-2- Taxonomie

Venturia inaequalis est le champignon responsable de la tavelure du pommier. Ce champignon dans son état parfait (sexué) est classé comme suit : division des *Ascomycota* (reproduction sexuée *via* des asques contenant des ascospores), sous-division des *Pezizomycotina* (reproduction par scissiparité), classe des *Dothideomycetes* (asques à deux tuniques en série parallèle enfermés dans un périthèce s'ouvrant à maturité par un ostiole, pas de paraphyses vraies), ordre des *Pleosporales* (périthèces globuleux ou peu allongés de couleur foncée, pourvus de pseudoparaphyses), famille des *Venturiaceae* (périthèces enfoncés dans les feuilles ou les fruits, ascospores bicellulaires). L'état imparfait de *V. inaequalis* est nommé *Spilocea pomi* (Berbee 2001 ; James et al. 2006 ; MacHardy 1996).

IV-2-3- Cycle biologique (Figure 2)

Le cycle de *V. inaequalis* comprend deux phases : une phase saprophytique au cours de laquelle a lieu la reproduction sexuée, et une phase parasitaire pendant laquelle se déroulent de nombreux cycles de reproduction végétative. Le développement du champignon au cours de ces deux phases est fortement influencé par les conditions climatiques.

Le cycle d'infection débute au printemps lorsque les conditions de température et d'humidité favorisent la libération des ascospores (inoculum primaire) maintenues en hibernation dans la litière foliaire. Les ascospores sont projetées sur une très courte distance (<5 mm), puis elles sont disséminées par le vent sur des distances qui toutefois n'excèdent pas 100 m (Hirst and Stedman 1962 ; Holb et al. 2004). Lorsque les ascospores arrivent à la surface des tissus d'un pommier sensible, elles germent dans un film d'eau. Chaque ascospore émet un tube germinatif qui différencie à son extrémité un (ou plusieurs) appressorium (appressoria) qui perce(nt) la cuticule. Le champignon développe alors un stroma entre la cuticule et l'épiderme supérieur. Sur ce stroma se différencient des conidiophores qui percent la cuticule et donnent naissance à des conidies. Les lésions apparaissent sur les feuilles et les fruits sous forme de taches brun-olivâtre d'aspect velouté. Les conidies constituent l'inoculum secondaire. Elles sont emportées par le vent ou projetées par la pluie, et vont pouvoir infecter de nouveaux tissus. Ces infections secondaires peuvent se poursuivre jusqu'à ce que les feuilles et les fruits tombent de l'arbre. Les conditions

d'infection par les conidies sont similaires à celles des ascospores. La germination d'une ascospore (ou d'une conidie) et la pénétration de la cuticule par le tube germinatif dépendent de la présence d'eau libre sur les tissus hôtes, tandis que la progression du champignon dépend essentiellement de la température (MacHardy 1996). Dès l'automne, dans les feuilles en début de sénescence, le mycélium qui occupait la zone subcuticulaire, colonise le mésophylle. La fécondation a lieu entre deux hyphes de signes sexuels complémentaires (*V. inaequalis* est un champignon hétérothallique strict). Il se forme ainsi un périthèce qui va se différencier et croître lentement pendant l'hiver. Ce n'est qu'après une période de dormance de plusieurs semaines que les asques puis les ascospores se développent. Leur maturation s'achève au printemps. Aussi lorsque les conditions climatiques deviennent favorables, une nouvelle génération d'ascospores peut être libérée et le cycle infectieux peut reprendre... Les conidies conservées pendant l'hiver dans les bourgeons et/ou les tiges peuvent aussi participer à la constitution de l'inoculum primaire (Holb et al. 2005).

IV-2-4- Variabilité du pouvoir pathogène

Aberhold en 1899, cité par MacHardy (1996), est le premier à avoir observé des différences de pathogénicité chez *V. inaequalis* sur des cultivars de *M. x domestica*. Dix-neuf gènes de pathogénicité, ou encore gènes de virulence, ont été identifiés ultérieurement (Bagga and Boone 1968 ; Boone 1971 ; Boone and Keitt 1957 ; Williams and Shay 1957). La majorité de ces gènes de virulence sont transmis indépendamment les uns des autres (Bénaouf and Parisi 2000 ; Sierotzki and Gessler 1998 ; Williams and Shay 1957), ce qui aboutirait à 2^{16-219} combinaisons possibles de ces gènes, soit autant de races physiologiques potentielles (Gessler 1989). Et encore, n'avons-nous vraisemblablement pas identifié tous les gènes de virulence existants... La ségrégation indépendante des gènes de virulence de *V. inaequalis* lui ouvre un large potentiel de développement de nouveaux pathotypes durant son cycle sexuel ; ceci indique que cet agent pathogène est bien adapté au parasitisme (Boone 1971). Les races (ou pathotypes) de ce champignon ne sont pas directement distinguées en fonction de la présence de ses gènes de virulence, mais ont été définies en fonction de leur pouvoir pathogène vis-à-vis d'une gamme de génotypes de *Malus* choisis eux-mêmes en fonction de leurs résistances majeures. Jusqu'à présent, huit races ont pu être définies à partir de cette gamme d'hôtes, auxquelles il faut rajouter une race combinant les virulences des races 6 et 7 (Bénaouf and Parisi 1997; Bénaouf and Parisi 2000 ; Bus et al. 2005b ; Parisi and Lespinasse 1996). MacHardy (1996) souligne que les races de *V. inaequalis* distinguées à partir de la gamme d'hôtes en rigueur ne correspondent qu'à quelques races parmi une multitude de races qui pourraient potentiellement être déterminées en utilisant plus de génotypes de pommier.



Figure 3. Symptômes de tavelure sur (a) feuille et (b) fruit de pommier (Photos INRA).

IV-3- Symptomatologie

Les symptômes dus à l'infection par *V. inaequalis* sont visibles sur les feuilles, les fruits, les pétioles, les sépales, les fleurs, les jeunes pousses, et les bourgeons. Les symptômes décrits ci-après résultent d'une interaction compatible entre l'agent pathogène et son hôte.

Sur feuilles (Figure 3 (a)), les lésions peuvent être isolées, dispersées sur tout le limbe, ou recouvrir la surface entièrement. Les lésions se développant sur les jeunes feuilles sont souvent larges (1,3 cm de diamètre voire plus). Généralement, les symptômes apparaissent sur la face supérieure des feuilles en début et milieu de saison, et sur la face inférieure en fin de saison. Une feuille infectée n'est généralement pas altérée au niveau de sa forme, mais des distorsions peuvent apparaître particulièrement lorsqu'une lésion se situe près d'une nervure. Les lésions sont d'abord de petite taille, circulaires et translucides. Elles sont également recouvertes de nombreuses lignes foncées qui correspondent au mycélium diffusant à partir du point de pénétration du champignon. Les lésions s'agrandissent, deviennent olivâtres, et prennent un aspect velouté de par la production abondante de conidiophores et conidies. Plus tard, les lésions deviennent de couleur brun-foncé. Les feuilles, en vieillissant, vont se dessécher, se déformer, et une déchirure du limbe va avoir lieu, ce qui entraîne une défoliation plus ou moins importante selon la gravité de la maladie. Les feuilles âgées présentent une résistance ontogénique : seules les plus jeunes feuilles d'une pousse en croissance sont sensibles ; dès que les feuilles ont atteint un certain "âge" (~8-10 jours en conditions contrôlées), elles ne sont plus sensibles à une inoculation. Une levée de cette résistance ontogénique peut cependant être observée pour les feuilles les plus âgées à l'automne.

Les fruits sont sensibles à l'infection par *V. inaequalis* à tous les stades de développement (Figure 3 (b)). L'infection peut provoquer des déformations, des plaies, ou entraîner la chute des fruits lorsque le pédicelle est atteint. Les pommes jeunes sont les plus sensibles. Elles deviennent plus résistantes quand elles mûrissent (résistance ontogénique partielle) ; les lésions se développent plus lentement et peuvent parfois être non visibles pour n'apparaître que lors de la conservation. Les lésions sur fruits sont d'abord petites, puis, comparées à celles observées sur feuilles, elles s'agrandissent plus lentement, sont plus foncées, et sont plus proches les unes des autres. Les vieilles lésions se nécrosent et prennent un aspect liégeux avec la mort du champignon (Mac Hardy 1996).

IV-4- Moyens de lutte

La tavelure du pommier est devenue un véritable problème dans le milieu du 19^{ème} siècle avec l'intensification de la production.

Deux stratégies de lutte contre *V. inaequalis* peuvent être utilisées : une stratégie défensive pour protéger l'arbre des infections par les ascospores ou conidies, et une stratégie offensive pour réduire la dose d'ascospores pendant la phase saprophytique du champignon (MacHardy et al. 2001).

IV-4-1- Stratégie défensive

- Protection avec des fongicides chimiques

La majorité des variétés de pommier cultivées en vergers commerciaux sont sensibles à la tavelure. La lutte chimique est pratiquée systématiquement afin d'obtenir des fruits de bonne qualité commerciale. La lutte anti-tavelure classique consiste, en période de projections d'ascospores, à appliquer une protection fongicide préventive avant les pluies annoncées par les prévisions météorologiques. On utilise les courbes de Mills et Laplante (1951) pour rattraper, par un traitement curatif, un défaut de protection ou un lessivage du produit. Ces courbes ont été proposées pour définir un risque de gravité d'infection en fonction de la température et des durées d'humectation des feuilles. Le nombre de traitements contre la tavelure peut devenir très élevé les années particulièrement pluvieuses (jusqu'à 20 traitements par an, voire plus chez certains arboriculteurs ne voulant prendre aucun risque de développement de la maladie).

Réduire le nombre de traitements phytosanitaires en vergers commerciaux permettrait non seulement de baisser les coûts de production mais aussi de réduire la présence de résidus pesticides dans les eaux fluviales ou souterraines et de diminuer les impacts négatifs sur l'environnement et la santé humaine. L'Union Européenne, à travers la politique agricole commune, incite fortement à la réduction de l'utilisation de pesticides et doit se prononcer à brève échéance contre l'utilisation de certaines molécules et éléments simples comme le cuivre largement utilisé en arboriculture biologique. Par ailleurs, des résistances de *V. inaequalis* à certains produits fongiques ont déjà été observées en verger (MacHardy 1996). Aussi seule une utilisation raisonnée des fongicides permettra de conserver leur efficacité.

- Protection avec les modes de conduite culturale

La taille, par son influence sur la densité et la dimension des arbres, intervient sur le temps de ressuyage donc sur la réussite des contaminations. Les fortes fumures azotées sont aussi un facteur aggravant tant sur le plan de l'abondance de la végétation que sur un plan plus physiologique (Anonyme 2003).

- Protection avec des cultivars résistants

La plantation de variétés de pommier présentant une résistance complète à la tavelure est une solution particulièrement intéressante pour réduire le nombre de traitements chimiques. Toutefois le gène majeur *Vf*, largement utilisé dans la création des nouvelles variétés, a été contourné par de nouvelles races du champignon (Parisi et al. 1993 ; Roberts and Crute 1994). Utiliser une résistance monogénique seule ne semble donc pas une solution durable face à l'adaptabilité de *V. inaequalis*. Une autre possibilité est de planter des variétés peu sensibles, c'est-à-dire montrant un niveau élevé de résistance partielle à la tavelure. Ce type de résistance polygénique est supposé plus durable qu'une résistance monogénique. Des variétés présentant une telle résistance existent mais ont été jusqu'à présent peu cultivées. Une faible qualité gustative ou des qualités agronomiques insuffisantes de ces variétés peuvent expliquer leur échec commercial. Pourtant les dernières variétés résistantes créées (portant le gène *Vf*) présentent une qualité gustative correcte et n'ont pas encore eu beaucoup de succès. Les facteurs mis en cause sont le traditionalisme des producteurs et des distributeurs, et les préférences des consommateurs, lesquels sont peu informés des avantages de ces variétés résistantes du fait d'un manque de promotion commerciale.

- Protection avec des mélanges variétaux

Blaise et Gessler (1994) puis Didelot et al. (2007) ont montré par modélisation ou en vergers expérimentaux, respectivement, l'intérêt de planter en mélange des variétés sensibles et résistantes pour réduire les épidémies de *V. inaequalis* sur pommier. Le mélange au sein d'un même rang s'est avéré plus efficace que le mélange en rangs alternés. Les mélanges variétaux représenteraient une méthode intéressante notamment pour valoriser les gènes majeurs, plus faciles à utiliser en sélection que les loci à résistance partielle. Toutefois, de tels niveaux de dispersion des variétés de pommier sont encore difficilement acceptables en vergers commerciaux du fait de la non-uniformité des caractères agronomiques des variétés. Cette diversification dans les vergers serait d'emblée plus acceptable par les arboriculteurs si l'on développait des lignées quasi-isogéniques ne différant que par leurs loci de résistance. Contrairement aux espèces autogames pour lesquelles cette méthodologie est facilement réalisable, la création de lignées quasi-isogéniques chez les espèces allogames, tel le pommier, ne peut être réalisée que par transformation génétique qui pose les problèmes d'acceptabilité sociétale présentés auparavant.

IV-4-2- Stratégie offensive

Au printemps, l'inoculum primaire de tavelure vient d'ascospores issues de la litière de feuilles de pommier infectées l'année précédente et ayant hiverné au sol. On peut réduire cet inoculum en agissant directement sur *V. inaequalis* ou indirectement sur la litière foliaire.

- Attaque directe sur *V. inaequalis* dans la litière foliaire

Les pratiques qui agissent directement sur l'agent pathogène peuvent restreindre ou empêcher la production et la maturation des pseudothèces ou empêcher la maturation et la dispersion des ascospores. Des exemples de telles pratiques sont : (i) traiter les feuilles tavelées avec des produits chimiques ou des extraits de plantes qui limitent le développement des pseudothèces et des ascospores, ou sont létaux pour le champignon, (ii) utiliser des microorganismes antagonistes (MacHardy et al. 2001 ; Carisse and Dewdney 2002 ; <http://www.freepatentsonline.com/US5888496.html>).

- Réduction de la litière foliaire

Les pratiques mises en place sont diverses : (i) enlever ou broyer la litière foliaire, (ii) rassembler et enfouir les feuilles dans le sol ou les brûler, (iii) traiter la litière foliaire avec des produits chimiques (en particulier l'urée) ou des microorganismes accélérant sa décomposition, (iv) favoriser l'action des vers de terre après avoir enfoui les feuilles (Holb 2006 ; Holb 2007 ; MacHardy et al. 2001).

IV-4-3- Intégration des stratégies défensive et offensive : lutte intégrée

Chacun des moyens de lutte présentés comporte des désavantages et n'ont, individuellement, qu'une efficacité partielle. Aussi, pour le pommier, comme pour de nombreuses autres espèces cultivées, le concept de lutte intégrée se développe (Ferron 1999) : système de lutte aménagée combinant différentes mesures appropriées de façon à maintenir les populations de bioagresseurs à des niveaux où elles ne causent pas de dommages économiques. Les luttes génétique et prophylactique sont alors privilégiées, et la lutte chimique n'est employée qu'en dernier ressort. Des règlements phytosanitaires de plus en plus stricts et une demande croissante de la société encouragent les producteurs à se tourner vers la lutte intégrée (Lucas 2007).

V- GENETIQUE DE LA RESISTANCE DU POMMIER A LA TAVELURE

La sélection des cultivars de pommier qui a accompagné la professionnalisation de l'arboriculture s'est faite au détriment de la résistance aux maladies. Les critères de productivité, de présentation et de tenue à la conservation ont longtemps primé sur la résistance aux maladies, critère devenu moins important grâce aux fongicides chimiques. Parallèlement, le nombre de variétés commercialisées était restreint, et le développement de vergers monocultureux facilitait les opérations culturales. Cette configuration des vergers a créé un environnement favorable au développement des agents pathogènes qui se sont progressivement adaptés aux variétés cultivées. La résistance aux maladies, et principalement à la tavelure, est alors devenue un objectif prioritaire dans les programmes d'amélioration du pommier.

V-1- Sources de résistance

Plus d'une douzaine de gènes majeurs conférant une résistance à la tavelure ont été identifiés au sein du genre *Malus* (pour revue, voir Gessler et al. 2006). Ces gènes sont principalement issus d'espèces sauvages : *Vf* et *Vfh* de *M. floribunda* #821 (Bénaouf and Parisi 2000 ; Williams and Kuc 1969) ; *Vh8* de *M. sieversii* (Bus et al. 2005b) ; *Vbj* de *M. baccata jackii* (Williams and Kuc 1969) ; *Vb* de 'Hansen's baccata #2' (Williams and Kuc 1969) ; *Vm* de *M. micromalus* 245-38 ou *M. atrosanguinea* 804 (Williams and Kuc 1969). D'autres gènes majeurs ont été identifiés chez *M. x domestica* : *Vr-DW*, *Vh2* (aussi nommé *Vr* ou *Vr-A*), et *Vh4* (aussi nommé *Vx* ou *Vr1*) de *M. pumila* R12740-7A (Aldwinckle et al. 1976 ; Boudichevskaia et al. 2006 ; Bus et al. 2005a ; Dayton and Williams 1968 ; Hemmat et al. 2002) ; *Va* de 'Antonovka PI172623' (Lespinasse 1989) ; *VT57* de 'Golden Delicious' ou 'Red Dougherty' (Bus et al. 2005a) ; *Vg* de 'Golden Delicious' (Bénaouf and Parisi 1997) ; *Vr2* de GMAL 2473 (Patocchi et al. 2004) ; *Vd* de 'Durello di Forli' (Tartarini et al. 2004) ; et *Vd3* de 'D3' (Soriano et al. 2008).

Dans des conditions favorables de serre, les gènes majeurs de résistance conditionnent, pour la plupart, l'un des trois symptômes macroscopiques suivants : symptôme 'pin-point' (dépressions cellulaires pas plus grandes qu'une tête d'épingle, d'où son nom) qualifié de réponse hypersensible (HR), réactions nécrotique ou chlorotique (avec ou sans crispation du limbe de la feuille). *Vm* et *Vh4* sont des exemples de gènes conduisant à une HR (Bus et al. 2005a ; Williams and Kuc 1969). Shay et Hough (1952) ont créé le terme SN ('stellate necrosis') pour distinguer les réactions nécrotique et chlorotique en forme d'étoile de celles ne présentant pas de forme déterminée. Par exemple, *Vh2* conditionne une réaction stellaire nécrotique (Bus et al. 2005a) tandis que *Vf* conditionne une réaction chlorotique plus large (Chevalier et al. 1991).

Il faut noter que les gènes peuvent être épistatiques entre eux, aussi des interactions gène de résistance-gène d'avirulence apportant un haut niveau de résistance peuvent parfois masquer celles apportant un niveau de résistance plus faible (Crute and Pink 1996). Chez le pommier, il existe des exemples de gènes conditionnant une HR qui sont épistatiques sur les gènes conditionnant une réaction nécrotique, ces deux types de gènes étant épistatiques sur les gènes conditionnant une réaction chlorotique (Dayton and Williams 1970 ; Shay and Williams 1953 ; Williams and Dayton 1968).

Durant les 60-70 dernières années, les stratégies de sélection pour la résistance à la tavelure se sont essentiellement basées sur l'introgression du gène majeur *Vf* dans les cultivars de pommier. Dans une étude menée en 1992, Crosby et al. ont observé que, parmi les 48 cultivars résistants à la tavelure disponibles, 40 portaient le gène *Vf* alors que seuls 6 cultivars portaient le gène *Vm* et 1 le gène *Vr*. Ainsi pendant des décennies, le gène majeur *Vf* a été considéré comme durable.

En plus des résistances majeures à déterminisme monogénique, il existe chez le pommier des résistances quantitatives à déterminisme polygénique. La faible durabilité de certains gènes majeurs avait été démontrée dès lors que plusieurs races de *V. inaequalis* avaient été précocement identifiées dans des programmes de rétrocroisements modifiés visant à introgresser ces gènes de résistance dans les cultivars de pommier (Williams and Brown 1968). Aussi il semblait évident que la gestion d'une résistance durable de la tavelure devait inclure des sources alternatives de résistance. Les difficultés pour apprécier et exploiter la résistance polygénique rendirent les sélectionneurs réticents à utiliser ce type de résistance. Le développement de cartes génétiques ne s'est fait que progressivement chez le pommier (Hemmat et al. 1994 ; Conner et al. 1997 ; Maliepaard et al. 1998 ; Liebhard et al. 2003a ; Silfverberg-Dilworth et al. 2006). C'est pourquoi, il y a peu d'analyses QTL reportées dans la littérature. Cependant, après la découverte des deux races 6 et 7 de *V. inaequalis* capables de contourner le gène majeur *Vf*, les généticiens ont renouvelé d'efforts pour identifier des sources de résistance polygénique (Fischer 2000 ; Lateur et al. 2000), notamment afin de renforcer la résistance conférée par les gènes majeurs (Laurens 1999). Les QTL de résistance à la tavelure connus à ce jour ont été caractérisés au cours du projet européen DARE ('Durable Apple Resistance in Europe' ; Lespinasse et al. 2000 ; Lespinasse et al. 2002). Cinq populations (descendances F1) ont été inoculées en conditions naturelles (champ) et en conditions contrôlées (serre). Des QTL ont été identifiés chez les cultivars 'Fiesta', 'Discovery', 'Prima', 'Durello di Forlì' et chez l'hybride 'TN10-8' (descendant de 'Schmidt's Antonovka PI172632'). Ont été mis en évidence (Calenge et al. 2004 ; Durel et al. 2004) :

- des QTL races/souches-spécifiques, c'est-à-dire efficaces vis-à-vis d'une ou deux souches de *V. inaequalis* : QTL sur les groupes de liaison (GL) 5 et 13 ;

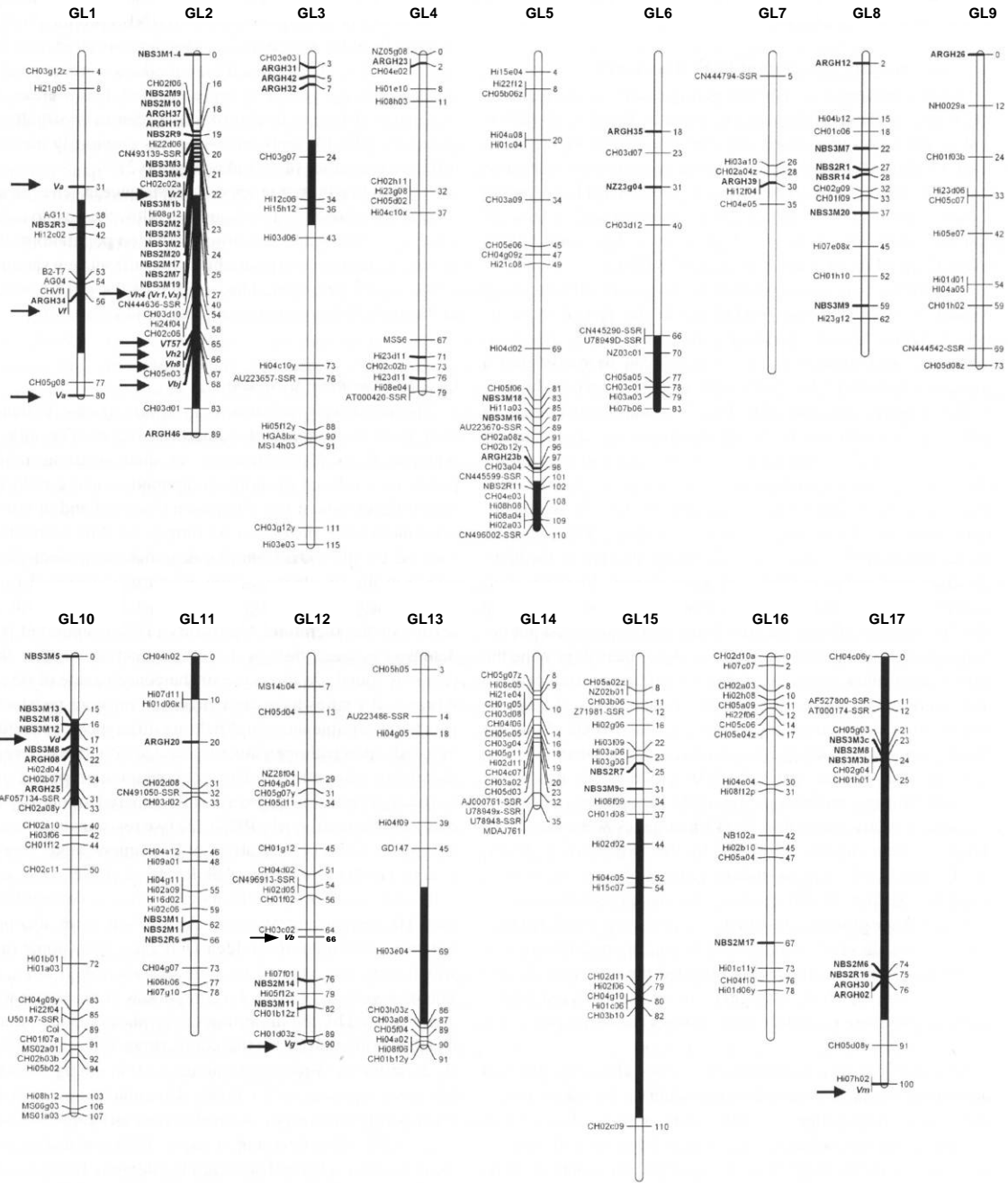


Figure 4. Organisation génomique des facteurs de résistance du pommier à la tavelure (d'après Gessler et al. 2006). Les flèches indiquent les gènes majeurs (deux positions alternatives sont indiquées pour le gène *Va*). Les barres noires représentent les intervalles de confiance des QTL ('quantitative trait loci') lorsqu'ils ont été précisés (Durel et al. 2003 ; Calenge et al. 2004) ; pour les QTL dont l'intervalle de confiance n'a pas été précisé, une distance de 20 cM a été attribuée (GL3, GL6, GL10 et GL12 ; Liebhard et al. 2003b ; Durel et al. 2004). Les RGA ('resistance gene analogues') sont écrits en caractères gras (Baldi et al. 2004 ; Calenge et al. 2005).

- des QTL races/souches-non-spécifiques ou QTL dits à large spectre car efficaces envers la quasi-totalité des souches testées : QTL sur GL11 et GL17 ;
- des QTL intermédiaires : QTL sur GL1, GL2 et GL15.

Les descendances issues de parents porteurs d'une résistance polygénique montrent des symptômes pouvant aller de la résistance totale à la sensibilité : le niveau de la maladie suit une distribution continue.

V-2- Organisation génomique de la résistance

Une première synthèse de la position des gènes majeurs et des QTL de résistance à la tavelure chez le pommier a été proposée par Durel et al. (2004) ; quelques régions génomiques supplémentaires ont été rapportées par Calenge et al. (2004) et Liebhard et al. (2003b). Une seconde synthèse a été réalisée par Gessler et al. (2006). L'organisation génomique de la résistance à la tavelure chez le pommier est ainsi résumée et présentée sur la figure 4. Jusqu'alors, onze groupes de liaison (GL) s'avèrent porter des facteurs de résistance à partir de différents fonds génétiques.

Par ailleurs, la plupart des gènes de résistance chez les plantes codant pour des protéines de type NBS-LRR, différentes approches moléculaires ont été développées afin d'identifier les potentiels gènes de résistance dans le génome. Baldi et al. (2004) et Calenge et al. (2005a) ont ainsi identifié et cartographié des analogues de gènes de résistance (RGA, 'resistance gene analog'), en utilisant respectivement des amorces dégénérées ou la technique 'NBS profiling'. La majorité de ces RGA sont organisés en clusters et sont situés au voisinage de gènes majeurs ou QTL de résistance à la tavelure (Figure 4).

Certains gènes majeurs sont regroupés en clusters : *Vr2* et *Vh4* d'une part, et *VT57*, *Vh2*, *Vh8* et *Vbj* d'autre part, sur le GL2. Les gènes d'un même cluster peuvent conférer des spécificités de résistance différentes, tel est le cas des gènes *Vh2* et *Vh8* du GL2 qui sont efficaces envers des souches de races 2 et 8, respectivement (Bus et al. 2005b ; Bus et al. 2005a). Au niveau du macro-locus *Vf*, les démarches de clonage entreprises en parallèle par différentes équipes ont montré l'existence de quatre séquences paralogues nommées *HcrVf1-HcrVf4* (Vinatzer et al. 2001) ou *Vfa1-Vfa4* (Xu and Korban 2002) dans un segment génomique de 200kb. Ces séquences correspondent à des gènes de type récepteurs extracellulaires présentant une forte homologie avec les gènes *Cf* de résistance de la tomate à la *Cladosporium fulvum*. L'analyse de cette famille de gènes a révélé que ces quatre séquences provenaient vraisemblablement de deux événements séquentiels de duplication à partir d'un gène *Vf* ancestral (Xu and Korban 2004), en se basant sur l'existence d'une plus grande similarité au

sein du couple *Vfa1/Vfa2*, d'une part, et *Vfa3/Vfa4*, d'autre part. Seuls *Vfa1* et *Vfa2* confèrent une résistance (Malnoy et al. 2008).

Des QTL de résistance identifiés à partir de souches différentes de *V. inaequalis* et/ou dans des fonds génétiques différents peuvent également être localisés dans une même région génomique, tel est le cas des QTL sur les GL1, 2, 5, 11, 15 ou 17 (Calenge et al. 2004 ; Durel et al. 2004).

Il est intéressant de noter que des QTL races/souches-spécifiques ou des QTL intermédiaires ont été localisés dans des régions génomiques portant des gènes majeurs, c'est le cas, par exemple, sur les GL1, GL2 et GL10. Par ailleurs, les QTL détectés sur le GL11 et le GL17 sont considérés comme étant à large spectre (Durel et al. 2004). Pour le GL17, aucun gène majeur de résistance ni aucun analogue de gène de résistance de type NBS-LRR n'a jusqu'à présent été identifié dans cette région génomique. La situation est moins radicale pour la région génomique du GL11 où un gène majeur de résistance a été localisé (information confidentielle d'une équipe européenne) mais où aucun NBS-LRR n'a pour l'instant été cartographié. Ces deux régions pourraient alors être impliquées dans des mécanismes de défense généraux, en aval de l'étape de reconnaissance de l'agent pathogène.

VI- SELECTION DE LA RESISTANCE DU POMMIER A LA TAVELURE

VI-1- Pyramidage de "gènes"

L'introgession d'un seul gène majeur de résistance dans des cultivars sensibles s'est avérée ne pas être une bonne stratégie en vue d'une résistance durable. Tel est l'exemple du gène *Vf* qui a été contourné par les deux races 6 et 7 du champignon *V. inaequalis* bien avant que les cultivars portant ce gène ne soient largement exploités, c'est-à-dire bien avant qu'il y ait des opportunités de sélection pour le champignon sur une plus grande échelle. Est-il possible de développer des cultivars de pommier avec une résistance durable à la tavelure ?

Une stratégie est de cumuler différents loci de résistance au sein d'un même génotype de pommier ('gene pyramiding' : Pedersen and Leath 1988).

La construction d'un génotype résistant peut se raisonner en fonction du type de loci cumulés. La première option est de cumuler plusieurs gènes majeurs "exotiques" de résistance, autrement dit des gènes de résistance qui sont encore pleinement efficaces dans leur région d'introduction car n'ayant pas été contournés par la population pathogène (MacHardy 2001). L'agent pathogène devrait muter plusieurs gènes d'avirulence en gènes de virulence afin de pouvoir infecter un génotype de pommier présentant de telles

combinaisons génétiques. En outre, des précautions strictes doivent empêcher l'introduction de pathotypes compatibles. La seconde option est de cumuler plusieurs loci à effet partiel ou QTL (Chen et al. 2003). Ce type de facteurs de résistance exerce une pression de sélection moindre sur la population pathogène que les gènes majeurs, aussi l'apparition de gènes de virulence correspondants à ces QTL de résistance sera plus tardive. La troisième option est de combiner les deux options précédentes, c'est-à-dire de cumuler à la fois un (ou des) gène(s) majeur(s) et un (ou des) QTL (Ayme 2005 ; Castro et al. 2003). Cette méthode pourrait notamment permettre de valoriser certains gènes majeurs déjà contournés par l'agent pathogène mais conservant un effet résiduel, effet qualifié de résistance "fantôme" par Van der Plank (1968). Un tel effet "fantôme" semble une explication plausible de la résistance partielle de la région génomique portant *Vf* envers une souche de race 6 (Durel et al. 2000b), et de la résistance résiduelle d'un pommier transgénique exprimant le gène *HcrVf2* et confronté à une souche virulente-*Vf* (Silfverberg-Dilworth et al. 2005).

Le cumul de loci peut également se raisonner en fonction du spectre d'action de ces loci. On peut soit cumuler des loci à large spectre d'action (races/souches-non-spécifiques) soit cumuler des loci à spectres d'action complémentaires (races/souches-spécifiques). Lequel des deux types de construction sera le plus durable ? Il n'existe pas de réponse pré-établie à cette question.

Une autre voie intéressante est la recherche de résistances complémentaires en se basant sur les connaissances de l'interaction hôte-agent pathogène et en cherchant à associer soit des facteurs de résistance ciblant des phases différentes du processus d'infection soit des facteurs de résistance impliqués dans différents mécanismes moléculaires (reconnaissance de l'agent pathogène, voies de signalisation, voies de défense). La caractérisation des fonctions des facteurs de résistance nécessite de nombreuses données de cartographie de ces facteurs de résistance et le séquençage du génome végétal. Un certain nombre de loci de résistance du pommier à la tavelure ont déjà été identifiés, et le séquençage du génome du pommier devrait être finalisé très prochainement (Velasco et al. 2008).

VI-2- Sélection assistée par marqueurs

La sélection assistée par marqueurs (SAM) facilite l'introduction et la combinaison ciblées des loci de résistance au sein d'un génotype (Dekkers and Hospital 2002). Des marqueurs liés à la plupart des gènes majeurs ont été développés durant la dernière décennie, et sont ainsi disponibles pour la SAM (pour revue, voir Gessler et al. 2006). Comme évoqué précédemment, les recherches sur la résistance monogénique sont bien avancées alors que des efforts plus récents ont été faits pour la caractérisation des sources de résistance polygénique. En outre, il ne faut pas oublier que la présence de l'allèle favorable d'un

marqueur (allèle en phase avec l'allèle favorable du locus d'intérêt) ne signifie pas obligatoirement que le locus d'intérêt est présent, ou *vice versa*. En effet, même si le marqueur et le locus sont liés génétiquement, des événements de recombinaison peuvent briser l'association entre les allèles favorables du marqueur et du locus. Il est évident que plus le marqueur est proche du locus d'intérêt, moins grande est l'erreur due à une éventuelle recombinaison. Avoir un marqueur de part et d'autre du locus d'intérêt augmente la précision et l'efficacité de la SAM ; cette option est préconisée pour la SAM sur QTL en particulier. Bus et al. (2000) ont montré que si le taux de recombinaison entre un marqueur et un locus était de 5%, 14,3% des génotypes sélectionnés n'atteindraient pas le niveau de résistance attendu dans le cas de trois loci cumulés, et 26,5% dans le cas de six loci. En revanche, avec un taux moyen de recombinaison entre marqueurs flanquants de 1%, le pourcentage d'échec ne serait plus que de 3,0 et 5,9, respectivement, taux que les sélectionneurs peuvent considérer comme acceptables.

La SAM pour les résistances à la tavelure de type monogénique est aujourd'hui bien avancée par rapport à son application pour les résistances polygéniques. Des recherches d'optimisation de la SAM chez le pommier ont notamment été menées à la Station Agroscope de Wädenswil en Suisse par Frey et al. (2004). L'efficacité de différentes méthodes de sélection (serre, champ, SAM) a été abordée par Tartarini et al. (2000) dans le cas du gène *Vf*. La présence de ce gène a pu être détectée avec précision du fait de la disponibilité de marqueurs très proches. Les auteurs ont montré que la sélection en serre devait être complétée par une évaluation en champ sur au moins deux ans dans des conditions favorables à la maladie. Par contre, les résultats de la SAM ont révélé que les génotypes de pommier résistants au champ portaient les allèles favorables des marqueurs liés à *Vf* et, réciproquement, que les génotypes sensibles n'en possédaient aucun, à l'exception de quelques recombinants. Par ailleurs, le phénotype seul ne peut permettre de distinguer des génotypes portant des loci de résistance épistatiques, d'où la nécessité de la SAM. Par exemple, d'après l'étude de descendance ségrégeant à la fois pour *Vf* et *Vh4*, Bus et al. (2000) ont conclu que *Vh4* était dominant vis-à-vis de *Vf*: les génotypes présentant une HR (réaction caractéristique de *Vh4*) possédaient soit *Vh4* seul soit *Vh4* et *Vf*.

L'effet du cumul de QTL a été illustré par Durel et al. (2003) dans une descendance 'Prima' x 'Fiesta'. La combinaison des allèles défavorables aux QTL concordait avec une forte sensibilité alors que la combinaison des allèles favorables à ces mêmes QTL se traduisait par une forte résistance. Les niveaux de résistance intermédiaires étaient observés pour les génotypes portant certains des allèles favorables aux QTL considérés. Une sélection assistée par marqueurs de gènes majeurs et QTL de résistance à la tavelure a aussi été réalisée concrètement sur quatre autres descendance en ségrégation pour mieux évaluer les contraintes liées au matériel végétal et aux marqueurs génétiques disponibles chez le pommier (Durel et al. 2005). A cette occasion, une réflexion a été menée sur la construction

d'un index de sélection assistée par marqueurs s'appuyant sur la probabilité de présence des allèles favorables aux gènes majeurs/QTL visés conditionnellement aux données de marquage (complètes ou partielles) disponibles.

Malgré le développement des outils de la SAM, son application dans les programmes de création variétale reste limitée. Les principales raisons sont : (i) le coût élevé du marquage génétique quand de grands effectifs et un nombre important de loci sont analysés, (ii) le manque de recul sur le rapport 'coût/bénéfice', (iii) l'imprécision sur la position des QTL des différents caractères visés (résistance, qualité du fruit), (iv) le manque de recul sur l'attribution des poids propres à chaque locus ciblé dans un index de sélection multi-loci multi-caractères, et (v) le manque d'outils pratiques pour automatiser les différentes étapes de la SAM.

CHAPITRE 2 :

RECHERCHE DE NOUVEAUX LOCI DE RESISTANCE

I- INTRODUCTION

Comme présenté dans le chapitre "Synthèse bibliographique" précédent, deux grands types de résistance à la tavelure existent chez le pommier domestique et les espèces de pommier sauvages apparentées : la résistance de type "tout ou rien" conférée par un gène majeur (résistance monogénique), et la résistance quantitative généralement sous contrôle polygénique. Nous ne disposons actuellement que de très peu de QTL à large spectre contre la tavelure (Durel et al. 2004). Les informations disponibles amènent à en considérer deux : un sur le GL11 et un sur le GL17 de 'Discovery' et de 'Fiesta' pour chacun de ces deux QTL. Or un sélectionneur *a priori* plus intéressé à cibler des QTL à large spectre d'action que des QTL à spectre d'action étroit dans une optique de cumul de QTL.

Au cours de ma thèse, deux approches ont été menées afin de rechercher des QTL supplémentaires de résistance à la tavelure à large spectre d'action vis-à-vis de la variabilité de l'agent pathogène :

(i) l'analyse du déterminisme génétique de la résistance d'un cultivar de pommier, 'Dülmener Rosenapfel', connu pour être résistant dans les vergers allemands et identifié comme résistant vis-à-vis de la quasi-totalité des souches de *Venturia inaequalis* inoculées durant le projet européen DARE ('Durable Apple Resistance in Europe', 1998-2002 ; Lespinasse et al. 2000). Ce cultivar était ainsi une cible d'étude particulièrement intéressante en termes de résistance durable pour identifier, caractériser de nouveaux loci de résistance potentiellement à large spectre, et étudier les éventuelles interactions entre ces loci ;

(ii) l'analyse d'un ensemble de descendances F1 connectées entre elles par leur généalogie (population en pedigree) et correspondant à un sous-ensemble de la population d'amélioration du pommier gérée par l'INRA d'Angers. De ce fait, cette sous-population avait été présélectionnée pour la présence du gène majeur *Vf* lors des étapes initiales de sélection, mais elle pouvait ségréger pour d'autres facteurs de résistance quantitative intéressants à identifier. Cette population était par ailleurs analysée (phénotypée et génotypée) dans le cadre du projet européen HiDRAS ('High-quality Disease Resistance Apples for a Sustainable agriculture', 2002-2007 ; Gianfranceschi and Soglio 2004 ; <http://www.hidras.unimi.it/index.html>) pour la qualité du fruit. Rechercher des QTL à large spectre au sein de cette population permettait d'accroître la valorisation de génotypes de haut niveau agronomique pour la qualité de la pomme.

Dans les deux cas, pour gagner en temps et en efficacité, nous avons opté pour des inoculations avec un mélange de souches appartenant à différentes races de *V. inaequalis* plutôt que pour des inoculations indépendantes souche par souche. Avec un tel mélange, des QTL à large spectre devaient être détectés en priorité.

II- DETERMINISME GENETIQUE DE LA RESISTANCE A LA TAVELURE DE 'DÜLMENER ROSENAPFEL'

Cette partie de la thèse a fait l'objet d'un article accepté dans la revue *Genome* **51** : 657-667 (2008). Quelques points de discussion supplémentaires sont présentés dans la section II-2.

II-1- Inheritance studies of apple scab resistance and identification of *Rvi14*, a new major gene that acts together with other broad-spectrum QTL

V. Soufflet-Freslon, L. Gianfranceschi, A. Patocchi and C.-E. Durel

V. Soufflet-Freslon and C.-E. Durel. INRA, UMR1259 (GenHort), F-49071 Beaucouzé, France – IFR149 Quasav, F-49045 Angers, France.

L. Gianfranceschi. UNIMI, Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, 20133 Milano, Italy.

A. Patocchi. Plant Pathology, Institute of Integrative Biology (IBZ), ETH Zurich, 8092 Zurich, Switzerland; present address: Agroscope Changins-Wädenswil, Plant Protection, Phytopathology, CH-8820 Wädenswil, Switzerland.

Corresponding author: C.-E. Durel, e-mail address: Charles-Eric.Durel@angers.inra.fr

Abstract: Scab, caused by the fungal pathogen *Venturia inaequalis*, is the most common disease of cultivated apple (*Malus x domestica*). The fungal races 6 and 7 have now overcome the major resistance gene *Vf*, which is widely used in apple breeding programmes. New breeding strategies to achieve durable resistance are thus necessary. The aim of this study was to determine the genetic basis of quantitative resistance of the apple cultivar 'Dülmener Rosenapfel', known to be scab resistant under different environmental conditions. An F1 progeny derived from the cross between the susceptible cultivar 'Gala' and 'Dülmener Rosenapfel' was tested in a greenhouse with a multi-isolate inoculum of *V. inaequalis*. *Rvi14*, a new major gene that conditions a chlorotic-type reaction, was mapped on linkage group

(LG) 6 in a genomic region not known to be involved in disease resistance. A further three quantitative trait loci (QTL) for resistance were identified. One co-localized with *Rvi14* on LG6 whereas the remaining two were detected on LG11 and LG17, in genomic regions already reported to carry broad-spectrum QTL in other genetic backgrounds. Since a selective genotyping approach was used to detect QTL, an expectation-maximisation (EM) computation was used to estimate the corrected QTL contributions to phenotypic variation and was validated by entire progeny genotyping.

Key words: *Malus x domestica*, *Venturia inaequalis*, major gene, quantitative resistance, genetic mapping

Résumé : La tavelure, causée par le champignon pathogène *Venturia inaequalis*, est la maladie du pommier cultivé (*Malus x domestica*) la plus répandue. Les races 6 et 7 du champignon ont maintenant contourné le gène majeur de résistance *Vf*, largement utilisé dans les programmes d'amélioration du pommier. De nouvelles stratégies d'amélioration sont alors nécessaires en vue d'une résistance durable. Le but de cette étude était d'étudier le déterminisme génétique de la résistance quantitative de la variété de pommier 'Dülmener Rosenapfel', connue pour être résistante à la tavelure dans différentes conditions environnementales. Une descendance F1 issue du croisement entre la variété sensible 'Gala' et 'Dülmener Rosenapfel' a été testée en serre avec un inoculum multi-souches de *V. inaequalis*. Un nouveau gène majeur, *Rvi14*, déterminant une réaction de type chlorotique, a été localisé sur le groupe de liaison (GL) 6 dans une région génomique pas encore connue pour être impliquée dans la résistance aux maladies. Trois QTL ("Quantitative Trait Loci") de résistance ont été identifiés. Un a co-localisé avec *Rvi14* sur le GL6 alors que les deux autres ont été détectés sur le GL11 et le GL17, dans des régions génomiques déjà connues pour porter des QTL à large spectre dans d'autres fonds génétiques. Les QTL ayant été détectés par génotypage sélectif, leur contribution à la variation phénotypique a été corrigée par maximum de vraisemblance ; cette méthode correctrice a ensuite été validée par le génotypage de la population entière.

Mots clés : *Malus x domestica*, *Venturia inaequalis*, gène majeur, résistance quantitative, cartographie génétique.

II-1-1- Introduction

Apple scab, caused by the fungal pathogen *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wint., is one of the most prevalent diseases in apple-growing areas with high spring and summer rainfall. Most commercial apple cultivars (*Malus x domestica*) are susceptible to this disease and its control requires up to 12-15 fungicide treatments per season. It is now crucial to reduce such intensive use of pesticides in apple orchards for environmental and consumer health reasons and because of the appearance of fungicide resistance. Growing genetically resistant or tolerant apple cultivars should provide an alternative to chemical control of the disease, provided that this resistance is durable.

Scab resistance studies have been focused on identifying major resistance genes, mainly in small-fruited Asiatic *Malus* species. These include *Vf* and *Vfh* from *Malus floribunda* 821 (Bénaouf and Parisi 2000; Williams and Kuc 1969); *Vr-DW*, *Vh2* (also called *Vr* or *Vr-A*), and *Vh4* (also called *Vx* or *Vr1*) from *Malus pumila* R12740-7A (Aldwinckle et al. 1976; Boudichevskaia et al. 2006; Bus et al. 2005a; Dayton and Williams 1968; Hemmat et al. 2002); *Vh8* from *Malus sieversii* (Bus et al. 2005b); *Vbj* from *Malus baccata jackii* (Williams and Kuc 1969); *Vb* from 'Hansen's baccata #2' (Williams and Kuc 1969); *Va* from PI172623 (Lespinasse 1989); *Vm* from *Malus micromalus* 245-38 or *Malus atrosanguinea* 804 (Williams and Kuc 1969); *Vg* from 'Golden Delicious' (Bénaouf and Parisi 1997); *Vr2* from GMAL 2473 (Patocchi et al. 2004); *Vd* from 'Durello di Forlì' (Tartarini et al. 2004). Most of these resistance genes have been mapped in the apple genome (for a review, see Gessler et al. 2006) but only the *Vf* gene has been widely introgressed into the apple selections released over the last 50-60 years (Laurens 1999). However, in the late 1980s, *Vf* was overcome by two new *V. inaequalis* races (race 6, Parisi et al. 1993; race 7, Bénaouf and Parisi 2000). The identification of different fungal races with the ability to overcome specific apple scab resistance genes triggered a need to develop new breeding strategies to promote durable resistance.

Pyramiding of several resistance genes within the same genetic background has been proposed to develop apple cultivars with durable scab resistance (Gessler et al. 2006; MacHardy et al. 2001). However, pyramiding of major resistance genes has proven to be risky in pathosystems such as lettuce-*Bremia lactucae* (Lebeda 1992). Conversely, polygenic quantitative resistance is considered to be more durable (Burdon 1993; Lindhout 2002; Parlevliet 1993; Parlevliet 2002), and combining major and minor resistance genes could offer more stable resistance than combining only major genes. A research programme is thus underway at INRA, Angers, France, to detect quantitative trait loci (QTL) for scab resistance. QTL were identified in cultivars 'Fiesta', 'Discovery' and 'TN10-8' after inoculation of two segregating progenies with several monoconidial isolates in controlled conditions (Calenge et al. 2004; Durel et al. 2003). Some of these QTL were also identified in 'Fiesta' x 'Discovery' progeny grown in unsprayed fields (Liebhard et al. 2003). 'Discovery' showed a high level of

resistance against a wide range of pathogen isolates under different environmental conditions (Laurens et al. 2003) and is a promising candidate for deciphering some of the genetic factors underlying scab resistance. Calenge et al. (2004) showed that 'Discovery' carries a combination of a major gene (*Vg* on LG12) and specific or broad-spectrum QTL on LG2, LG5, LG13, LG15, and LG17.

In the present study, we explored the genetic basis of quantitative resistance against scab of another apple cultivar, 'Dülmener Rosenapfel', which is known to be resistant in unsprayed field conditions (A. Peil, personal communication, 2007). During the European DARE (Durable Apple Resistance in Europe) project (Lespinasse et al. 2000), this cultivar showed resistance to a dozen inocula of *V. inaequalis* under different experimental conditions (Laurens et al. 2003), making it a prime candidate to study new and existing gene combinations for durable scab resistance.

II-1-2- Material and Methods

II-1-2-1- Plant material and Venturia inaequalis isolates

A population of 275 F1 individuals (GaxDR) was derived from a cross between the susceptible cultivar 'Gala' (female parent) and the German resistant cultivar 'Dülmener Rosenapfel' (male parent). Twenty-five susceptible control individuals were derived from a cross between 'Golden Delicious' and 'Granny Smith'. In spring 2005, seedlings were grown in the greenhouse up to the 6-8 leaf stage before inoculation. After a first inoculation, the plants continued to grow for approximately 2 months before pruning and then were transferred for 2.5 months to a cold chamber (1°C) during the summer to mimic winter vernalization. After vernalization and when plant growth resumed, leaves were exposed to a second inoculation in autumn 2005. The parents could not be evaluated because they were not in the growth stage when their progeny and susceptible control individuals were inoculated, but they had been previously evaluated for their disease response in the same greenhouse by Laurens et al. (2003).

Six isolates of *Venturia inaequalis* were used for inoculation. Their origin and characteristics are described in Table 1. The monoconidial isolates 301 and 1066 are reference isolates from the INRA collection (Bénaouf and Parisi 2000). The monoconidial isolates EU-B04, EU-NL19, EU-D42, and EU-NL24 were from the European *V. inaequalis* collection of the European DARE project (Parisi et al. 2004).

Table 1. Characteristics of the *Venturia inaequalis* monoconidial isolates tested on ‘Gala’ x ‘Dülmener Rosenapfel’ progeny.

| Isolate | Host cultivar or hybrid ^a | Country | Race | Inoculation technique ^c |
|---------|--------------------------------------|-----------------|------------------|------------------------------------|
| 301 | 'Prima' x 'Kl 40' | Germany | 1 | droplet |
| EU-B04 | 'Golden Delicious' | Belgium | 1 | spray and droplet |
| EU-NL19 | 'Golden Delicious' | The Netherlands | 1 | spray and droplet |
| EU-D42 | 'Prima' | Germany | 6 | spray and droplet |
| 1066 | <i>Malus floribunda</i> 821 | France | 7 | spray and droplet |
| EU-NL24 | 'Prima' | The Netherlands | 6+7 ^b | spray and droplet |

^a Host cultivars or hybrids from which isolates were collected.

^b Isolate combining the virulences of races 6 and 7.

^c Isolates included in the mixture used for spray-inoculation and/or tested separately for droplet-inoculation.

II-1-2-2- Pathological tests and phenotyping

Two inoculation techniques were used, i.e., spray inoculation and droplet inoculation. In a first step, spray inoculation was used to identify qualitative and quantitative resistance factors in the GaxDR population. In a second step, droplet inoculation was used to characterize the interaction pattern of a new major gene, previously identified by spray inoculation with *V. inaequalis*.

The GaxDR population (275 individuals) and susceptible control seedlings were spray-inoculated in spring 2005 (first screen). Spray inoculation was repeated on a subset of 155 GaxDR individuals and on susceptible control seedlings in autumn 2005 (second screen). For both screens, individuals were spray-inoculated in the greenhouse with a mixture of the same five isolates according to the conditions described by Chevalier et al. (1991). The five isolates (EU-B04, EU-NL19, EU-D42, EU-NL24, and 1066, Table 1) were prepared separately, as described by Parisi and Lespinasse (1996), and mixed in equal proportions. The final concentration of each isolate was about 8×10^4 conidia per ml. The rate of germinated conidia ranged from 56 to 93% after 24 h on an agar plate. After inoculation, the seedlings were incubated under transparent plastic sheets. Humidity was maintained at 90% by misting the greenhouse (with a fogging system) and the air temperature was maintained at 18°C for 48 h to allow conidia germination. The seedlings were then taken out of the sheets, and the humidity was reduced to 70% and the temperature to 17°C until scoring.

A subset of 120 GaxDR individuals was droplet-inoculated in autumn 2005. Six isolates were used for droplet inoculation, including the five isolates used for spray inoculation and another one (301, Table 1). Seedlings were inoculated with each isolate separately, the final conidia concentration was about 4×10^4 conidia per ml and the rate of germinated conidia ranged from 53 to 92%. The 120 individuals were distributed into three groups of 40. Each group was tested with two isolates (group 1: isolates 301 and 1066, group 2: isolates EU-NL19 and EU-NL24, group 3: isolates EU-B04 and EU-D42) and every plant of a group was simultaneously, but separately, inoculated with the two isolates. The droplet inoculation technique was described by Bus et al. (2005b). The seedlings were inoculated by placing 150 μ l of inoculum into small inoculation chambers, which were clipped onto the youngest expanded leaf of actively growing shoots. The seedlings were incubated under transparent plastic sheets for 48 h, and the inoculation chambers were then removed. The environmental conditions in the greenhouse were the same as for the spray inoculation technique.

Chlorotic-type symptoms and sporulation intensity were scored on leaves. The presence or absence of chlorotic-type symptoms was scored at 7 days (spray) or at 11 and 19 days (droplet) after inoculation. For spray inoculation, the sporulation intensity was scored

at 14, 21, and 28 days after inoculation following an ordinal scale corresponding to the percentage of leaf surface showing sporulation (described by Croxall et al. 1952; and modified by Parisi et al. 1993). The ordinal scale was as follows: 0, no sporulation; 1, $0 < \text{sporulation} \leq 1\%$; 2, $1\% < \text{sporulation} \leq 5\%$; 3, $5\% < \text{sporulation} \leq 10\%$; 4, $10\% < \text{sporulation} \leq 25\%$; 5, $25\% < \text{sporulation} \leq 50\%$; 6, $50\% < \text{sporulation} \leq 75\%$; and 7, $75\% < \text{sporulation} \leq 100\%$. AUDPC (area under the disease progress curve) was computed and used to measure scab susceptibility using the ordinal data from the three dates.

II-1-2-3- Statistical analyses

The chi-square test was used to compare the chlorotic-type reaction segregation in the GaxDR progeny with 1:1 segregation. The Mann-Whitney-Wilcoxon test was used to compare AUDPC means of two samples, while Spearman's rank correlation coefficient was implemented to measure correlation between AUDPC computed for both screens.

II-1-2-4- DNA extraction and specific PCR amplification

DNA from the progeny and parental genotypes was isolated from leaves of seedlings and grafted plants, respectively, using the Qiagen® DNeasy 96 plant kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Eighty-three (83) simple sequence repeat (SSR) markers, previously described by Liebhard et al. (2002), Vinatzer et al. (2004), and Silfverberg-Dilworth et al. (2006), were used to screen the GaxDR progeny. An additional SSR marker, HB09-SSR (G.A.L. Broggini et al., unpublished data), was derived from a bacterial artificial chromosome (BAC) clone (Vinatzer et al. 2001) that was isolated using a probe derived from the *HcrVf2* scab resistance gene (homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance genes of the *Vf* region). The set of 84 SSR markers was selected on the basis of polymorphism between 'Dülmener Rosenapfel' and 'Gala', and the distribution spanning the apple genome as assessed in the reference genetic map of Silfverberg-Dilworth et al. (2006). The estimated SSR coverage was about 65% of the genome based on the 'Discovery' reference map (Silfverberg-Dilworth et al., 2006).

PCR amplification of SSR from genomic DNA was performed as described by Gianfranceschi et al. (1998) with minor modifications, including 0.33 μM of both forward and reverse primers, and REDTaq® DNA Polymerase (Sigma-Aldrich, Corporation, St. Louis, MO, USA). Uniplex SSR amplification was done in a Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Waltham, Mass., USA), as described by Gianfranceschi et al. (1998) with minor modifications: 1 cycle of 2 min 30 s at 94°C; 5 cycles of 30 s at 94°C, 1 min annealing at 60°C

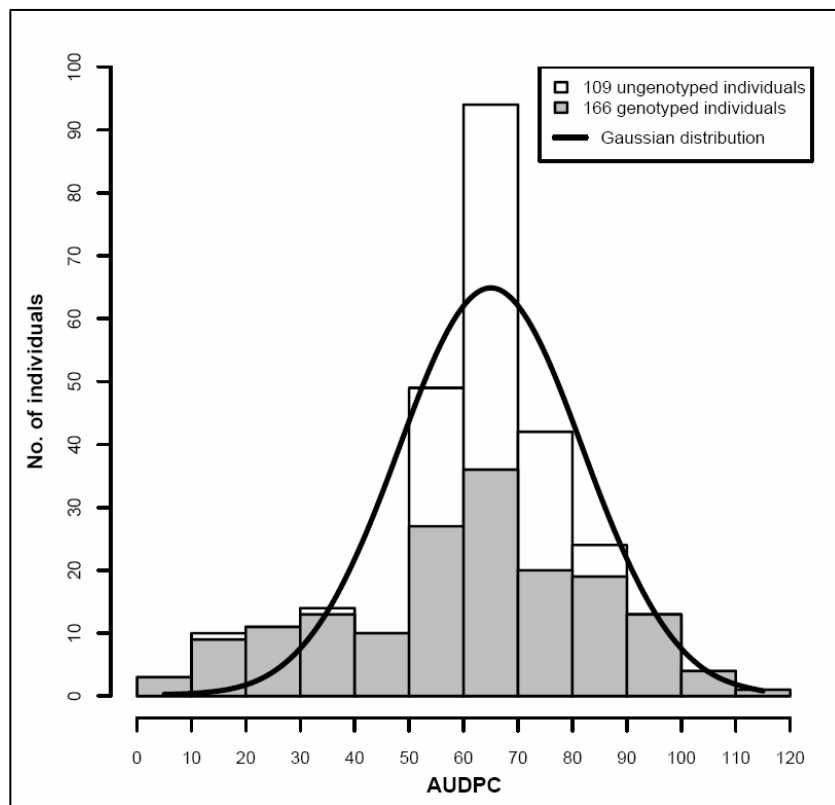


Figure 1. AUDPC distributions for the entire (275 individuals) 'Gala' x 'Dülmener Rosenapfel' progeny and for the subset selected for genetic studies (166 individuals), scored at the first screen.

(dropping 1°C/cycle), 1 min at 72°C; 30 cycles of 30 s at 94°C, 1 min at 55°C, 1 min at 72°C; and a final extension cycle of 10 min at 72°C. A half volume of denaturing gel loading buffer (80% deionized formamide, 10 mM EDTA pH 8.0, 1 mg/ml xylene cyanol, 1 mg/ml bromophenol blue) was added to the PCR product and heated at 95°C for 5 min. Products were separated on 7M urea denaturing 5% polyacrylamide sequencing gels by electrophoresis at 60W for 2 h. PAGE gels were stained using silver nitrate as described by Creste et al. (2001).

Multiplex SSR amplification was performed with the Qiagen® Multiplex PCR kit. The PCR amplification solution consisted of an 11 µl reaction volume containing 5 ng of apple genomic DNA, 1X Qiagen® Multiplex PCR Master Mix, and 0.2 µM of each primer. SSR amplifications were done in a Peltier Thermal Cycler with the following programme: 1 cycle of 15 min at 94°C; 30 cycles of 30 s at 94°C, 1 min 30 s at 55°C, 1 min at 72°C; 1 cycle of 15 min at 55°C; and a final extension cycle of 15 min at 72°C. PCR products were loaded onto an ABI PRISM™ 3130 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, California) with an internal 50-400 bp size standard (GeneScan 400HD ROX, Applied Biosystems). Data were collected with ABI PRISM Data Collection software V3.0 and analysed with ABI PRISM GeneMapper software V3.7 (Applied Biosystems).

II-1-2-5- Selective genotyping

All progeny at the extremes of the first-screen AUDPC scores (beyond one standard deviation from the mean), and 34% of the remaining progeny (within one standard deviation from the mean), were genotyped at every marker to obtain a representative population of 166 individuals (Figure 1). These 166 individuals accounted for 60% of the entire progeny.

In order to demonstrate the efficiency of a maximum likelihood approach for correcting the overestimation of QTL contributions to phenotypic variation, the entire GaxDR progeny of 275 individuals was genotyped for markers closest to the likelihood peaks of the detected QTL (see below).

II-1-2-6- Genetic map construction

The integrated female + male linkage map of GaxDR was constructed using JoinMap® software V3.0 (Van Ooijen and Voorrips 2001, PRI, Wageningen, The Netherlands). The initial map construction was done using a critical LOD (logarithm of odds ratio) score of 6 to associate loci and generate linkage groups. Markers linked to their neighbors with $\text{LOD} \leq 3$ were assigned to linkage groups according to their respective

positions on the apple reference linkage map (Silfverberg-Dilworth et al., 2006). Linkage analysis to refine the marker order within linkage groups was carried out using the standard default settings in JoinMap® for LOD and REC thresholds (1.0 and 0.4, respectively). The final locus order was determined by extensive manual analysis of data points generating double crossovers between flanking loci. Recombination frequencies were converted to map distances using Kosambi's mapping function (Kosambi 1944), and segregation distortions of parental alleles were examined by the chi-square test with a 95% confidence level. Linkage groups were assigned according to the position of common markers and numbering described by Maliepaard et al. (1998).

II-1-2-7- QTL detection

Two sets of 166 and 135 jointly phenotyped and genotyped individuals were available for QTL analyses for the first and the second screens, respectively. Twenty individuals, among the 155 inoculated for the second screen, were stunted and not scored, leaving only 135 individuals for QTL analysis.

QTL detection was performed using AUDPC data with MapQTL® software V4.0 (Van Ooijen et al. 2002, PRI, Wageningen, The Netherlands). MapQTL® software is able to deal with a full-sib family derived from heterozygous parents of a cross-pollinating species (e.g. apple). The integrated linkage map was used for detection of both additive and dominance effects.

The AUDPC data scored in the first screen (i.e. with a normal distribution for the entire progeny) was used for interval mapping. A LOD threshold at which a QTL was declared significant ($p=0.05$) was determined using 1000 permutations (Churchill and Doerge 1994). Each significant QTL was characterized by its LOD score and its confidence interval, corresponding to a LOD score drop of 1 or 2 on either side of the likelihood peak with a probability over 90% and 95%, respectively (Van Ooijen 1992). A multiple analysis of variance (ANOVA), including molecular markers closest to the QTL peaks and their first-order interaction, was performed to test the effects of parental alleles and epistatic effects among QTL (SAS 2000). QTL detection using AUDPC data in the second screen (non-normal distribution) was achieved by performing a Kruskal-Wallis test at each marker.

II-1-2-8- QTL contributions to phenotypic variation

Selective genotyping is known to lead to overestimation of QTL effects (Lander and Botstein 1989). Different solutions have been proposed to account for such overestimations (e.g. Muranty and Goffinet 1997, Xu and Vogl 2000), but they have been rarely implemented

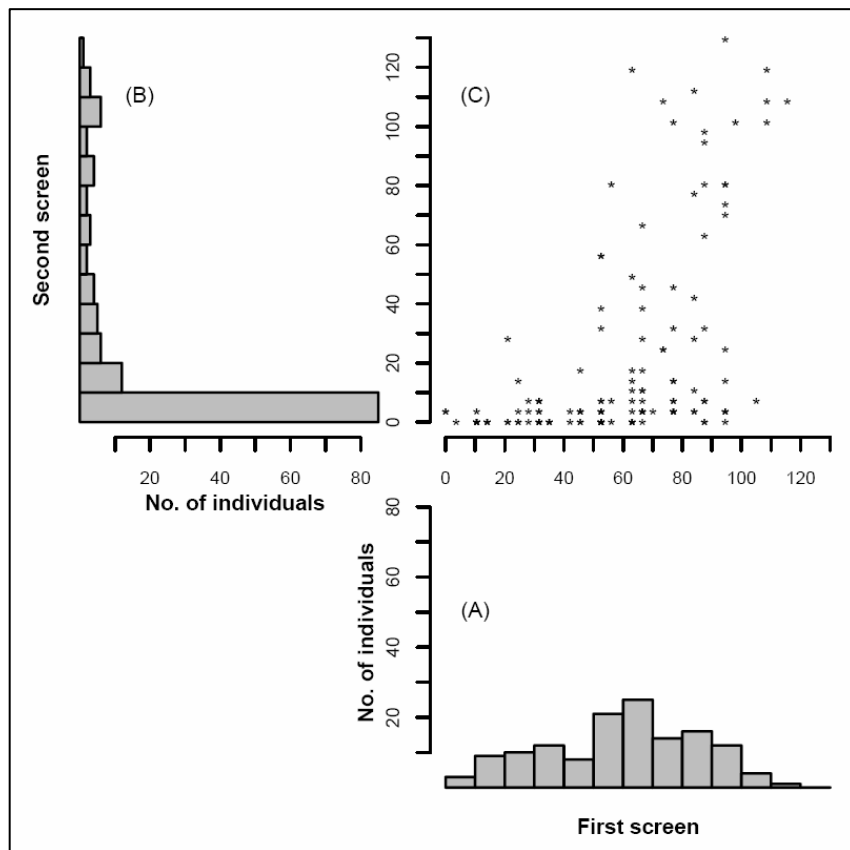


Figure 2. AUDPC for 'Gala' x 'Dülmener Rosenapfel' progeny after co-inoculation with five *Venturia inaequalis* isolates: (A) AUDPC distribution for the first screen; (B) AUDPC distribution for the second screen; (C) Individuals plotted for both screens.

in QTL mapping software. MapQTL® is able to take selective genotyping into account in single-interval mapping but not in multiple-QTL mapping (MQM function). Thus we developed the following approach to compute unbiased QTL contributions to phenotypic variation when there were several QTL. To validate our approach, we compared such unbiased QTL contributions with QTL contributions computed with complete genotyping data (i.e. with genotyping data from the entire GaxDR progeny of 275 individuals for markers closest to the QTL peaks).

- 1- QTL detection: QTL were detected using the single-QTL model of MapQTL® (Interval Mapping function) using phenotypic and genotypic data from the 166 individuals.
- 2- Overestimated effects: ANOVA, using data from the 166 individuals and including markers closest to the QTL peaks allowed joint analysis of the effects of QTL-associated markers and computation of the total percentage of explained phenotypic variation (R^2). The contribution of each QTL-associated marker to phenotypic variation was calculated according to Scherrer (1984).
- 3- EM-correction: an expectation-maximization (EM) computation implemented within NORM software (Schafer 1999) was used to estimate the corrected simple linear correlation coefficients between phenotype and QTL-associated markers or among QTL-associated markers. The EM-corrected simple linear correlation coefficients were then used for unbiased computation of the contribution of each QTL-associated marker and of the total R^2 according to Scherrer (1984).
- 4- Validation: complete genotyping of QTL-associated markers was analyzed on the entire unselected progeny and the total R^2 computed by ANOVA. The contribution of each QTL-associated marker was re-estimated (Scherrer 1984). These values (total R^2 and QTL contributions) were compared with the respective EM-corrected values computed in step 3.

II-1-3- Results

II-1-3-1- Phenotyping

Susceptible control individuals displayed a high level of sporulation on leaves for both screens. AUDPC in the first screen (83.7 ± 15.3) was significantly lower ($p < 0.02$) than AUDPC in the second screen (101.2 ± 39.0). AUDPC in the GaxDR progeny exhibited different distributions between the first and second screens (Figure 2). The distribution was close to normal in the first screen whereas most of individuals were either completely resistant or slightly susceptible, thus giving a highly skewed distribution, in the second

Table 2. Segregation of a chlorotic-type reaction in 'Gala' × 'Dülmener Rosenapfel' progeny after co-inoculation with five *Venturia inaequalis* isolates in both screens.

| | No. of individuals | Chlorotic-type reaction | | | X ² value | p value |
|---|--------------------|-------------------------|--------|---------|----------------------|---------|
| | | Present | Absent | d.t.s.* | | |
| 1 st screen | 275 | 113 | 126 | 36 | 0.71 | 0.40 |
| 2 nd screen | 155 | 61 | 60 | 34 | 0.01 | 0.93 |
| 1 st screen + 2 nd screen | 275 | 129 | 120 | 26 | 0.33 | 0.57 |

* difficult to score

screen. Average AUDPC was significantly higher ($p < 0.0001$) in the first screen (59.0 ± 27.1) than in the second screen (22.0 ± 34.1). The rank correlation coefficient between the two screens was 0.58 ($p < 0.0001$). Note that only individuals tested in both screens were included in the above analyses (susceptible controls and GaxDR progeny).

A total of 129 out of 275 individuals of the GaxDR progeny displayed a chlorotic-type reaction scored on leaves 7 days after inoculation with the mixture of five isolates of *Venturia inaequalis* (symptoms scored in the first screen and checked in the second screen on spray-inoculated seedlings; Table 2). This segregation did not differ significantly from 1:1 segregation [$P(X^2 \geq 0.33) = 0.57$], which confirmed the assumed segregation of a single heterozygous gene in one of the parents.

II-1-3-2- Genetic mapping of a new major gene in apple

The chlorotic-type reaction was mapped as a qualitative trait at the distal end of LG6 in the apple genome. The gene associated with this reaction was found to derive from 'Dülmener Rosenapfel'. The gene was assigned *Rvi14* (previously called *Vdr1*, Freslon et al. 2006) according to the new nomenclature of scab races proposed by Bus et al. (2008). On the integrated linkage map, the genetic distance between *Rvi14* and the nearest marker, HB09-SSR, was 4.0 cM (LOD=52.0, 253 individuals). The size of the HB09-SSR allele coupling with *Rvi14* was 210 bp. The linkage of *Rvi14* to CH03d07 and NZ23g04 was also significant at an LOD of 21.65 and 5.22, respectively (Figure 3).

II-1-3-3- Characterization of the interaction pattern of Rvi14 with Venturia inaequalis

Six independent monoconidial isolate inoculations were performed on three subsets of the segregating population. The chlorotic-type reaction was observed only with the two isolates EU-NL24 and EU-NL19 in individuals that had already shown this reaction in the first screen (apart from 1 to 3 escapes). Nevertheless, both isolates sporulated on leaves of some individuals carrying *Rvi14*, with EU-NL19 sporulating more frequently than EU-NL24 (47% and 25%, respectively). The other four isolates did not elicit the chlorotic-type reaction on individuals identified as carrying *Rvi14* during the first screen. Isolates EU-D42 and EU-B04 caused sporulation on most of the individuals whereas isolates 301 and 1066 sporulated on about one third of the individuals.

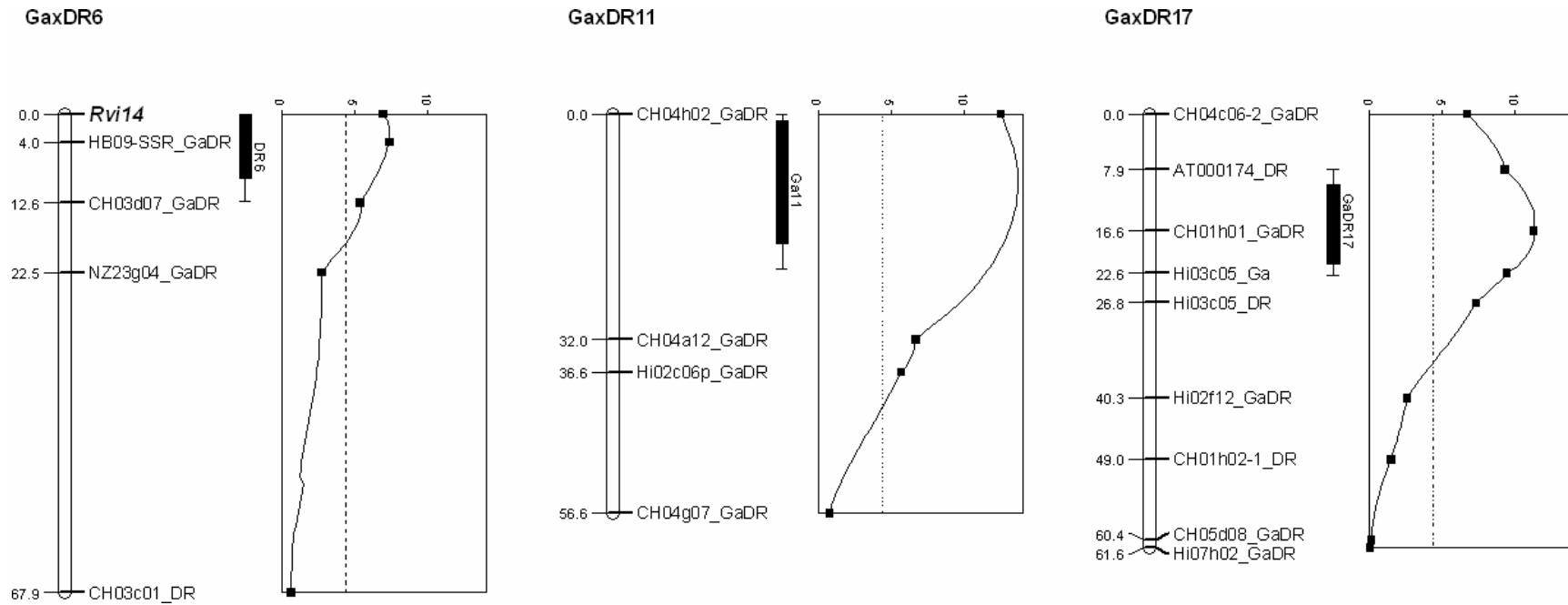


Figure 3. Genomic localization of QTL for AUDPC and LOD plots for linkage groups 6, 11, and 17 of the ‘Gala’ x ‘Dülmener Rosenapfel’ integrated linkage map (interval mapping detection), after co-inoculation with five *Venturia inaequalis* isolates.

II-1-3-4- QTL analyses

For AUDPC data on 166 individuals in the first screen (selective genotyping), three QTL located on different linkage groups of the GaxDR integrated linkage map were significantly associated with scab resistance (Table 3). Two QTL were mapped to distal regions, i.e. one on LG6 (LOD=7.42, Figure 3) and one on LG11 (LOD=13.69, Figure 3). The third QTL was mapped to the proximal region of LG17 (LOD=11.32, Figure 3). The QTL on LG6 was detected in 'Dülmener Rosenapfel' (male effect) while the QTL on LG11 was detected in 'Gala' (female effect) (Table 3). The QTL on LG17 was detected in both parents (Table 3). ANOVA including molecular markers closest to the QTL peaks and their first-order interaction showed slight epistatic interactions ($0.01 < p < 0.05$) between LG11 (CH04h02) and LG6 (HB09-SSR) or LG17 (CH01h01). ANOVA was thus restricted to variation factors with a highly significant effect ($p < 0.01$), i.e. the male marker for the QTL on LG6, the female marker for the QTL on LG11, and both parents' markers for the QTL on LG17. The QTL on LG6 was located close to *Rvi14* and the peak of the QTL co-localized with the marker HB09-SSR (Figure 3). The quantitative resistance allele was involved in coupling with the favourable *Rvi14* allele.

The three scab resistance QTL detected in the first screen were confirmed in the second screen in 135 individuals, i.e. QTL on LG6 (marker HB09-SSR, $p < 0.001$), LG11 (marker CH04h02, $p < 0.0001$), and LG17 (marker CH01h01, $p < 0.0001$).

II-1-3-5- QTL contributions to phenotypic variation

R^2 were estimated from the first screen phenotypic data. The total R^2 computed with the complete genotyping data for the 275 individuals was 42.7% whereas it was 54.8% for the selected dataset for 166 individuals (Table 3). Selective genotyping resulted in overestimation of the total R^2 of about 12%. On the other hand, the EM-corrected R^2 was 44.9%, which is close to the R^2 computed with complete genotyping data. Similar patterns were observed for each QTL contribution to phenotypic variation (Table 3).

II-1-4- Discussion

II-1-4-1- A new genomic region involved in apple scab resistance

In addition to genomic regions already known to be involved in the control of scab resistance (major genes and QTL) in several apple cultivars, a new region was identified in

Table 3. Individual and combined QTL contributions to the scab disease variation in 'Gala' x 'Dülmener Rosenapfel' progeny after co-inoculation with five *Venturia inaequalis* isolates in the first screen.

| LG | Marker ^a | Favourable allele size ^b | Selective genotyping ^c | EM-correction | Complete genotyping |
|-------------|---------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|---------------------|
| | | | (166 individuals) | (275 individuals) | (275 individuals) |
| LG6 | HB09-SSR_DR | 210bp | 12.3 | 10.1 | 10.0 |
| LG11 | CH04h02_Ga | 185bp | 22.4 | 18.3 | 18.9 |
| LG17 | CH01h01_Ga | 136bp | 14.4 | 11.8 | 9.4 |
| | CH01h01_DR | 132bp | 5.7 | 4.7 | 4.4 |
| Total R^2 | | | 54.8 | 44.9 | 42.7 |

^a SSR the closest to the likelihood peak of each QTL.

^b Favourable parental alleles associated with scab resistance.

^c i.e. overestimated values.

the German cultivar 'Dülmener Rosenapfel' at the distal end of LG6. No other resistance genes, for scab or any other apple diseases, have been identified in this region of the apple genome. Despite some sporulation on seedlings exhibiting a chlorotic-type reaction, the *Rvi14* gene appears to confer resistance to isolates EU-NL24 (virulences of races 6 and 7) and EU-NL19 (race 1), which would carry a corresponding avirulence gene. A similar situation has often been described for the *Vf* gene, which was found to confer complete resistance or only allow some sporulation in favourable controlled conditions, despite the fact that it has a substantial effect against *Venturia inaequalis* in the orchard when not overcome by races 6 and 7 (Chevalier et al. 1991; Gardiner et al. 1996; Gessler et al. 2006).

The *Rvi14* gene determines a chlorotic-type reaction, similar to the *Vf* gene phenotype (e.g. in cultivar 'Florina'). Moreover, the marker HB09-SSR was derived from a BAC clone which had been identified after hybridization with the *HcrVf2* gene (Vinatzer et al. 2001), which is the most probable candidate for the *Vf* resistance gene (Belfanti et al. 2004; Xu and Korban 2002). Allo or auto-polyploidy has been implicated in the origin of the apple genome (Challice 1981; Darlington and Moffett 1930; Sax 1933) and several duplicated regions have been identified in the apple genome (Chevreau and Laurens 1987; Chevreau et al. 1985; Maliepaard et al. 1998). The LG6 genomic region carrying the *Rvi14* gene thus might be homeologous to the LG1 region carrying the *Vf* gene. These two chlorotic-type resistance genes (or gene clusters) might derive from the same ancestor and might have duplicated and diverged over evolutionary time.

Co-localization of resistance QTL with major resistance genes has been observed in apple (Durel et al. 2003, Bus et al. 2004) and in numerous other plant species such as rapeseed (Manzanares-Dauleux et al. 2000), common bean (Kelly and Vallejo 2004) and poplar (Jorge et al. 2005). Most of the resistance genes characterized at the molecular level belong to allelic series or to families of tightly linked genes (Hulbert et al. 2001). Therefore major genes and co-localizing QTL could be members of the same allelic series, as suggested by Robertson (1985), or members of a multigene family. Co-localization of the QTL detected on LG6 with *Rvi14* suggests that both resistance factors actually belong to the same locus, or that they are part of the same gene family. In the first case, the *Rvi14* gene would control both the chlorotic-type reaction for isolates carrying a corresponding avirulence factor (EU-NL19 and EU-NL24) and some residual resistance to the virulent isolates (all of the other four). The mixed inoculum we used did not enable us to clarify whether *Rvi14* had a general effect towards all the isolates tested or a differential effect dependent on the isolates present in the mixture and their relative proportions. Physical mapping and sequencing of BAC clones should reveal whether a single gene for *Rvi14* or a cluster of genes at the *Rvi14* locus provides differential resistance to apple scab.

II-1-4-2- Two confirmed genomic regions involved in partial resistance to scab in apple

Two QTL were detected on LG11 and LG17 of the GaxDR integrated linkage map, with the mixture of isolates of *Venturia inaequalis*. These QTL have already been reported by Durel et al. (2003) in grafted progeny of 'Prima' x 'Fiesta' inoculated in a controlled climatic chamber with two monoconidial isolates of race 6. The QTL on LG17 was detected only in 'Fiesta', whereas the QTL on LG11 was detected in both 'Prima' and 'Fiesta'. QTL on LG11 and LG17 were also identified by Liebhard et al. (2003) in 'Fiesta' x 'Discovery' progeny grown in field conditions with a Swiss local inoculum. The QTL on LG11 was only detected in 'Discovery' whereas the QTL on LG17 was detected in both parents. Likewise, Calenge et al. (2004) showed a significant effect of the QTL on LG17 in seedlings and grafted plants derived from a 'Discovery' x 'TN10-8' cross, which were inoculated in greenhouse conditions with isolates of races 1, 6, 7, and '6 + 7', and with two local inocula from France and Switzerland. This QTL was detected in 'Discovery'. The previous results and ours thus demonstrate the stability of these two genomic regions in the control of partial scab resistance. Indeed, these QTL are expressed in different genetic backgrounds, physiological stages and environmental conditions. Based on previous studies, it could be postulated that these are broad-spectrum QTL, as supported by our study involving an inoculum consisting of various *V. inaequalis* isolates. Each isolate of our inoculum would need to be separately tested to confirm the broad spectrum of the QTL detected in 'Dülmener Rosenapfel' and 'Gala'.

II-1-4-3- QTL contributions to phenotypic variation

Selective genotyping resulted in overestimation of both the total R^2 and the QTL contributions to phenotypic variation. The correction by maximum likelihood (EM-correction as proposed by Xu and Vogl 2000) provided a reasonable R^2 estimation; the same was true for each QTL contribution. Here we validated this EM-correction with experimental data, which has seldom been achieved to date. Another approach to correct the overestimation of QTL contributions was proposed by Lagarrigue et al. (2006) for QTL detected in chicken. It is based on the hypothesis of strict truncations of the normal distribution, i.e. a situation that was not adapted to our experimental conditions. In the present study, the slight overestimation observed in the EM-correction when compared with complete genotyping might have been due to some deviation from the Gaussian distribution for AUDPC (Figure 1).

The contribution of the three detected QTL ranged from 4.4% to 18.9% (Table 3). In a previous study (Durel et al. 2003), the QTL detected on LG11 explained 16-23% of

phenotypic variation, according to *V. inaequalis* isolates used in the greenhouse. The contribution of this QTL in field conditions was estimated at 11% (Liebhard et al. 2003). The contribution reported in our study (18.9%) is in agreement with these previous results. On the other hand, the QTL detected on LG17 explained 10-13% of phenotypic variation (Durel et al. 2003). In a second greenhouse study (Calenge et al. 2004), the contribution of this QTL ranged from 5% to 19%, but was higher than 10% with most tested isolates. The contribution of this QTL was about 23% in field conditions (Liebhard et al. 2003). In our study, the QTL on LG17 accounted for a maximum contribution of 9.4% to phenotypic variation, which is lower than noted in previous studies. Comparing QTL contributions is meaningful only if genetic variations are similar among different studies since these contributions are assessed in relative terms (%). However, data obtained in the above studies did not enable us to check this condition, so the above comparisons have to be considered cautiously.

II-1-4-4- Genetic determinants of resistance

The small number of genomic regions apparently involved in the quantitative scab resistance of 'Dülmener Rosenapfel' contrasts with the higher number of such regions detected for 'Discovery' scab resistance by Calenge et al. (2004). Different factors could explain this discrepancy: (i) phenotypes of each individual were less accurately estimated with single-copy seedlings, as in the present study, than with multiple-copy grafted plants, as tested in the 'Discovery' genetic analysis, and small QTL effects were thus less easily detected in our study; (ii) only one mixture of *Venturia inaequalis* isolates was used here, whereas eight successive inocula with either monoconidial isolates or local isolates were used on the 'Discovery' progeny, so specific QTL may be missing here; (iii) some regions of the apple genome were not covered by markers in the present GaxDR linkage map, so a complete genome scan could not be performed; (iv) there may be more "homozygous" or epistatic undetected genetic factors in 'Dülmener Rosenapfel' than in 'Discovery'.

Note that AUDPC showed a normal distribution in the GaxDR progeny in the first screen, whereas it became highly skewed towards resistance in the second screen. This variation between the two screens has also been observed in other progenies derived from 'Dülmener Rosenapfel' (unpublished results). In the first screen, inoculated plants were very young seedlings (6-8 leaves after seed germination), whereas they were physiologically older in the second screen. The differences in data distribution between the first and the second screen may have been due to the differential expression of resistance at different physiological stages. The expression of seedling and adult plant resistances can be controlled by different genes, which is particularly common in several plant species (e.g. resistance to powdery mildew (Wang et al. 2005) or to stripe rust (Bariana et al. 2006) in wheat, resistance to leaf rust in barley (Qi et al. 1998), and resistance to stem canker in rapeseed (Delourme et

al. 2004)). In other situations, some resistance genes are effective at both seedling and adult stages (Camargo et al. 1995), whereas others are effective only in adult plants (Zhang and Knott 1993). Such developmentally regulated resistance genes could also be present in apple.

Another interesting point was the presence of two QTL detected in 'Gala'. This cultivar is commonly regarded as a reference apple genotype for scab susceptibility. Indeed, so far 'Gala' has been considered susceptible, regardless of the *V. inaequalis* isolate. For instance, Laurens et al. (2003) tested the same isolates as those used in our experiment, except for isolate 301, and showed that 'Gala' was highly susceptible to all the tested isolates. Nevertheless, macroscopic and microscopic studies have shown that its level of susceptibility differs according to the fungal isolate (M. Chevalier, personal communication, 2007). In the greenhouse, 'Gala' can thus be considered a "moderately" susceptible cultivar. Our study showed that 'Gala' carries at least two QTL whose effects alone are not sufficient to confer a high level of resistance. Many authors have pointed out the contribution of susceptible genotypes to disease resistance, and this effect was weak (Lefebvre and Palloix 1996; Schön et al. 1993) or moderate (Paillard et al., 2004; Pilet et al. 1998).

Acknowledgments. We thank C. Denancé, J.-M. Boré, M. Boucourt, L. Leclout and Y. Rabineau for excellent technical assistance in the laboratory and greenhouse. L. Parisi and P. Expert are acknowledged for providing the *Venturia inaequalis* isolates. V. Bus gave valuable advice on disease assessment for the droplet inoculation technique. We are grateful to N. Sapoukhina for her scientific assistance on expectation-maximisation computation. We also thank S. Coëdel, Head of the Ouest-genopole genotyping platform (<http://www.ouest-genopole.org/>, INRA-UMR APBV-Bio3P, Le Rheu, France), for producing about half the genotypic data. This work was supported by a grant from the Communauté d'Agglomération Angers-Loire-Métropole to V. Soufflet-Freslon, and was partly supported by the Région Pays de la Loire within the framework of the Contrat Etat-Région 2000-2006, programme "Horticulture", and of the regional contract COSAVE 2007-2009.

References

- Aldwinckle, H.S., Gustafson, H.L., and Lamb, R.C. 1976. Early determination of genotypes for apple scab resistance by forced flowering of test cross progenies. *Euphytica*, **25**: 185-191.
- Bariana, H.S., Parry, N., Barclay, I.R., Loughman, R., McLean, R.J., Shankar, M., Wilson, R.E., Willey, N.J., and Francki, M. 2006. Identification and characterization of stripe rust resistance gene *Yr34* in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **112**: 1143-1148.
- Belfanti, E., Silfverberg-Dilworth, E., Tartarini, S., Patocchi, A., Barbieri, M., Zhu, J., Vinatzer, B.A., Gianfranceschi, L., Gessler, C., and Sansavini, S. 2004. The *HcrVf2* gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101**(3): 886-890.
- Bénaouf, G., and Parisi, L. 1997. Pathogenicity of *Venturia inaequalis* strains from *Malus floribunda* 821: comparison with race 6 on apple clones. *IOBS/WPRS Bull.* **20**(9): 8-11.
- Bénaouf, G., and Parisi, L. 2000. Genetics of host-pathogen relationships between *Venturia inaequalis* races 6 and 7 and *Malus* species. *Phytopathology*, **90**(3): 236-242.
- Boudichevskaia, A., Flachowsky, H., Peil, A., Fischer, C., and Dunemann, F. 2006. Development of a multiallelic SCAR marker for the scab resistance gene *Vr1/Vh4/Vx* from R12740-7A apple and its utility for molecular breeding. *Tree Genetics and Genomes*, **2**(4): 186-195.
- Burdon, J.J. 1993. Genetic variation in pathogen populations and its implications for adaptation to host resistance. *In* Durability of disease resistance. *Edited by* T. Jacobs and J.E. Parlevliet. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. pp. 41-56.
- Bus, V.G.M., Laurens, F., Weg, W.E.v.d., Rusholme, R.L., Rikkerink, E.H.A., Gardiner, S.E., Bassett, H.C.M., Kodde, L.P., and Plummer, K.M. 2005b. The *Vh8* locus of a new gene-for-gene interaction between *Venturia inaequalis* and the wild apple *Malus sieversii* is closely linked to the *Vh2* locus in *Malus pumila* R12740-7A. *New Phytologist*, **166**(3): 1035-1049.
- Bus, V.G.M., Rikkerink, E.H.A., Weg, W.E.v.d., Rusholme, R.L., Gardiner, S.E., Bassett, H.C.M., Kodde, L.P., Parisi, L., Laurens, F.N.D., Meulenbroek, E.J., and Plummer, K.M. 2005a. The *Vh2* and *Vh4* scab resistance genes in two differential hosts derived from Russian apple R12740-7A map to the same linkage group of apple. *Molecular Breeding*, **15**(1): 103-116.
- Bus, V.G.M., Rikkerink E.H.A., Aldwinckle H.S., Caffier V., Durel C.E., Gardiner S., Gessler C., Groenwold R., Laurens F., Le Cam B., Luby J., Meulenbroek B., Kellerhals M., Parisi L., Patocchi A., Plummer K., Schouten H.J., Tartarini S. and Weg W.E.v.d. 2008. A proposal for the nomenclature of *Venturia inaequalis* races. *Acta Horticulturae* (in press).
- Bus, V., Weg, W.E.v.d., Durel, C.E., Gessler, C., Parisi, L., Rikkerink, E., Gardiner, S., Meulenbroek, B., Calenge, F., Patocchi, A., and Laurens, F., 2004. Delineation of a scab resistance gene cluster on linkage group 2 of apple. *Acta Horticulturae*, **663**: 57-62.
- Calenge, F., Faure, A., Goerre, M., Gebhardt, C., Weg, W.E.v.d., Parisi, L., and Durel, C.E. 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**(4): 370-379.

- Camargo, L.E.A., Williams, P.H., and Osborn, T.C. 1995. Mapping of quantitative trait loci controlling resistance of *Brassica oleracea* to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the field and greenhouse. *Phytopathology*, **85**(10): 1296-1300.
- Challice, J.S. 1981. Chemotaxonomic studies in the *Rosaceae* and the evolutionary origins of the subfamily *Maloideae*. *Preslia*, **53**: 289-304.
- Chevalier, M., Lespinasse, Y., and Renaudin, S. 1991. A microscopic study of the different classes of symptoms coded by the *Vf* gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*). *Plant Pathology*, **40**(2): 249-256.
- Chevreau, E., and Laurens, F. 1987. The pattern of inheritance in apple (*Malus x domestica* Borkh.): further results from leaf isozyme analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, **75**(1): 90-95.
- Chevreau, E., Lespinasse, Y., and Gallet, M. 1985. Inheritance of pollen enzymes and polyploid origin of apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Theoretical and Applied Genetics*, **71**(2): 268-277.
- Churchill, G.A., and Doerge, R.W. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, **138**(3): 963-971.
- Creste, S., Tullmann Neto, A., and Figueira, A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, **19**(4): 299-306.
- Croxall, H.E., Gwynne, D.C., and Jenkins, J.E.E. 1952. The rapid assessment of apple scab on leaves. *Plant Pathology*, **1**: 39-41.
- Darlington, C.D., and Moffett, A.A. 1930. Primary and secondary chromosome balance in *Pyrus*. *Journal of genetics*, **22**: 129-151.
- Dayton, D.F., and Williams, E.B. 1968. Independent genes in *Malus* for resistance to *Venturia inaequalis*. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science*, **92**: 89-94.
- Delourme, R., Pilet-Nayel, M.L., Archipiano, M., Horvais, R., Tanguy, X., Rouxel, T., Brun, H., Renard, M., and Balesdent M.H. 2004. A cluster of major specific resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Phytopathology*, **94**(6): 578-583.
- Durel, C.E., Parisi, L., Laurens, F., Weg, W.E.v.d., Liebhard, R., and Jourjon, M.F. 2003. Genetic dissection of partial resistance to race 6 of *Venturia inaequalis* in apple. *Genome*, **46**(2): 224-234.
- Freslon, V., Bus, V.G.M., Gianfranceschi, L., Patocchi, A., and Durel, C.E. 2006. Identification and genetic characterisation of *Vdr1*, a new major scab resistance gene from the apple cultivar 'Dülmener Rosenapfel'. In 3rd International Rosaceae Genomics Conference, Napier, New Zealand, March 2006. p.63. Available from http://www.bioinfo.wsu.edu/gdr/community/conferences/RG3_abstracts.pdf. [Abst.]
- Gardiner, S.E., Bassett, H.C.M., Noiton, D.A.M., Bus, V.G.M., Hofstee, M.E., White, A.G., Ball, R.D., Forster, R.L.S., and Rikkerink, E.H.A. 1996. A detailed linkage map around an apple scab resistance gene demonstrates that two disease resistance classes both carry the *Vf* gene. *Theoretical and Applied Genetics*, **93**: 485-493.
- Gessler, C., Patocchi, A., Sansavini, S., Tartarini, S., and Gianfranceschi, L. 2006. *Venturia inaequalis* resistance in apple. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **25**: 473-503.
- Gianfranceschi, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M., and Gessler, C. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theoretical and Applied Genetics*, **96**(8): 1069-1076.
- Hemmat, M., Brown, S.K., and Weeden, N.F. 2002. Tagging and mapping scab resistance genes from R12740-7A apple. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **127**(3): 365-370.
- Hulbert, S.H., Webb, C.A., Smith, S.M., and Sun, Q. 2001. Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Annual Review of Phytopathology*, **39**(1): 285-312.

- Jorge, V., Dowkiw, A., Faivre-Rampant, P., and Bastien, C. 2005. Genetic architecture of qualitative and quantitative *Melampsora larici-populina* leaf rust resistance in hybrid poplar: genetic mapping and QTL detection. *New Phytologist*, **167**(1): 113-127.
- Kelly, J.D., and Vallejo, V.A. 2004. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. *HortScience*, **39**(6): 1196-1207.
- Kosambi, D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* **12**: 172-175.
- Lagarrigue, S., Pitel, F., Carré, W., Abasht, B., Le Roy, P., Neau, A., Amigues, A., Sourdioux, M., Simon, J., Cogburn, L., Aggrey, S., Leclercq, B., Vignal, A., and Douaire, M. 2006. Mapping quantitative trait loci affecting fatness and breast muscle weight in meat-type chicken lines divergently selected on abdominal fatness. *Genetics Selection Evolution*, **38**: 85-97.
- Lander, E.S., and Botstein, D. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, **121**: 185-199.
- Laurens, F. 1999. Review of the current apple breeding programmes in the world: objectives for scion cultivar improvement. *Acta Horticulturae*, **484**: 163-170.
- Laurens, F., Chevalier, M., Dolega, E., Genneri, F., Goerre, M., Fischer, C., Kellerhals, M., Lateur, M., Lefrancq, B., Parisi, L., Shouten, H., and Tartarini, S. 2003. Local European cultivars as sources of durable scab resistance in apple. *ISHS. Acta Horticulturae*, **663**: 115-121.
- Lebeda, A. 1992. The level of field resistance to *Bremia lactucae* in lettuce (*Lactuca sativa*) cultivars carrying the resistance gene *Dm11*. *Plant Breeding*, **108**(2): 126-131.
- Lefebvre, V., and Palloix, A., 1996. Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease: a case study, the interaction pepper-*Phytophthora capsici* Leonian. *Theoretical and Applied Genetics*, **93**: 503-511.
- Lespinasse, Y. 1989. Breeding pome fruits with stable resistance to disease: genes, resistance mechanisms, present work and prospects. *IOBC-WPRS Bull.* **12**: 100-115.
- Lespinasse, Y., Durel, C.E., Laurens, F., Parisi, L., Chevalier, M., and Pinet, C. 2000. A European project: D.A.R.E. - durable apple resistance in Europe (FAIR5 CT97-3898) durable resistance of apple to scab and powdery-mildew: one step more towards an environmental friendly orchard. *Acta Horticulturae*, **538**(1): 197-200.
- Liebhart, R., Gianfranceschi, L., Koller, B., Ryder, C.D., Tarchini, R., Weg, W.E.v.d., and Gessler, C. 2002. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Molecular Breeding*, **10**(4): 217-241.
- Liebhart, R., Koller, B., Patocchi, A., Kellerhals, M., Pfammatter, W., Jermini, M., and Gessler, C. 2003. Mapping quantitative field resistance against apple scab in a 'Fiesta' x 'Discovery' progeny. *Phytopathology*, **93**(4): 493-501.
- Lindhout, P. 2002. The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica*, **124**(2): 217-226.
- MacHardy, W.E., Gadoury, D.M., and Gessler, C. 2001. Parasitic and biological fitness of *Venturia inaequalis*: relationship to disease management strategies. *Plant Disease*, **85**(10): 1036-1051.
- Maliepaard, C., Alston, F.H., Arkel, G.v., Brown, L.M., Chevreau, E., Dunemann, F., Evans, K.M., Gardiner, S., Guilford, P., Heusden, A.W.v., Janse, J., Laurens, F., Lynn, J.R., Manganaris, A.G., Nijs, A.P.M.d., Periam, N., Rikkerink, E., Roche, P., Ryder, C., Sansavini, S., Schmidt, H., Tartarini, S., Verhaegh, J.J., Vrielink-van Ginkel, M., and King, G.J. 1998. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **97**(1/2): 60-73.
- Manzanares-Dauleux, M.J., Delourme, R., Baron, F., and Thomas, G. 2000. Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to clubroot in *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics*, **101**(5/6): 885-891.

- Muranty, H., and Goffinet, B. 1997. Selective genotyping for location and estimation of the effect of quantitative trait locus. *Biometrics*, **53**: 629-643.
- Paillard, S., Schnurbusch, T., Tiwari, R., Messmer, M., Winzeler, M., Keller, B., and Schachermayr, G. 2004. QTL analysis of resistance to fusarium head blight in Swiss winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **109**: 323-332.
- Parisi, L., and Lespinasse, Y. 1996. Pathogenicity of *Venturia inaequalis* strains of race 6 on apple clones (*Malus sp.*). *Plant Disease*, **80**(10): 1179-1183.
- Parisi, L., Lespinasse, Y., Guillaumes, J., and Kruger, J. 1993. A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the *Vf* gene. *Phytopathology*, **83**(5): 533-537.
- Parisi, L., Fouillet, V., Schouten, H.J., Groenwold, R., Laurens, F., Didelot, F., Evans, K., Fischer, C., Gennari, F., Kemp, H., Lateur, M., Patocchi, A., Thissen, J., and Tsipouridis, C. 2004. Variability of the pathogenicity of *Venturia inaequalis* in Europe. *Acta Horticulturae*, **663**(1): 107-113.
- Parlevliet, J.E. 1993. What is durable resistance, a general outline. *In* Durability of disease resistance. Edited by T. Jacobs and J.E. Parlevliet. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. pp. 23-39.
- Parlevliet, J.E. 2002. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica*, **124**(2): 147-156.
- Patocchi, A., Bigler, B., Koller, B., Kellerhals, M., and Gessler, C. 2004. *Vr2*: a new apple scab resistance gene. *Theoretical and Applied Genetics*, **109**(5): 1087-1092.
- Pilet, M.L., Delourme, R., Foisset, N., and Renard, M. 1998. Identification of loci contributing to quantitative field resistance to blackleg disease, causal agent *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. Et de Not., in winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **96**: 23-30.
- Qi, X., Niks, R.E., Stam, P., and Lindhout, P. 1998. Identification of QTLs for partial resistance to leaf rust (*Puccinia hordei*) in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, **96**: 1205-1215.
- Robertson, D. 1985. A possible technique for isolating genic DNA for quantitative traits in plants. *Journal of Theoretical Biology*, **117**: 1-10.
- SAS, I.I. 2000. SAS user's guide: statistics. SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- Sax, K. 1933. The origin of the *Pomoideae*. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science*, **30**: 147-150.
- Schafer, J.L. 1999. NORM: Multiple imputation of incomplete multivariate data under a normal model, version 2. Software for Windows 95/98/NT.
- Scherrer, B. 1984. Corrélations et régressions multiples. *In* Biostatistique. Gaëtan Morin, Chicoutimi, Québec, Canada. pp. 690-700.
- Schön, C.C., Lee, M., Melchinger, A.M., Guthrie, W.D., and Woodman, W.L. 1993. Mapping and characterization of quantitative trait loci affecting resistance against second-generation European corn borer in maize with the aid of RFLPs. *Heredity*, **70**: 648-659.
- Silfverberg-Dilworth, E., Matasci, C.L., Weg, W.E.v.d., Kaauwen, M.P.W.v., Walser, M., Kodde, L.P., Soglio, V., Gianfranceschi, L., Durel, C.E., Costa, F., Yamamoto, T., Koller, B., Gessler, C., and Patocchi, A. 2006. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Tree Genetics and Genomes*, **2**(4): 202-224.
- Tartarini, S., Gennari, F., Pratesi, D., Palazzetti, C., Sansavini, S., Parisi, L., Fouillet, A., Fouillet, V., and Durel, C.E. 2004. Characterisation and genetic mapping of a major scab resistance gene from the old Italian apple cultivar 'Durello Di Forlì'. *Acta Horticulturae*, **663**: 129-133.
- Van Ooijen, J.W. 1992. Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *Theoretical and Applied Genetics*, **84**(7-8): 803-811.

- Van Ooijen, J.W., and Voorrips, R.E. 2001. JoinMap 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.
- Van Ooijen, J.W., Boer, M.P., Jansen, R.C., and Maliapaard, C. 2002. MapQTL 4.0, Software for the calculation of QTL positions on genetic maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.
- Vinutzer, B.A., Patocchi, A., Tartarini, S., Gianfranceschi, L., Sansavini, S., and Gessler, C. 2004. Isolation of two microsatellite markers from BAC clones of the *Vf* scab resistance region and molecular characterization of scab-resistant accessions in *Malus* germplasm. *Plant Breeding*, **123**(4): 321-326.
- Vinutzer, B.A., Patocchi, A., Gianfranceschi, L., Tartarini, S., Zhang, H., Gessler, C., and Sansavini, S. 2001. Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with *Vf* apple scab resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **14**(4): 508-515.
- Wang, Z.L., Li, L.H., He, Z.H., Duan, X.Y., Zhou, Y.L., Chen, X.M., Lillemo, M., Singh, R.P., Wang, H., and Xia, X.C. 2005. Seedling and adult plant resistance to powdery mildew in Chinese bread wheat cultivars and lines. *Plant Disease*, **89**: 457-463.
- Williams, E.B., and Kuc, J. 1969. Resistance in *Malus* to *Venturia Inaequalis*. *Annual Review of Phytopathology*, **7**(1): 223-246.
- Xu, M., and Korban, S.S. 2002. A cluster of four receptor-like genes resides in the *Vf* locus that confers resistance to apple scab disease. *Genetics*, **162**(4): 1995-2006.
- Xu, S., and Vogl, C. 2000. Maximum likelihood analysis of quantitative trait loci under selective genotyping. *Heredity*, **84**: 525-537.
- Zhang, H., and Knott, D.R. 1993. Inheritance of adult plant resistance to leaf rust in six durum wheat cultivars. *Crop Science*, **33**: 694-697.

II-2- Discussion supplémentaire

II-2-1- Caractérisation des souches avirulentes-*Rvi14*

En toute rigueur, un gène majeur de résistance confère une résistance du type "tout ou rien", autrement dit il confère une résistance totale vis-à-vis de certaines souches du champignon mais peut être contourné par d'autres souches qui correspondent à une ou plusieurs races différentes. Nos résultats ont montré que, parmi les six souches inoculées séparément (technique d'inoculation par "gouttes"), quatre étaient virulentes vis-à-vis du gène *Rvi14* et deux avirulentes. Nous avons basé ce classement avirulent/virulent sur la présence/absence du symptôme de type chlorotique ayant permis l'étude de ségrégation et de cartographie de *Rvi14*. Néanmoins, ces dernières souches sporulaient sur certains descendants GaxDR portant l'allèle favorable au gène *Rvi14*. Un autre gène de résistance à la tavelure, le gène majeur *Vf*, montre ce même type de réponse : en conditions contrôlées, des génotypes porteurs du gène *Vf* présentent une certaine sporulation suite à une inoculation avec des souches pourtant clairement avirulentes sur la base des symptômes de type chlorotique élicités (Gardiner et al. 1996). En outre, comme indiqué précédemment, plusieurs similitudes existent entre les deux gènes *Rvi14* et *Vf*: symptômes de type chlorotique, éventuelle homéologie entre les régions génomiques portant ces deux gènes. On peut alors supposer un même déterminisme fonctionnel des gènes *Rvi14* et *Vf*. Afin de quantifier la sporulation apparue sur les génotypes portant l'allèle favorable au gène *Rvi14*, il serait souhaitable d'inoculer de nouveau les souches avirulentes-*Rvi14* (souches EU-NL19 et EU-NL24) mais avec la technique traditionnelle d'inoculation, c'est-à-dire par pulvérisation, et sur un plus grand nombre de descendants GaxDR. En effet, la technique d'inoculation par "gouttes" conduit à des concentrations en spores extrêmement élevées sur une très faible surface, ce qui a pu exacerber le phénomène de sporulation en présence du gène *Rvi14* pour les deux souches pourtant identifiées comme avirulentes sur la base de l'élicitation du symptôme de type chlorotique. Une inoculation traditionnelle par pulvérisation permettra de comparer l'intensité de l'éventuelle sporulation observée avec celle observée dans le cas d'inoculations de génotypes porteurs de *Vf* avec des souches avirulentes-*Vf*.

II-2-2- Marqueurs flanquant le gène majeur *Rvi14*

Le gène majeur *Rvi14*, identifié chez 'Dülmener Rosenapfel' a été cartographié en haut du groupe de liaison 6, à 4 cM au-dessus du marqueur HB09-SSR. Actuellement, aucun SSR ne permet d'encadrer cette région génomique portant *Rvi14*. Pourtant, disposer de

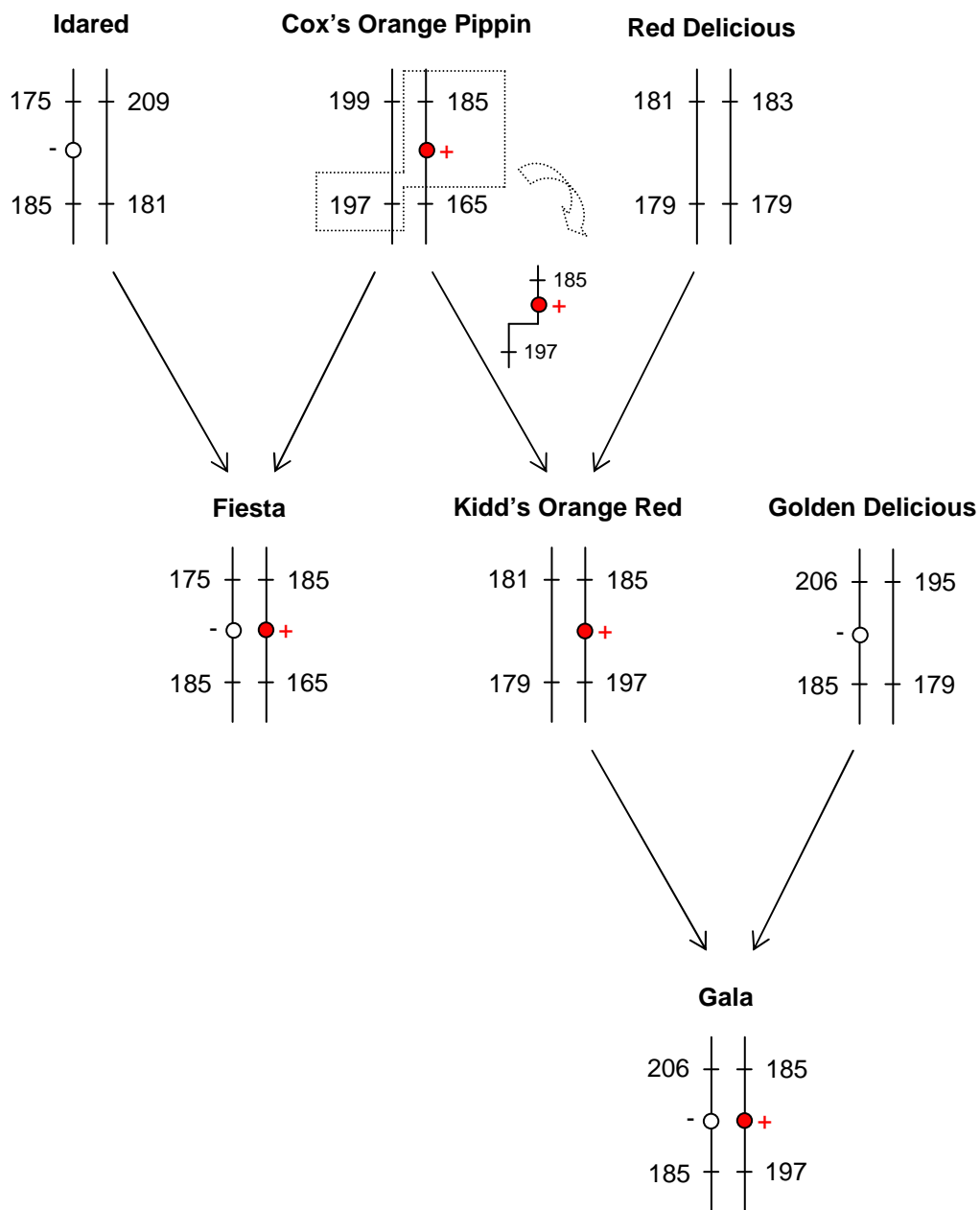


Figure 4. Transmission des allèles des deux marqueurs encadrant le QTL de résistance à la tavelure sur le GL11, CH04h02 et CH04a12, le long des pedigrees de 'Gala' et 'Fiesta'. Les barres verticales représentent une portion des chromosomes homologues portant CH04h02 en position haute et CH04a12 en position basse. L'allèle favorable au QTL est représenté par un cercle rouge accompagné d'un symbole "+", et l'allèle défavorable par un cercle blanc et un symbole "-". L'encadré en pointillés indique le crossing-over qui s'est produit entre le QTL et le marqueur CH04a12 lors de la formation des gamètes chez 'Cox's Orange Pippin'.

marqueurs SSR flanquant le gène d'intérêt est préférable pour une mise en œuvre plus efficace de la sélection assistée par marqueurs. Des marqueurs AFLP ('amplification fragment length polymorphism') ont été identifiés dans cette région dans d'autres descendance (par exemple, la descendance 'Fiesta' x 'Discovery' ; Silfverberg-Dilworth et al. 2006). L'un de ces marqueurs AFLP pourrait être cloné en vue de développer un marqueur SSR, par exemple en criblant une banque BAC par hybridation avec la sonde AFLP, puis en séquençant les extrémités des clones BAC positifs afin d'y rechercher des séquences SSR.

II-2-3- Architecture génétique de la résistance de 'Dülmener Rosenapfel'

Comparativement à 'Discovery', une autre variété considérée comme porteuse d'une résistance durable à la tavelure, peu de facteurs de résistance ont été identifiés chez 'Dülmener Rosenapfel'. Nous ne détaillerons pas ici les raisons pouvant expliquer cette différence étant donné qu'elles ont été présentées dans la discussion de l'article. Il serait intéressant de poursuivre l'analyse de l'architecture génétique de la résistance de 'Dülmener Rosenapfel', en testant différentes souches de *V. inaequalis* représentant une plus large diversité de l'agent pathogène. Il serait préférable d'inoculer les souches indépendamment les unes des autres, afin de détecter un maximum de loci de résistance, notamment les loci spécifiques rendus potentiellement inefficaces face à un mélange multi-souches. Ces expérimentations peuvent être réalisées sur la descendance 'Gala' x 'Dülmener Rosenapfel'. Certains loci de résistance peuvent ne pas être détectés en descendance (loci homozygotes). Pour révéler ces éventuels loci, il faudrait étudier une descendance F2 issue de 'Dülmener Rosenapfel' ; il ne serait en effet pas possible de rechercher ces loci en refaisant le croisement ayant donné naissance à 'Dülmener Rosenapfel' car seul son parent femelle est supposé connu et nos premiers résultats de marquage n'ont pas permis de confirmer cette filiation. La comparaison de l'architecture génétique de la résistance de 'Discovery' et de 'Dülmener Rosenapfel' pourrait ainsi apporter des informations pour tenter de définir des "règles de construction" de génotypes à résistance potentiellement durable.

II-2-4- Origine et déterminisme génétiques des QTL détectés sur les GL11 et GL17

- Origine génétique des allèles favorables aux QTL

Dans notre étude de la descendance 'Gala' x 'Dülmener Rosenapfel' (GaxDR), seule la variété sensible 'Gala' a révélé un QTL de résistance sur le GL11. Des études antérieures ont révélé la présence d'un QTL dans cette même région génomique chez les variétés 'Prima',

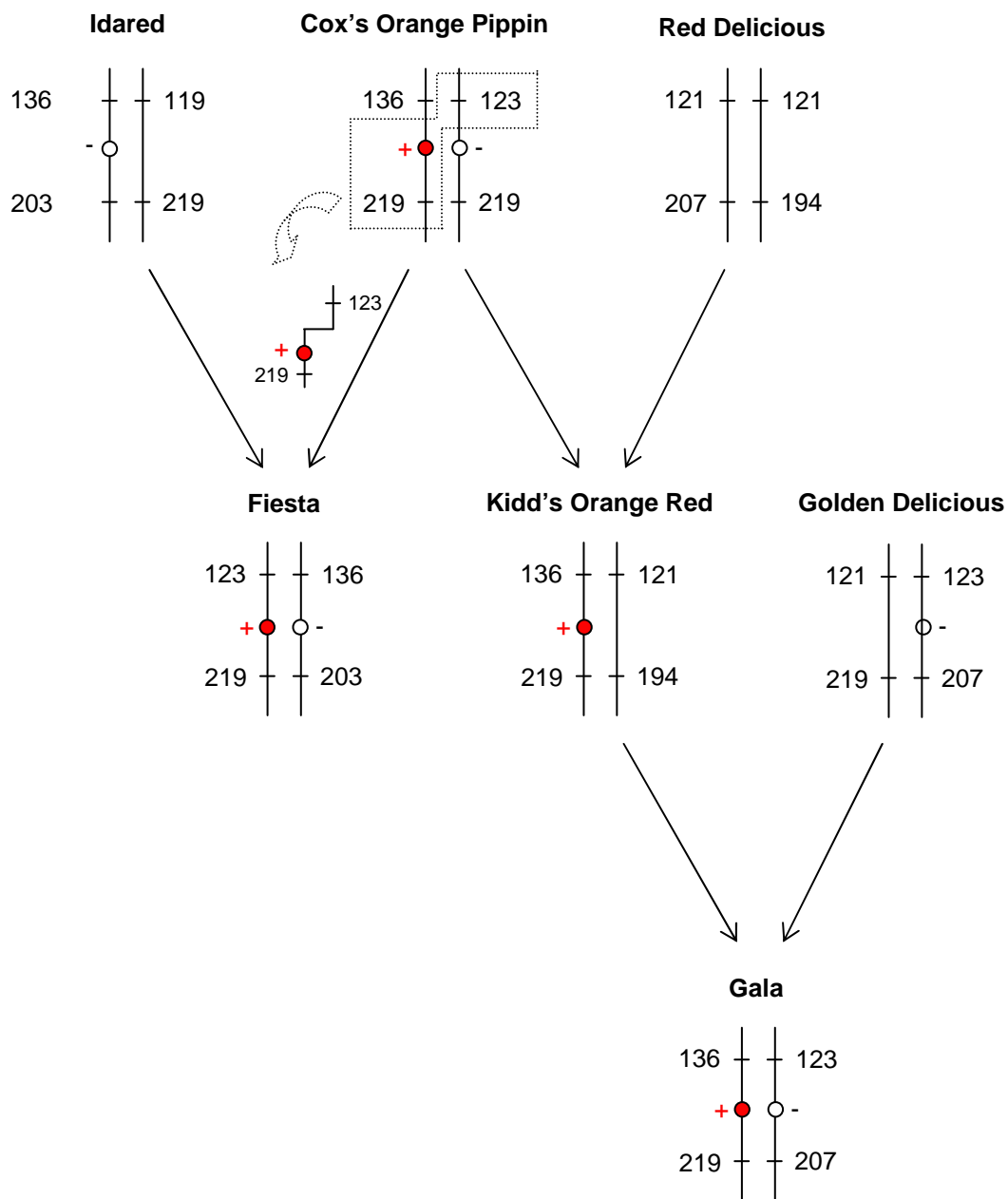


Figure 5. Transmission des allèles des deux marqueurs encadrant le QTL de résistance à la tavelure sur le GL17, CH01h01 et Hi03c05, le long des pedigrees de 'Gala' et 'Fiesta'. Les barres verticales représentent une portion des chromosomes homologues portant CH01h01 en position haute et Hi03c05 en position basse. L'allèle favorable au QTL est représenté par un cercle rouge accompagné d'un symbole "+", et l'allèle défavorable par un cercle blanc et un symbole "-". L'encadré en pointillés indique le crossing-over qui s'est produit entre le QTL et le marqueur CH01h01 lors de la formation des gamètes chez 'Cox's Orange Pippin'.

'Fiesta' (Durel et al. 2003), et 'Discovery' (Liebhard et al. 2003b). Ce QTL de résistance aurait-il une origine commune entre 'Gala' et ces variétés ? Mais avant tout, ces quatre variétés possèdent-elles un ancêtre commun ? La généalogie des variétés 'Gala' et 'Fiesta' nous indique que la variété anglaise 'Cox's Orange Pippin' (alias 'Cox') est la mère de 'Fiesta' et la grand-mère maternelle de 'Gala'. Nous avons alors suivi la transmission des allèles de deux marqueurs flanquant le QTL du GL11, CH04h02 et CH04a12, le long de leur pedigree (données de génotypage disponibles sur la population en pedigree via le projet européen HiDRAS, Figure 4) afin de déterminer si la résistance apportée par le QTL détecté chez ces deux variétés provenait de 'Cox'. Dans la descendance GaxDR, les allèles favorables (c'est-à-dire en phase avec l'allèle favorable au QTL) des marqueurs CH04h02 et CH04a12 chez 'Gala' étaient respectivement les allèles à 185pb et à 197pb. Quant à 'Fiesta', elle portait les allèles favorables de 185pb et 165pb pour CH04h02 et CH04a12, respectivement (résultats de l'équipe préalables à mon travail). 'Fiesta' a bien hérité ces deux allèles de 'Cox' (Figure 4). En revanche, il faut faire intervenir un crossing-over entre le QTL (situé au-dessous de CH04h02) et le marqueur CH04a12 lors de la formation des gamètes chez 'Cox', préalablement au croisement ayant donné naissance à 'Kidd's Orange Red', pour expliquer la transmission des allèles de 185pb et 197pb pour CH04h02 et CH04a12 (respectivement) conjointement à celle de l'allèle favorable au QTL. 'Kidd's Orange Red' a ensuite transmis ces allèles à 'Gala' (Figure 4).

Le QTL de résistance détecté sur le GL11 chez 'Gala' et 'Fiesta' s'avèrerait provenir de leur (grand-)parent commun 'Cox'. Qu'en est-il de l'origine du QTL identifié sur le GL17 chez ces deux mêmes cultivars ? De la même manière que pour le QTL du GL11, nous avons suivi la transmission des allèles de deux marqueurs flanquant le QTL du GL17, CH01h01 et Hi03c05, le long du pedigree (données de génotypage disponibles sur la population en pedigree via le projet européen HiDRAS, Figure 5). Dans notre étude de la descendance GaxDR, les allèles favorables (en phase avec l'allèle favorable au QTL) des marqueurs CH01h01 et Hi03c05 chez 'Gala' étaient respectivement les allèles à 136pb et à 219pb. 'Fiesta' portait l'allèle favorable de 123pb pour CH01h01 (résultats de l'équipe préalables à mon travail), allèle en phase avec l'allèle de 219pb de Hi03c05 (Stefano Tartarini, DCA-Bologne, Italie, communication personnelle). Les allèles favorables au QTL proviennent de 'Cox', hétérozygote 123pb-136pb pour CH01h01 et homozygote 219pb pour Hi03c05, que ce soit pour 'Gala' ou pour 'Fiesta' (Figure 5). 'Cox' posséderait-il deux allèles favorables à ce locus ? Il semblerait que la réponse soit négative, en effet cette variété serait hétérozygote pour le QTL de résistance détecté dans cette région génomique du GL17 (données apportées par l'analyse de la population en pedigree ; voir ce chapitre, section III). L'hypothèse serait alors qu'un crossing-over se serait produit entre le QTL (situé au-dessus de Hi03c05) et le

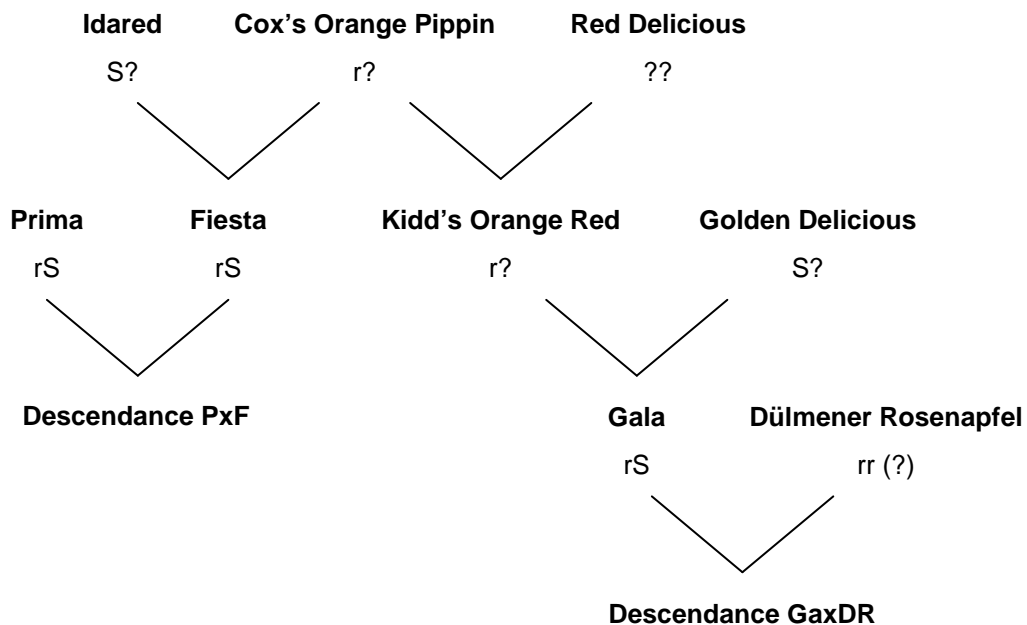


Figure 6. Statut des allèles au QTL de résistance à la tavelure du GL11, sous l'hypothèse d'une résistance récessive, chez différents cultivars de pommier. L'allèle favorable au QTL est dénommé par la lettre "r" (allèle récessif), et l'allèle défavorable par la lettre "S" (allèle dominant).

Tableau 4. AUDPC moyennes des quatre classes génotypiques au pic du QTL de résistance à la tavelure sur le GL17, détecté dans la descendance 'Gala' x 'Dülmener Rosenapfel'. Les valeurs ont été estimées avec la fonction 'restricted Multiple QTL Mapping' du logiciel MapQTL®. Le symbole "+" représente les allèles parentaux favorables au QTL, et réciproquement, le symbole "-" les allèles défavorables au QTL. Les lettres entre parenthèses traduisent le résultat d'un test de comparaison de moyennes (test de Student Newman-Keuls) : les classes génotypiques portant la même lettre ne sont pas significativement différentes à un seuil de 5%, et inversement.

| | | 'Gala' | |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------|
| | | a ⁻ | b ⁺ |
| 'Dülmener Rosenapfel' | c ⁺ | 65,29 (B) | 39,80 (C) |
| | d ⁻ | 75,38 (A) | 59,17 (B) |

marqueur CH01h01 lors de la formation des gamètes chez 'Cox', préalablement au croisement ayant donné naissance à 'Fiesta' (Figure 5).

Quant à 'Dülmener Rosenapfel', seul son parent femelle est connu : d'après la littérature, il s'agirait de la variété 'Gravenstein' (Smith 1971). Nous avons ainsi cherché à déterminer si l'origine de la résistance apportée par le QTL détecté sur le GL17 provenait de ce parent. Or il s'est avéré que les allèles des marqueurs de 'Gravenstein' ne correspondaient pas aux allèles de 'Dülmener Rosenapfel'. Cette incohérence s'est vérifiée pour des marqueurs situés dans d'autres régions du génome. Deux hypothèses peuvent alors être formulées : (i) l'individu que nous avons génotypé n'était en réalité pas 'Gravenstein' (erreur lors de l'introduction de l'arbre, lors du greffage, ou lors du prélèvement) ; (ii) 'Gravenstein' n'est pas le parent de 'Dülmener Rosenapfel'. Par conséquent, l'origine de la résistance de 'Dülmener Rosenapfel' reste indéterminée.

- Déterminisme génétique des QTL

Durel et al. (2003) avaient montré un effet récessif significatif du QTL détecté sur le GL11 dans la descendance 'Prima' x 'Fiesta', effet traduisant une interaction entre les allèles parentaux : sur les quatre classes génotypiques possibles issues du croisement de type <abxcd>, trois classes (ac, ad et bc) montraient une forte sensibilité, et une seule classe (bd) montrait une plus forte résistance. Les QTL identifiés chez 'Gala' et 'Fiesta' sur le GL11 ayant vraisemblablement la même origine génétique, leur fonctionnement est certainement le même, autrement dit la résistance apportée par le QTL de 'Gala' serait de type récessive (Figure 6). Or, la ségrégation de la résistance au niveau du QTL dans la descendance GaxDR était de type 1 (résistants) : 1 (sensibles), les individus plus résistants portant l'allèle favorable de 'Gala' et les plus sensibles l'allèle défavorable. Pour accorder cette information avec l'hypothèse d'un QTL récessif, il faut considérer que 'Dülmener Rosenapfel' serait homozygote récessif à ce locus (Figure 6), ce qui expliquerait qu'aucun QTL n'ait été détecté chez cette variété. Afin de vérifier cette hypothèse, un rétrocroisement entre un descendant GaxDR hétérozygote à ce locus et le parent 'Gala' pourrait être réalisé ; le fonctionnement récessif de ce QTL devrait alors se traduire par une ségrégation 3 (sensibles) : 1 (résistants) dans cette nouvelle descendance.

Dans notre descendance GaxDR, l'effet du QTL détecté sur le GL17 avait un effet additif (Tableau 4). Des études précédentes avaient déjà montré un effet additif d'un QTL identifié dans cette même région génomique du GL17 chez les variétés 'Fiesta' (Durel et al. 2003) et 'Discovery' (Calenge et al. 2004).

Tableau 5. Plan de croisements diallèle incomplet des 13 descendance de la population en pedigree. Les chiffres correspondent aux effectifs par descendance (chiffres centraux) ou par parent (dernière ligne et dernière colonne).

| | Parents mâles | | | | | | | | | | | |
|------------------|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|-----|
| | X3259 | X3263 | X3305 | X4982 | X6417 | X6564 | X6681 | X6683 | X6690 | X6808 | | |
| Parents femelles | X3263 | 51 | | | | | | | | | | 51 |
| | X3274 | | | | 48 | | | | | | | 48 |
| | X3305 | 48 | | | | | | | | | | 48 |
| | X3318 | | 51 | | 27 | | 51 | | | | | 129 |
| | X4930 | | | 51 | | | | | | | | 51 |
| | X6398 | | | | | | | 49 | | | | 49 |
| | X6417 | | | | | | 51 | | | | | 51 |
| | X6679 | | | | | 26 | | | | 50 | 50 | 126 |
| | X6683 | | | | | | | 51 | | | | 51 |
| | | 99 | 51 | 51 | 75 | 26 | 102 | 51 | 49 | 50 | 50 | 604 |

III- RECHERCHE DE QTL DE RESISTANCE A LA TAVELURE PAR UNE APPROCHE DE CARTOGRAPHIE EN PEDIGREE

III-1- Introduction

Face aux nouvelles races de *V. inaequalis* capables de contourner le gène majeur *Vf* (race 6, Parisi et al. 1993 ; race 7, Roberts and Crute 1994), les cultivars portant ce gène *Vf* ne montrent cependant pas le même niveau de résistance/sensibilité. Ce phénomène a notamment été observé dans un verger expérimental non traité dans le Nord de la France (Villeneuve d'Ascq), où les souches virulentes-*Vf* étaient bien installées. Quelle est l'origine de ces différences ? On peut supposer que les cultivars-*Vf* plus résistants portent des loci de résistance (majeure et/ou mineure) supplémentaires.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons recherché des facteurs de résistance dans une population en pedigree, autrement dit dans plusieurs descendances apparentées entre elles, lesquelles avaient par ailleurs été présélectionnées pour porter le gène majeur *Vf*.

III-2- Matériels et méthodes

III-2-1- Matériels végétal et fongique

Treize descendances F1 implantées à Angers et étudiées dans le cadre du projet européen HiDRAS ont été analysées lors de ma thèse afin d'identifier des sources de résistance à la tavelure à large spectre d'action.

Ces 13 descendances pouvaient être positionnées dans un plan de croisements diallèle très incomplet (Tableau 5). Chacune de ces descendances comprenait environ 50 individus (excepté deux descendances qui n'en comptaient que 25), soit un total d'environ 600 génotypes (Tableau 5). Comme déjà indiqué, ces 600 génotypes font partie du programme d'amélioration du pommier mené à l'INRA d'Angers. La première étape du cycle de sélection consiste à inoculer, en serre, les semis issus de croisements contrôlés à un stade 2-3 feuilles avec une suspension de spores du champignon *V. inaequalis* récoltées sur des variétés sensibles dans les vergers de l'INRA. Cet inoculum est donc constitué des races communes du champignon présentes à Angers au moment du prélèvement : principalement la race 1, et plus rarement les races 2, 3 et 5, toutes avirulentes vis-à-vis du gène *Vf*. Les 600 génotypes ont ainsi été présélectionnés pour la présence du gène majeur *Vf*, avant le début du projet HiDRAS. Comme indiqué précédemment, ces 13 descendances F1 présentent l'intérêt d'être apparentées entre elles : on parle de population en pedigree (Figure 7).

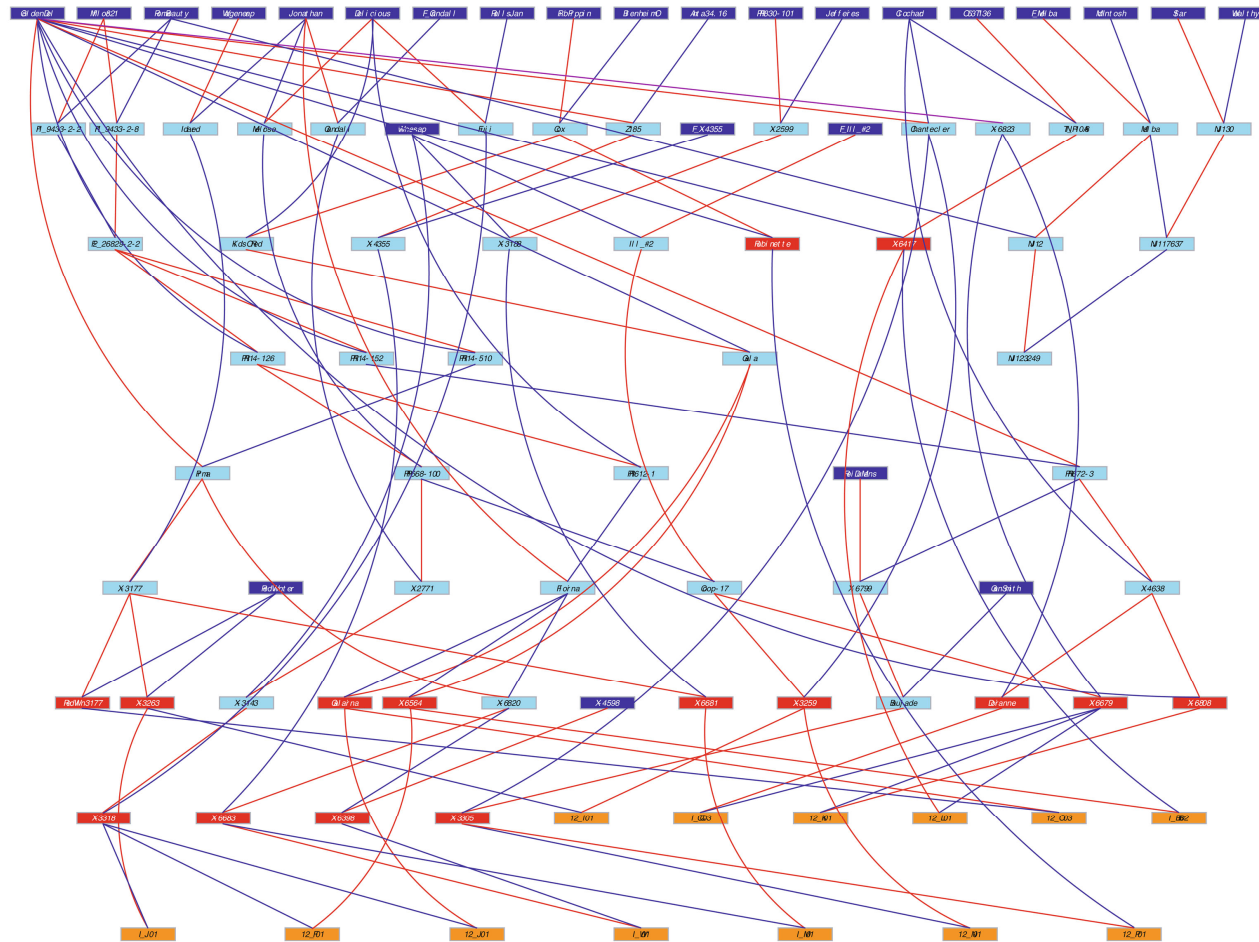


Figure 7. Structure de la population en pedigree. Les 13 descendance (orange) constituent la dernière génération du pedigree ; leurs 15 parents (rouge) sont reliés aux fondateurs (bleu foncé) par des générations intermédiaires (bleu clair). Chaque individu (hormis les fondateurs) est issu du croisement entre sa mère, reliée par un trait rouge, et son père, relié par un trait bleu. Le logiciel Pedimap (Voorrips 2007) a été utilisé pour construire cette figure.

Apportons quelques précisions sur les termes relatifs aux différentes générations composant le pedigree : la dernière et l'avant-dernière générations correspondent respectivement aux descendants et aux parents (au nombre de 15), la première génération comprend les fondateurs (au nombre de 26), et les générations supérieures aux parents jusqu'aux fondateurs inclus constituent l'ensemble des ancêtres. Dans ce pedigree, le nombre de générations varie de deux à six. A tout niveau du pedigree, chaque génotype a deux parents connus et présents dans le pedigree, excepté les génotypes dits "fondateurs" pour lesquels les parents sont inconnus et de ce fait constituent les générations originelles du pedigree. Dans certains cas, un génotype n'a que son parent femelle connu (génotype issu de pollinisation ouverte). Un même génotype peut intervenir plusieurs fois et à des niveaux différents dans le pedigree, tel est l'exemple de 'Golden Delicious'.

Quatorze parents sur 15 (un n'était plus disponible en verger) et une forte proportion d'ancêtres (dont 'Gala' et 'Golden Delicious' considérés par ailleurs comme témoins sensibles) de ces 13 descendance ont également été intégrés à l'essai.

Un mélange de quatre souches monoconidiales de *V. inaequalis* a été inoculé sur cette population. La souche monoconidiale EU-B04 (race 1) est avirulente-*Vf* contrairement aux souches monoconidiales EU-D42 (race 6), 1066 (race 7), et EU-NL24 (virulences combinées des races 6 et 7) qui sont virulentes-*Vf*. Leurs principales caractéristiques sont indiquées dans l'article présenté précédemment. Nous avons fait le choix de surreprésenter les souches virulentes-*Vf* du fait de la présence du gène *Vf* chez tous les descendants. Par contre, le gène *Vf* n'étant pas porté par tous les parents et ancêtres, la présence d'une souche de race 1 dans l'inoculum global est utile pour se rapprocher d'un inoculum naturel tel que rencontré dans une région où des souches avirulentes-*Vf* et virulentes-*Vf* se côtoient, comme dans le Nord-Ouest de la France par exemple.

III-2-2- Tests pathologiques

III-2-2-1- Elevage des plants

L'ensemble des génotypes constituant le matériel d'étude est présent en verger à Angers. Début 2005, des greffons ont été prélevés pour l'ensemble de ces individus puis greffés sur le porte-greffe 'MM106'. Ces plants greffés ont ensuite été élevés en serre jusqu'à ce que les pousses aient atteint le stade 8-10 feuilles (soit environ dix semaines après le greffage). Une partie des plants a alors été inoculée au printemps (voir ci-dessous). Inoculés ou non, les plants ont continué leur croissance pendant deux mois avant d'être rabattus. Ils

Tableau 6. Concentration et taux de germination des souches monoconidiales de *Venturia inaequalis* inoculées sur la population en pedigree, aux deux saisons.

| | PRINTEMPS | | AUTOMNE | |
|---------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Souche | Concentration (en spores/ml) | Taux de germination (en %) | Concentration (en spores/ml) | Taux de germination (en %) |
| EU-B04 | 380000 | 89 | 386000 | 75 |
| EU-D42 | 404000 | 64 | 392000 | 66 |
| 1066 | 422000 | 77 | 406000 | 81 |
| EU-NL24 | 396000 | 62 | 390000 | 75 |

Note : La concentration correspond à la concentration initiale de chacune des souches monoconidiales avant mélange.

ont alors été placés en chambre froide (1°C) pendant deux mois et demi afin de mimer la vernalisation (été 2005). A l'automne, une seconde partie des plants a été repotée puis disposée de nouveau en serre pour une seconde inoculation avec le même mélange des quatre souches monoconidiales que celui utilisé au printemps.

III-2-2-2- Dispositif expérimental

Pour des raisons stratégiques et de disponibilité en surface de serre, la moitié de chacune des 13 descendances F1 a été inoculée au printemps 2005 puis la partie complémentaire l'a été à l'automne de la même année. Seuls deux génotypes par descendance ainsi que les parents et les témoins sensibles ont été testés à la fois au printemps et à l'automne. Les ancêtres ont, quant à eux, été inoculés uniquement au printemps. A chaque saison, les différentes descendances, les parents et les ancêtres étaient représentés par trois copies par génotype ; les témoins sensibles étaient représentés, quant à eux, par cinq copies. A chaque saison, le dispositif expérimental était organisé en trois blocs complets randomisés (correspondant aux tablettes) : une copie de chaque génotype (voire deux pour les témoins sensibles) par bloc et répartition aléatoire des génotypes au sein d'un bloc.

III-2-2-3- Inoculations

Pour chaque test pathologique, les inocula ont été préparés à partir de feuilles de pommier tavelées congelées selon la méthode développée par Parisi and Lespinasse (1996). Les quatre suspensions monoconidiales ont d'abord été préparées séparément puis mélangées en proportions égales. La concentration finale de chacune des souches était d'environ 1.10^5 spores/ml. Le taux de germination des conidies était similaire d'une saison à l'autre pour chacune des souches, et variait de 62 à 89% (après 24 heures sur milieu gélosé à température ambiante) (Tableau 6).

Les inocula ont été pulvérisés sur les plants de façon à former de fines gouttelettes à la surface des feuilles en évitant le ruissellement (Chevalier et al. 1991). Les plants ont ensuite été recouverts de bâches plastiques transparentes afin de maintenir une hygrométrie maximale pendant 48 heures. La température a été maintenue à 17°C durant cette période. Ces conditions d'hygrométrie et de température favorisent la germination des conidies. Au-delà de ces 48 heures, les bâches ont été retirées, l'hygrométrie réduite à 70% et la température maintenue à 17°C. Ces conditions environnementales favorisent le développement du champignon.

Tableau 7. Echelle de notation de la sévérité de sporulation causée par *Venturia inaequalis* sur pommier (d'après Croxall 1952).

| Surface foliaire sporulante (%) | Sévérité de sporulation |
|--|--------------------------------|
| Pas de sporulation | 0 |
| 1 | 1 |
| 2 à 5 | 2 |
| 6 à 10 | 3 |
| 11 à 25 | 4 |
| 26 à 50 | 5 |
| 51 à 75 | 6 |
| 76 à 100 | 7 |

III-2-2-4- Lecture des symptômes

La sévérité de sporulation a été notée sur feuilles 14, 21 et 28 jours après inoculation. Elle a été évaluée selon une échelle correspondant au pourcentage de surface foliaire atteinte par la sporulation du champignon (Croxall et al. 1952) (Tableau 7). Pour chaque plant, seule la feuille la plus tavelée a été notée, évitant ainsi de prendre en compte la résistance ontogénique manifestée au cours du vieillissement des feuilles. La feuille la plus tavelée était très généralement la plus jeune feuille déroulée au moment de l'inoculation ou la feuille immédiatement plus âgée.

L'AUDPC ('area under disease progress curve') a été calculée à partir des sévérités de sporulation évaluées aux trois dates, et a été utilisée pour mesurer la sensibilité des génotypes à la tavelure.

III-2-3- Analyses statistiques des données phénotypiques

III-2-3-1- Ajustement des données phénotypiques

III-2-3-1-1- Ajustement sur l'effet "Bloc"

Les données phénotypiques ont été analysées saison par saison, selon le modèle d'analyse de variance (logiciel SAS 2000) suivant :

$$Y_{ij} = \mu + G_i + B_j + \varepsilon_{ij} \quad [1]$$

avec Y_{ij} , le phénotype (AUDPC) de l'individu i dans le bloc j ; μ , la moyenne phénotypique générale des individus à l'une ou l'autre des saisons ; G_i , l'effet du génotype i ; B_j , l'effet du bloc (tablette) j ; et ε_{ij} , l'effet résiduel.

Les données phénotypiques ont été ajustées sur l'effet "Bloc" par la méthode des moindres carrés (fonction LSmeans du logiciel SAS) de manière à fournir directement une valeur phénotypique moyenne ajustée pour chaque génotype (moyenne génotypique).

III-2-3-1-2- Ajustement simultané sur les effets "Bloc" et "Saison"

Les populations étudiées au printemps et à l'automne étaient supposées génétiquement équivalentes étant donné que : (i) les parents avaient été testés aux deux

saisons, (ii) les 13 descendances étaient représentées à chaque saison, et (iii) pour chaque descendance, les descendants avaient été affectés à l'une ou l'autre des saisons de façon aléatoire. Le biais potentiel dû à la présence des ancêtres uniquement au printemps a été infirmé : pas de différence significative entre la moyenne des ancêtres et la moyenne des parents + descendants au printemps (résultat non détaillé). Une analyse conjointe des deux saisons a alors été entreprise, et pour cela, deux types d'ajustement sur l'effet de la saison ont été réalisés.

III-2-3-1-2-1- Ajustement sur les moyennes des saisons

Une analyse de variance a été réalisée sur l'ensemble des données collectées, à l'aide du logiciel SAS (SAS 2000), selon le modèle suivant :

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + S_j + B_{k(j)} + G_i * S_j + \varepsilon_{ijk} \quad [2]$$

avec Y_{ijk} , le phénotype (AUDPC) de l'individu i dans le bloc k hiérarchisé à la saison j ; μ , la moyenne phénotypique générale de l'ensemble des individus ; G_i , l'effet du génotype i ; S_j , l'effet de la saison j ; $B_{k(j)}$, l'effet du bloc k dans la saison j ; $G_i * S_j$, l'effet de l'interaction entre le génotype i et la saison j ; et ε_{ijk} , l'effet résiduel.

Les données phénotypiques individuelles ont été ajustées simultanément sur les effets "Bloc" et "Saison" détectés, selon la formule suivante :

$$Y_{ijk}^{aj} = \mu + Y_{ijk} - Y_{jk} \quad [3]$$

avec Y_{ijk}^{aj} , la valeur phénotypique ajustée de l'individu i dans le bloc k à la saison j ; et Y_{jk} , la moyenne phénotypique des individus appartenant au bloc k à la saison j .

Après ajustement des données phénotypiques individuelles sur les effets "Bloc" et "Saison", nous avons calculé la moyenne phénotypique de chaque génotype (moyenne génotypique).

III-2-3-1-2-2- Ajustement par régression d'une saison sur l'autre

Pour évaluer l'intérêt d'un autre mode d'ajustement sur l'effet "Saison", nous avons effectué une régression des moyennes génotypiques ajustées sur l'effet "Bloc" (voir section II-2-3-1-1) de l'automne sur celles du printemps. Nous avons choisi ce sens de régression

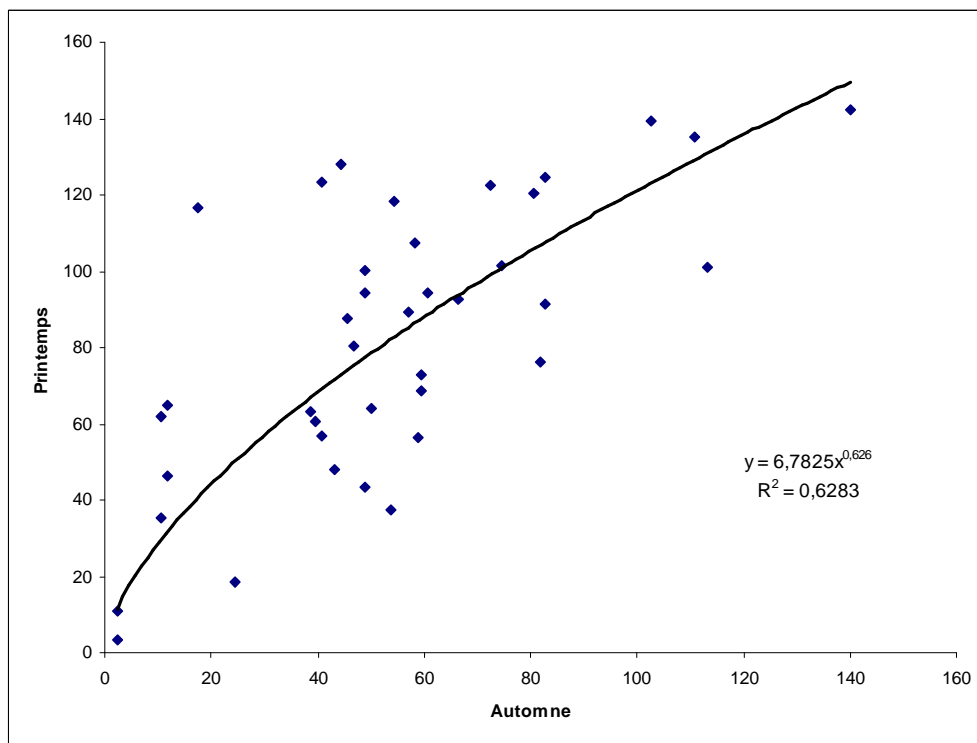


Figure 8. Régression curvilinéaire des moyennes génotypiques du printemps sur celles de l'automne pour 39 génotypes de la population en pedigree phénotypés (AUDPC) aux deux saisons.

(plutôt que printemps sur automne) car la dispersion des résidus était plus faible au printemps qu'à l'automne. Les coefficients de variation des résidus étaient respectivement de 29,2% et 56,0% (coefficients déterminés par les analyses de variance [1]). L'équation de régression a été déterminée à partir des moyennes génotypiques ajustées des génotypes testés à la fois au printemps et à l'automne (39 génotypes communs). Compte tenu de la distribution du nuage de points (Figure 8), nous avons opté pour une régression sous forme polynomiale du second degré passant par l'origine qui donnait un coefficient de détermination nettement plus élevé que celui obtenu avec une régression linéaire. Nous avons fixé une régression passant par l'origine étant donné que, d'un point de vue biologique, certains génotypes complètement résistants à l'automne devaient également l'être au printemps.

En nous basant sur l'équation de régression obtenue, nous avons ensuite attribué une "valeur phénotypique printemps" aux génotypes testés à l'automne selon la régression suivante : printemps = $6,78 \cdot \text{automne}^{0,63}$. En ce qui concerne les 39 génotypes communs printemps-automne, ceux-ci ayant été testés aux deux saisons, nous avons fait le choix de définir leurs valeurs phénotypiques comme la moyenne entre la valeur observée au printemps et la valeur prédite par régression. Le coefficient de détermination obtenu pour cette régression était estimé à 0,6, ce qui signifie que 60% de la variabilité observée à l'automne pouvait être expliquée par la variabilité observée au printemps, et réciproquement.

Cet ajustement par régression présente l'avantage de tenir compte de l'effet d'échelle potentiel entre les données du printemps et de l'automne. En effet, une nette différence de moyenne générale entre les deux saisons a été observée en faveur du printemps (AUDPC plus élevées) alors que les valeurs phénotypiques les plus faibles sont bornées à "0".

III-2-3-2- Répétabilité et héritabilité des caractères

Pour chaque descendance F1, deux héritabilités au sens large ont été estimées comme suit :

- héritabilité individuelle : $h^2_{\text{indiv}} = \sigma^2_g / (\sigma^2_g + \sigma^2_e)$

avec σ^2_g la variance génétique et σ^2_e la variance résiduelle estimées par analyse de variance ; cette héritabilité individuelle traduit en réalité le niveau de répétabilité des données individuelles intra-descendance.

- héritabilité de la moyenne génotypique : $h^2_{\text{moy genot}} = \sigma^2_g / (\sigma^2_g + \sigma^2_e/n_0)$

avec n_0 le nombre moyen de copies par génotype dans une descendance donnée, déterminé par analyse de variance (valeur proche de 3).

L'héritabilité au sens strict a , quant à elle, été déterminée à l'aide du logiciel FlexQTL™ (voir détail du logiciel dans la section II-2-4-3). Ce logiciel, via le modèle TIM ('the infinitesimal model'), permet d'évaluer la composante génétique d'un caractère quantitatif en prenant en compte les relations d'apparentement entre les individus et leurs données phénotypiques, tout en ignorant les données de marquage. L'héritabilité au sens strict mesure ainsi la part de variation génétique qui se transmet sur l'ensemble du pedigree selon un modèle additif. Elle est déterminée par le rapport entre la variance génétique additive et la variance totale (variance génétique additive + variance résiduelle).

III-2-4- Détection de QTL

III-2-4-1- Données phénotypiques

Des analyses comparées ont été réalisées à partir de différents jeux de données phénotypiques : valeurs des parents et descendants analysées en saisons séparées ; valeurs des parents et descendants \pm valeurs des ancêtres, analysées en saisons conjointes.

III-2-4-2- Données génotypiques

Le génotypage des 13 descendance F1 et de leur pedigree (parents et ancêtres) a été réalisé par différents partenaires du projet HiDRAS (Patocchi et al. 2008). Quarante-sept marqueurs microsatellites ou SSR ('single sequence repeat') ont ainsi été sélectionnés car hautement polymorphes et espacés régulièrement le long du génome. Ces SSR couvrent environ 75% du génome du pommier avec une distance moyenne entre marqueurs de 15 cM (Silfverberg-Dilworth et al. 2006).

La connaissance des liens d'apparenté a permis de vérifier la cohérence de la transmission des allèles le long du pedigree, et parfois d'affecter des allèles initialement manquants à certains génotypes parentaux ou ancêtres.

III-2-4-3- Identification de QTL par une approche en pedigree

La détection de QTL dans la population en pedigree a été réalisée à l'aide du logiciel FlexQTL™ (développé au Plant Research International de Wageningen par Bink et al. 2002 ; <http://www.biometris.wur.nl/UK/Software/FlexQTL/>) développé au cours du projet HiDRAS (Bink et al. 2008). Ce logiciel est basé sur une approche bayésienne, approche qui utilise des probabilités pour quantifier l'incertitude sur les conclusions tirées de l'analyse des

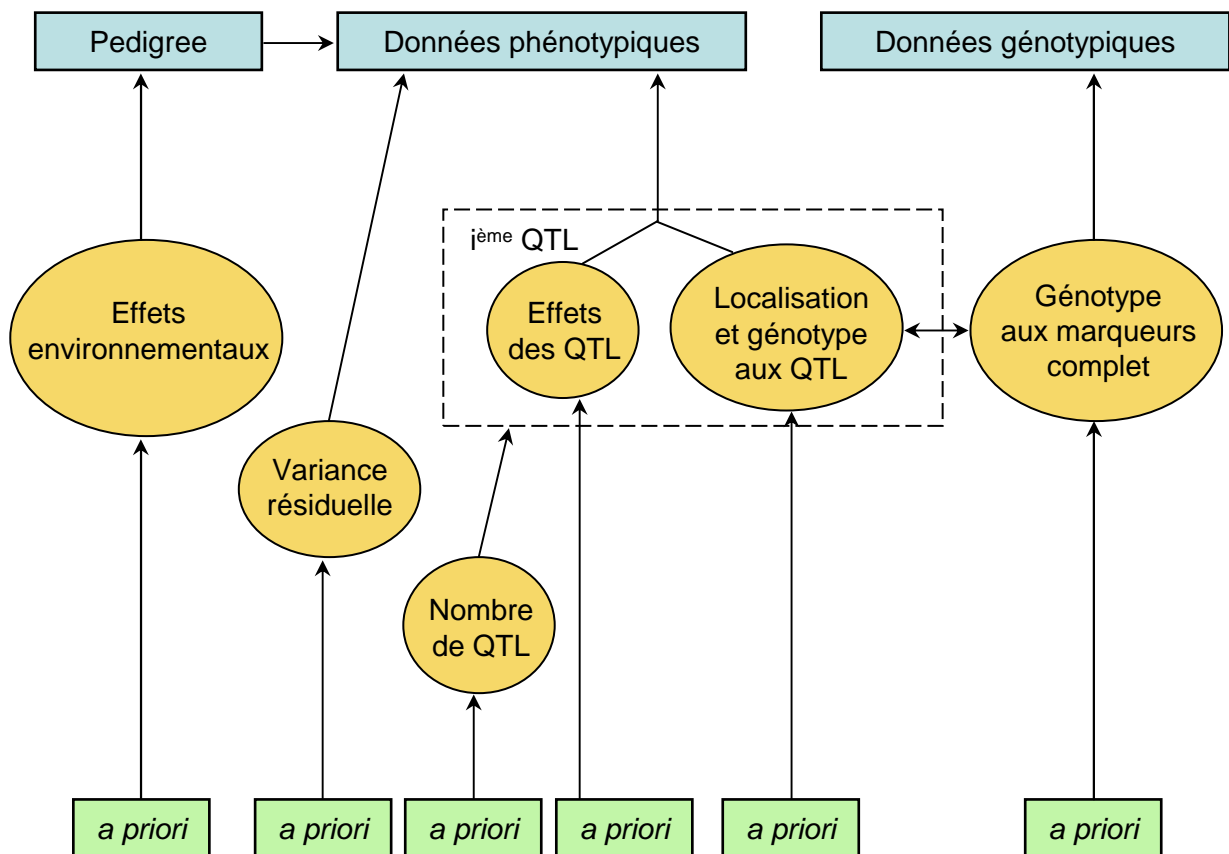


Figure 9. Modèle hiérarchique bayésien simplifié pour la détection de QTL (d'après Jannink et al. 2001). Le schéma bayésien distingue trois niveaux. Le niveau coloré en bleu représente les données observées. Le niveau coloré en orange contient les paramètres à estimer du modèle. Le niveau coloré en vert contient les *a priori* attribués aux paramètres du modèle. Les flèches reliant les *a priori* aux paramètres aux données observées illustrent les relations inhérentes au modèle.

données (Shoemaker et al. 1999). Le modèle simplifié (Bink et al. 2008) décrivant le niveau de la maladie (traduit ici par l'AUDPC) est le suivant :

$$y = H\theta + \varepsilon$$

avec y , le vecteur des phénotypes observés pour le caractère AUDPC ; H , la matrice d'incidence liant les paramètres du modèle (vecteur θ) aux phénotypes ; et ε , l'erreur résiduelle ($\varepsilon \sim N(0, \sigma_\varepsilon^2)$).

Les paramètres d'intérêt associés aux QTL sont leur nombre, leur position, leur effet... Ce sont ces paramètres auxquels sont attribuées des probabilités. Un modèle plus détaillé déclinant les différents paramètres et leur relation avec les données observées est décrit sur la figure 9. Comme son nom l'indique, l'approche bayésienne repose sur le théorème de Bayes qui indique que la distribution de probabilité *a posteriori* des paramètres est proportionnelle au produit de la densité *a priori* des paramètres du modèle par la vraisemblance des données selon le modèle établi : $p(\theta | y) \propto p(\theta) p(y | \theta)$.

Les données auxquelles nous faisons référence sont les données phénotypiques et génotypiques ainsi que les données de pedigree. Les valeurs des paramètres associés aux QTL sont simulées le long de processus itératifs via la méthode "Markov Chain Monte Carlo" (Bink et al. 2008).

Les QTL sont considérés comme étant bi-alléliques, donc trois classes génotypiques sont distinguables à chaque QTL détecté : un individu peut porter deux allèles favorables (état homozygote favorable) ou défavorables (état homozygote défavorable), ou ne porter qu'un seul allèle favorable (état hétérozygote) au QTL.

III-2-4-3-1- *A priori* sur les paramètres explicatifs

Dans une analyse bayésienne, il est nécessaire de fixer des *a priori* sur les paramètres. Nous avons ainsi défini :

- effets génétiques des QTL : seuls les effets additifs ont été analysés dans cette étude ; le logiciel FlexQTL™ permet cependant de tester les effets de dominance seuls ou en combinaison avec les effets additifs ;
- nombre de QTL : le nombre maximal de QTL a été fixé à 10 pour l'ensemble du génome, et le nombre moyen à 5 ; il a été remarqué que ce paramètre influençait peu le nombre de QTL détectés *a posteriori* (Bink et al. 2002) ; la distribution du nombre de QTL est de type Poisson (Bink et al. 2008) ;
- position des QTL : elle a été définie comme uniforme sur tout le génome, autrement dit aucune région génomique n'a été supposée porter préférentiellement des QTL par rapport à une autre ;

- distance minimale entre deux QTL : cette distance a été fixée à 0 cM, c'est-à-dire que deux QTL peuvent être très proches l'un de l'autre ;
- seuil de fréquence allélique minimale d'un QTL au sein de la population étudiée : ce seuil a été fixé à 3%, en-deçà de cette valeur, le logiciel considère que l'on n'est plus en situation bi-allélique, donc qu'il n'y a plus de QTL ;
- probabilité minimale pour la détection d'un QTL dans une région génomique particulière : cette probabilité a été fixée à 5%, c'est-à-dire qu'un QTL sera considéré dans une région génomique particulière à condition qu'au moins 5% des itérations détectent un QTL dans cette même région.

Nous n'avons aucune connaissance sur les autres paramètres, c'est pourquoi nous n'avons fixé aucun *a priori*. Les effets environnementaux, correspondant ici aux effets "Bloc" et "Saison", ont été pris en compte par ailleurs (voir section III-2-3-1) et ne sont donc plus inclus dans le modèle.

III-2-4-3-2- Longueur de la chaîne de Markov

Des études sur des caractères agronomiques autres que la résistance à la tavelure ont par ailleurs été menées sur cette même population en pedigree, en testant différentes longueurs de chaîne de Markov. Au vu de ces résultats, nous avons alors fixé le nombre d'itérations à 2.10^6 afin d'obtenir des inférences *a posteriori* fiables. Ces données de simulation ont été enregistrées toutes les 200 itérations, soit un total de 10000 échantillons simulés.

III-2-4-3-3- Critères à vérifier pour valider les QTL

Avant de passer à l'analyse QTL proprement dite, il est indispensable de vérifier certains critères qui permettront de valider ou non l'analyse QTL. Ces critères sont les suivants :

- convergence des données *a posteriori* et des données observées : la moyenne phénotypique observée doit se situer dans l'intervalle défini par la moyenne déterminée *a posteriori* \pm l'écart-type déterminé *a posteriori* ;
- 'burn-in period' : c'est une estimation du nombre d'itérations au-delà duquel les valeurs estimées pour chacune des variables (moyenne, variance résiduelle, variance des QTL, nombre de QTL) sont statistiquement fiables ; la notion de 'burn-in period' vient du fait que la chaîne de Markov devant démarrer d'un point choisi au hasard, il est préférable d'éliminer les premières itérations pour obtenir un résultat indépendant de ce point de

Tableau 8. Interprétation du facteur de Bayes (logiciel FlexQTL™) pour la détection de QTL .

| 2 ln(Facteur de Bayes) | Niveau de significativité |
|-------------------------------|----------------------------------|
| 0 à 2 | Douteux |
| 2 à 5 | Positif |
| 5 à 10 | Fort |
| > 10 | Décisif |

départ ; le nombre d'itérations ainsi éliminées doit bien sûr être nettement inférieur au nombre total d'itérations fixé au départ ;

- nombre d'échantillons efficaces : il traduit le nombre de tirages effectivement indépendants issus de la distribution *a posteriori* ; il est conseillé que ce nombre soit supérieur ou égal à 100, autrement dit il faut un minimum de 100 échantillons significativement différents parmi les 10000 simulés.

III-2-4-3-4- Analyse des QTL

Le logiciel FlexQTL™ permet de répondre à plusieurs questions :

- Combien de QTL de résistance à la tavelure ont été détectés ?

Le nombre de QTL détectés sur l'ensemble du génome est déterminé par la valeur du facteur de Bayes qui traduit la probabilité *a posteriori* d'avoir 1 QTL contre 0 QTL, 2 QTL contre 1, ..., 10 QTL contre 9. Ce facteur suit une échelle (Tableau 8) du même ordre que le LOD score.

- Où sont localisés les QTL sur la carte génomique du pommier ?

La probabilité conditionnelle *a posteriori* d'avoir de 1 à 10 QTL est attribuée à chaque groupe de liaison. L'existence d'un QTL est établie pour une probabilité supérieure à 0,5. Ces probabilités *a posteriori* sont mises en parallèle du facteur de Bayes déterminé pour chacun des groupes de liaison. Après avoir déterminé les groupes de liaison portant les QTL, la position précise de ces derniers sur chacun des groupes de liaison est visualisée par différentes représentations : (i) les "traces" représentant la position des QTL à chaque simulation enregistrée, et (ii) la courbe de densité de probabilité marginale de la position des QTL sur les groupes de liaison. La position et la probabilité de présence d'un QTL sur un groupe de liaison sont influencées par le nombre de "méioses informatives" au niveau des marqueurs. Celles-ci traduisent à la fois le nombre d'individus génotypés et le niveau de polymorphisme de chaque marqueur, en représentant le niveau d'information sur la transmission des allèles le long du pedigree. Un QTL situé au voisinage de marqueurs peu polymorphes sera moins facilement détectable qu'un QTL au voisinage de marqueurs très polymorphes, bien que cela puisse dépendre des situations (par exemple, dans le cas de la transmission conjointe d'un allèle favorable rare au QTL et d'un allèle rare d'un marqueur très proche pourtant peu polymorphe).

- Quelle est la part de la variation phénotypique expliquée par les QTL ?

La part de la variation phénotypique expliquée par la variation génétique (R^2 total) est déterminée par le rapport entre la variance due aux QTL et la variance totale (variance

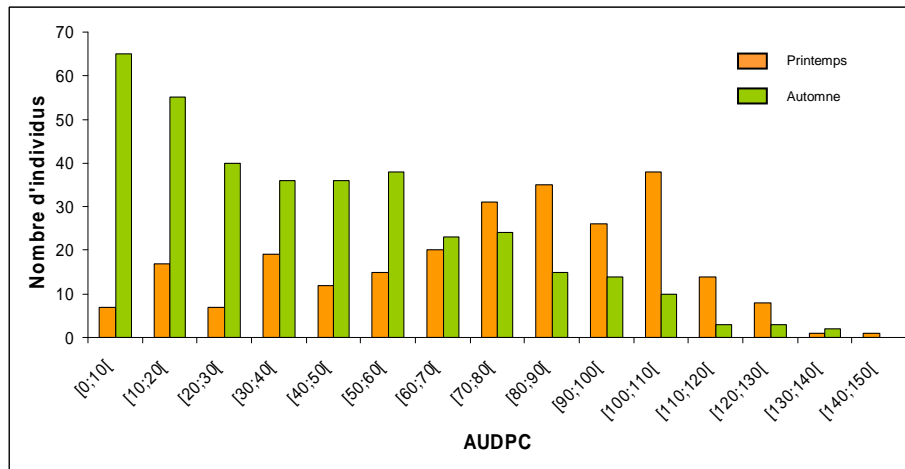


Figure 10. Distribution des données phénotypiques (ajustées sur l'effet "Bloc" intra-saison), aux deux saisons, de l'ensemble des descendants de la population en pedigree.

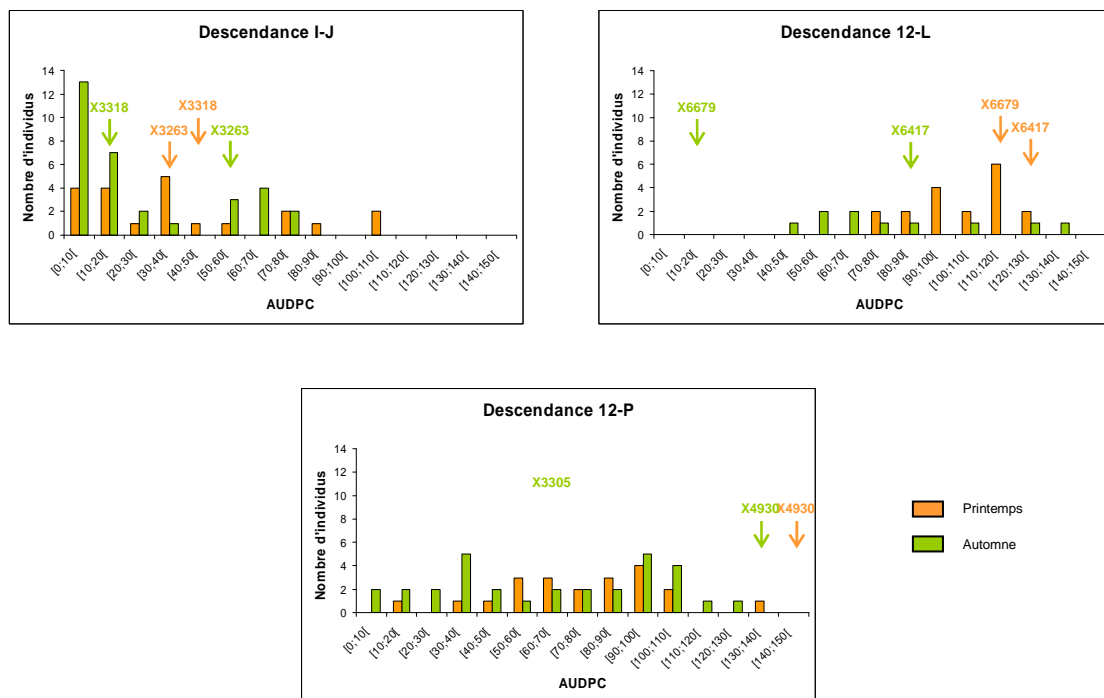


Figure 11. Distribution des données phénotypiques (ajustées sur l'effet "Bloc" intra-saison), aux deux saisons, de quelques descendance caractéristiques : descendance globalement résistante (I-J), descendance globalement sensible (12-L), descendance à distribution étalée (12-P). Les valeurs phénotypiques des parents de chaque descendance sont indiquées par des flèches (le parent X3305 n'a pu être testé qu'à l'automne).

due aux QTL + variance résiduelle). La contribution individuelle d'un QTL à la variation phénotypique est définie comme le rapport entre la variance due à ce QTL et la variance totale. Ces valeurs sont calculées à partir des données de sortie du logiciel FlexQTL™.

- Quels sont les génotypes porteurs des allèles favorables aux QTL ?

Un grand intérêt du logiciel FlexQTL™, en plus de sa recherche de QTL sur un pedigree complexe, vient du fait qu'il fournit pour chaque individu du pedigree (descendants, parents et ancêtres) les valeurs de probabilités d'appartenance aux trois classes génotypiques possibles dans le cadre du modèle bi-allélique (QQ, qq et Qq). Dans la pratique, le logiciel fournit les probabilités pour un individu de porter deux allèles défavorables, notés 'qq', ou deux allèles favorables, 'QQ', à chaque QTL détecté, ce qui permet de déduire la probabilité pour cet individu d'être hétérozygote, 'Qq', à ce QTL. Dans notre cas, le phénotype observé (AUDPC) correspond à un niveau de sensibilité à la maladie, aussi l'allèle d'intérêt est l'allèle favorable à la résistance et de ce fait défavorable à la sensibilité, autrement dit c'est l'allèle 'q' à l'état homozygote 'qq' ou hétérozygote 'Qq'. Le seuil de probabilité jugé satisfaisant pour déterminer le génotype d'un individu pour un QTL donné est fixé arbitrairement à 0,7.

III-3- Résultats

Les principaux résultats de l'étude de la population en pedigree ont été présentés lors d'une communication orale au XII^{ème} Congrès Eucarpia, section Sélection et génétique fruitières, qui s'est déroulé en Espagne (Soufflet-Freslon et al. 2007).

III-3-1- Conditions favorables à la détection de QTL

III-3-1-1- Distributions phénotypiques

Le niveau de maladie évalué sur l'ensemble des descendances à partir des données ajustées sur l'effet "Bloc" était variable et distribué de façon continue aux deux saisons (Figure 10). En outre, comme l'illustre la figure 11, il existait une forte variabilité intra-descendance et inter-descendance à chacune des saisons. Certaines descendances étaient globalement plus résistantes telle la descendance I-J, ou inversement globalement plus sensibles, comme la descendance 12-L ; d'autres montraient une distribution étalée, comme la descendance 12-P.

Tableau 9. Héritabilités individuelles (h^2_{indiv}) et héritabilités de moyennes génotypiques ($h^2_{\text{moy genot}}$) des 13 descendances de la population en pedigree.

| Descendance | SAISON PAR SAISON | | | SAISONS CONJOINTES | |
|-------------|-------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|
| | Saison | h^2_{indiv} | $h^2_{\text{moy genot}}$ | h^2_{indiv} | $h^2_{\text{moy genot}}$ |
| I-BB | P | 0,66 | 0,85 | 0,53 | 0,77 |
| | A | 0,43 | 0,66 | | |
| I-CC | P | 0,60 | 0,80 | 0,55 | 0,76 |
| | A | 0,54 | 0,74 | | |
| I-J | P | 0,63 | 0,83 | 0,65 | 0,85 |
| | A | 0,63 | 0,83 | | |
| I-M | P | 0,49 | 0,74 | 0,46 | 0,71 |
| | A | 0,48 | 0,71 | | |
| I-W | P | 0,56 | 0,78 | 0,60 | 0,82 |
| | A | 0,64 | 0,83 | | |
| 12-F | P | 0,57 | 0,79 | 0,64 | 0,84 |
| | A | 0,64 | 0,73 | | |
| 12-I | P | 0,83 | 0,93 | 0,65 | 0,84 |
| | A | 0,33 | 0,55 | | |
| 12-J | P | 0,40 | 0,67 | 0,40 | 0,68 |
| | A | 0,50 | 0,74 | | |
| 12-K | P | 0,58 | 0,80 | 0,54 | 0,77 |
| | A | 0,51 | 0,74 | | |
| 12-L | P | 0,12 | 0,28 | 0,32 | 0,59 |
| | A | 0,48 | 0,71 | | |
| 12-N | P | 0,62 | 0,83 | 0,45 | 0,70 |
| | A | 0,26 | 0,47 | | |
| 12-O | P | 0,66 | 0,85 | 0,65 | 0,85 |
| | A | 0,66 | 0,85 | | |
| 12-P | P | 0,45 | 0,71 | 0,59 | 0,81 |
| | A | 0,59 | 0,81 | | |
| Moyenne : | P | 0,55 | 0,76 | 0,54 | 0,77 |
| | A | 0,51 | 0,73 | | |

III-3-1-2- Répétabilité et héritabilité des caractères

Les héritabilités au sens large ont été estimées pour chacune des descendance à partir des données phénotypiques ajustées sur l'effet "Bloc" à chaque saison (Tableau 9). Nous avons noté, indifféremment d'une saison à l'autre : (i) des héritabilités individuelles intermédiaires (printemps : de 0,12 à 0,83, avec une moyenne de 0,55 ; automne : de 0,26 à 0,66, avec une moyenne de 0,51), ce qui révélait une répétabilité correcte entre les copies d'un même génotype ; (ii) des héritabilités de moyennes génotypiques fortes (printemps : de 0,28 à 0,93, avec une moyenne de 0,76 ; automne : de 0,47 à 0,85, avec une moyenne de 0,73) qui traduisaient une bonne estimation des valeurs génotypiques moyennes par les valeurs phénotypiques. Les mêmes observations pouvaient être faites à partir des données phénotypiques ajustées sur les effets "Bloc" et "Saison" (ajustement sur les moyennes des saisons ; Tableau 9) : (i) héritabilités individuelles intermédiaires (de 0,32 à 0,65, avec une moyenne de 0,54) ; (ii) héritabilités de moyennes génotypiques fortes (de 0,59 à 0,85, avec une moyenne de 0,77).

Par ailleurs, l'héritabilité au sens strict, estimée par FlexQTL™ à partir des données phénotypiques ajustées sur l'effet "Bloc" à chaque saison, était nettement supérieure au printemps qu'à l'automne : elle était de 0,68 et 0,46, respectivement. Ces valeurs d'héritabilité ont été déterminées à partir d'un jeu de données similaire, c'est-à-dire en ne prenant en considération que les données phénotypiques des parents et des descendants, et non celles des ancêtres car ils n'ont été testés qu'au printemps. L'héritabilité au sens strict, calculée à partir des données phénotypiques des parents et des descendants ajustées sur les effets "Bloc" et "Saison", était de 0,53 (ajustement sur les moyennes des saisons) ou 0,58 (ajustement par régression d'une saison sur l'autre).

Les deux types d'estimation d'héritabilités sont foncièrement différents : l'héritabilité au sens large (individuelle ou de la moyenne génotypique) traduit l'ampleur de la variation génétique totale (additivité et dominance) relativement à la variance phénotypique pour chaque descendance prise séparément. Aucune notion de pedigree n'est prise en compte et un éventuel apparentement des deux parents n'est pas considéré. L'héritabilité au sens strict, obtenue par FlexQTL™, ne mesure au contraire que la part de variation génétique qui se transmet sur l'ensemble du pedigree selon un modèle additif. Elle est donc multi-familiale et inclut toutes les relations d'apparentement possibles entre individus.

Tableau 10. Paramètres associés aux QTL de résistance à la tavelure détectés dans la population en pedigree.

| | | SAISON PAR SAISON | | SAISONS CONJOINTES | | | | |
|--|------------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| | | Pedigree complet | | Pedigree complet | | | Pedigree incomplet | |
| | | Sans phénotype ancêtres | | Sans phénotype ancêtres | Avec phénotype ancêtres | Sans phénotype ancêtres | | |
| | | Printemps | Automne | Ajustement régression | Ajustement moyennes saisons | | | |
| Facteur de Bayes nQTL/(n-1)QTL | | 2/1 : 5,3 3/2 : 1,6 | 2/1 : 5,8 3/2 : 0,4 | 3/2 : 5,0 4/3 : 1,4 | 3/2 : 4,3 4/3 : 1,3 | 3/2 : 4,2 4/3 : 1,2 | 2/1 : 3,3 3/2 : 2,0 | |
| Facteur de Bayes (Contribution) | Probabilité <i>a posteriori</i> | GL1 | 7,3 0,86 (19,9%) | - | 14,9 0,95 (17,6%) | 30,5 0,95 (18,0%) | 30,4 0,91 (17,8%) | 8,6 0,89 (21,5%) |
| | | GL2 | - | - | 4,9 0,71 (10,0%) | - | - | - |
| | | GL3 | 6,6 0,84 (25,9%) | - | 2,3 0,43 (4,2%) | 3,4 0,54 (6,4%) | 2,9 0,49 (5,7%) | 2,9 0,50 (6,1%) |
| | | GL6 | - | 3,5 0,62 (26,4%) | - | - | - | - |
| | | GL10 | 2,0 0,50 (9,0%) | - | 1,4 0,42 (2,2%) | 2,6 0,55 (3,4%) | 1,7 0,46 (3,4%) | 2,3 0,53 (5,2%) |
| | | GL17 | - | 4,7 0,75 (9,8%) | 3,3 0,63 (7,8%) | 5,2 0,77 (9,6%) | 1,8 0,49 (3,7%) | - |
| h ² sens strict | | 0,68 | 0,46 | 0,58 | 0,53 | 0,56 | 0,44 | |
| R ² total | | 54,8% | 36,2% | 41,8% | 37,4% | 30,6% | 32,8% | |

III-3-2- Détection de QTL

III-3-2-1- Analyse globale

Rappelons que seuls les QTL à effet additif ont été recherchés dans la population en pedigree. Notons également que les différents critères nécessaires à la validation de l'analyse des QTL ont été vérifiés pour la quasi-totalité des analyses ci-dessous.

III-3-2-1-1- Saison par saison

Deux analyses ont été effectuées à partir de jeux de données phénotypiques distincts printemps/automne, et en considérant l'ensemble du pedigree. Ces données n'étaient alors ajustées que sur l'effet "Bloc" propre à chaque saison. Nous avons constaté que les QTL détectés au printemps étaient totalement différents de ceux détectés à l'automne (Tableau 10). Au printemps, deux QTL pouvaient être considérés comme sûrs (facteurs de Bayes supérieurs à 5, et probabilités de présence des QTL supérieures à 0,8) : QTL des GL1 et GL3 (Figure 12). Un troisième sur le GL10 (Figure 12) était à la limite des seuils de détection. Leur contribution à la variation phénotypique variait de 9% à 26%, la somme des contributions atteignant près de 55%. A l'automne, deux QTL ont pu être détectés sur les GL 6 et 17 (Figure 12) ; ils expliquaient respectivement 26% et 10% de la variation phénotypique. Il est important de noter que l'analyse des QTL à l'automne doit être considérée avec précaution puisque l'un des critères de vérification n'a pas été validé : les données *a posteriori* ne convergeaient pas vers les données observées, autrement dit la moyenne phénotypique observée ne se situait pas dans l'intervalle défini par la moyenne déterminée *a posteriori* \pm l'écart-type déterminé *a posteriori*.

III-3-2-1-2- Saisons conjointes

III-3-2-1-2-1- Ajustement des phénotypes sur les moyennes des saisons

Quatre QTL ont été détectés à partir des données phénotypiques, ajustées simultanément sur les effets "Bloc" et "Saison", des parents et descendants, et l'ensemble du pedigree étant pris en considération (Tableau 10). Un QTL a été identifié avec certitude (facteur de Bayes supérieur à 10, et probabilité de présence du QTL proche de 1) sur le GL1 dans la région génomique portant le gène majeur *Vf*. Ce QTL expliquait 18% de la variation phénotypique. Un deuxième QTL, avec un effet moindre (contribution de 10% à la variation

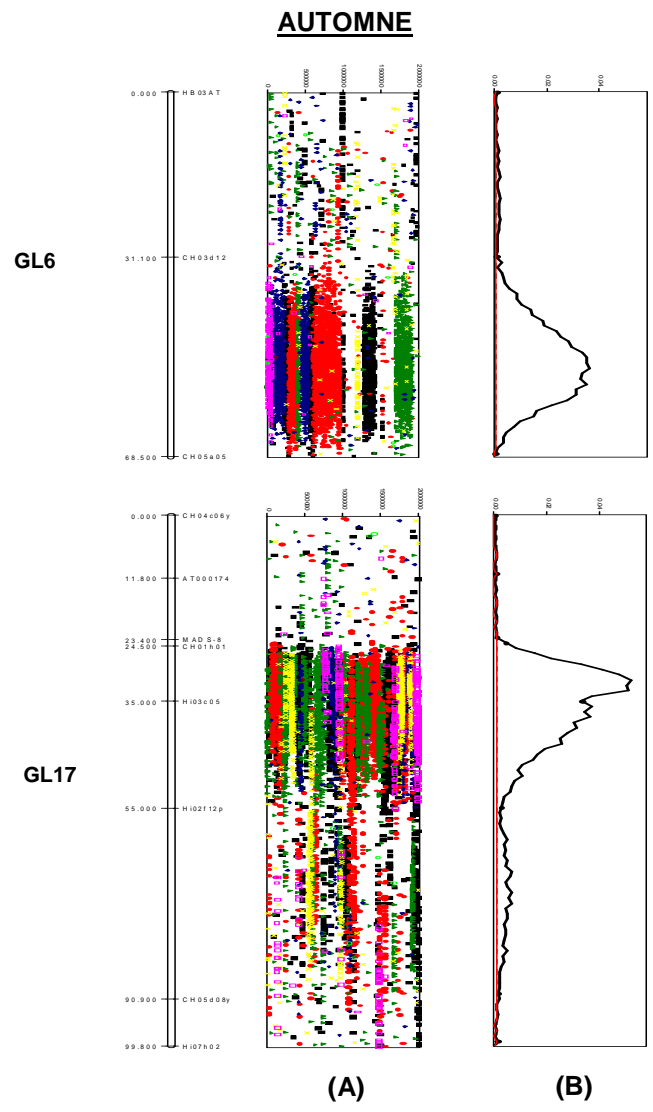
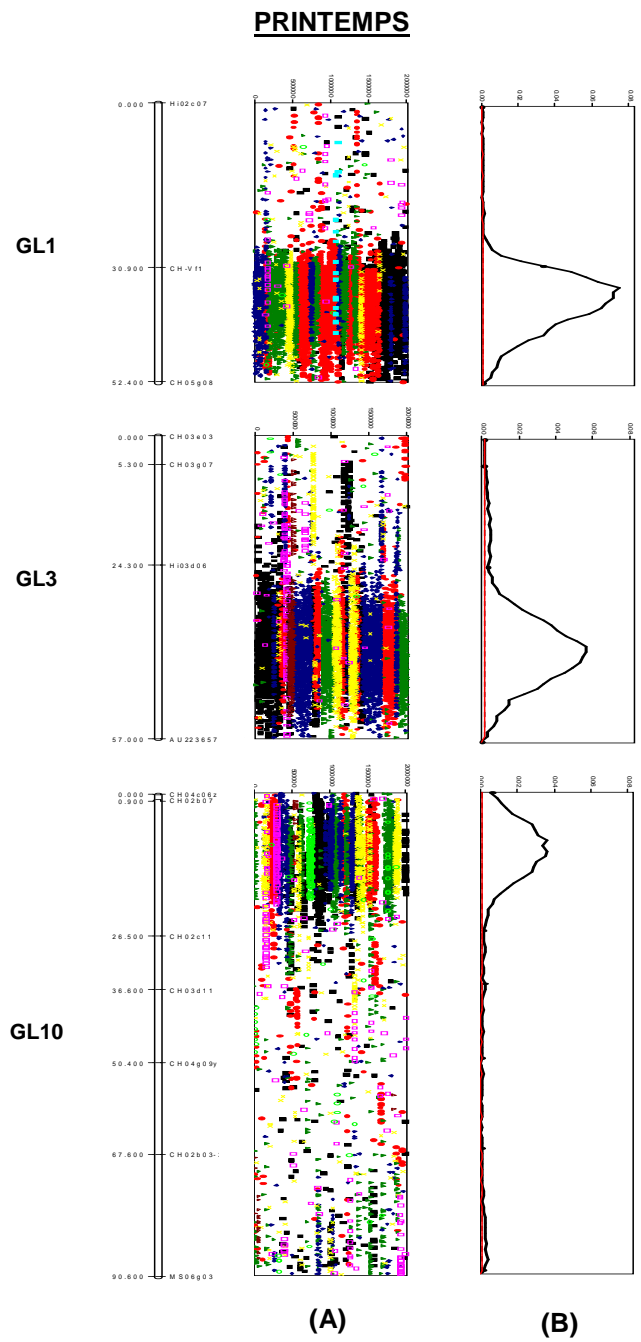


Figure 12. Cartographie des QTL de résistance à la tavelure détectés dans la population en pedigree, au printemps et à l'automne (logiciel FlexQTL™).

(A) : Positionnement des QTL au cours du processus de simulation. Le nombre de couleurs correspond au nombre de QTL estimés *a priori*.

(B) : Densité de probabilité de la position des QTL. L'aire sous la courbe représente 95% de la présence du QTL.

phénotypique), a été localisé avec précision sur le GL17 (facteur de Bayes supérieur à 5, et probabilité de présence du QTL supérieure à 0,7). Les deux autres QTL détectés sur les GL 3 et 10 étaient plus incertains (facteurs de Bayes voisins de 3, et probabilités de présence des QTL légèrement supérieures à 0,5). Ces QTL contribuaient peu à la variation phénotypique : 6% et 3% pour le GL3 et le GL10, respectivement. Ces quatre QTL expliquaient environ 37% de la variation phénotypique. Pour ces quatre QTL détectés à la fois en saisons séparées et en saisons conjointes, les positions des QTL étaient conservées.

Les QTL identifiés à chaque saison ont ainsi été retrouvés dans l'analyse conjointe des deux saisons, excepté le QTL du GL6 détecté seulement à l'automne.

Une analyse comparative a été réalisée à partir du même jeu de données phénotypiques (parents et descendants) mais en retirant les données généalogiques, autrement dit, le pedigree ne comprenait que deux générations, celle des parents et celle des descendants. Comme indiqué dans le tableau 10, l'introduction du pedigree complet a amélioré la significativité du QTL du GL1, a maintenu les QTL des GL 3 et 10, et a surtout révélé la présence du QTL du GL17 qui n'apparaissait pas lorsque l'information généalogique n'était pas prise en compte.

Une seconde analyse comparative a consisté à ajouter les données phénotypiques des ancêtres à celles des parents et descendants en considérant l'ensemble du pedigree. Le QTL du GL1 était toujours fortement significatif ainsi que le QTL du GL3 mais dans une moindre mesure. Les QTL des GL 10 et 17 étaient, quant à eux, plus effacés (Tableau 10).

III-3-2-1-2-2- Ajustement des phénotypes par régression d'une saison sur l'autre

Seule l'analyse à partir des données phénotypiques, ajustées par régression 'automne/printemps', des parents et descendants, tout en considérant l'ensemble du pedigree, a été réalisée (Tableau 10). Les différentes analyses comparatives effectuées précédemment ne l'ont pas été avec cette méthode d'ajustement.

Le QTL sur le GL1 a été identifié sans ambiguïté (facteur de Bayes supérieur à 10, et probabilité de présence du QTL proche de 1). Le QTL sur le GL17 restait significatif (facteur de Bayes supérieur à 3, et probabilité de présence du QTL supérieure à 0,6). Les QTL sur les GL3 et 10 n'étaient plus clairement significatifs (facteurs de Bayes voisins de 2, et probabilités de présence du QTL inférieures à 0,5). Un QTL supplémentaire a par contre été détecté sur le GL2 (facteur de Bayes proche de 5, et probabilité de présence du QTL supérieure à 0,7).

III-3-2-2- Hérité des allèles favorables aux deux principaux QTL

Des analyses plus approfondies ont été réalisées sur les deux principaux QTL qui sont les QTL des GL1 et 17.

III-3-2-2-1- QTL sur le GL1

Un QTL ayant été détecté sur le GL1 dans la région génomique du gène majeur *Vf*, une attention particulière a été portée sur les individus ségrégeant pour l'allèle favorable du marqueur CH-Vf1 (160pb) étroitement lié à ce gène (Vinatzer et al. 2004), marqueur qui était le plus proche du pic du QTL. Il faut rappeler que tous les descendants dérivait de croisements entre parents portant (majoritairement) le gène *Vf* à l'état hétérozygote, et qu'ils avaient été présélectionnés au stade semis pour leur forte résistance à la tavelure (races locales de *V. inaequalis*). Celle-ci s'était traduite par la présence systématique de l'allèle favorable au gène *Vf* chez ces descendants, avec présence soit d'une "dose" (hétérozygotie *Vf-v*), soit de deux "doses" (homozygotie *Vf-Vf*) de cet allèle favorable.

Sur la base des données de génotypage au marqueur CH-Vf1, nous avons constaté que les descendants homozygotes *Vf-Vf* étaient en moyenne significativement plus résistants que les descendants hétérozygotes *Vf-v* ($AUDPC_{moy\ Vf-Vf} = 41,7$ contre $AUDPC_{moy\ Vf-v} = 57,1$, respectivement -données phénotypiques ajustées sur les moyennes des saisons-). Ce contraste était-il général ou variait-il suivant les descendance ? Une ANOVA, incluant un effet "Descendance", un effet "Dose de *Vf*" et l'interaction "Descendance*Dose de *Vf*", a alors été réalisée pour juger de la généralité de ce contraste. L'interaction n'était pas significative ($p = 0,1209$) alors que les effets "Descendance" et "Dose de *Vf*" l'étaient ($p < 0,0001$ pour ces deux facteurs), ce qui signifiait que les individus homozygotes *Vf-Vf* étaient plus résistants que les individus hétérozygotes *Vf-v* quelle que soit la descendance à laquelle ils appartenaient.

Nous avons analysé les valeurs de probabilités génotypiques ($p(QQ)$, $p(Qq)$, $p(qq)$) données par le logiciel FlexQTL™ pour ce QTL pour les jeux de données avec lesquels le QTL du GL1 avait été détecté : données ajustées sur l'effet "Bloc" au printemps (voir section III-2-3-1-1) et données ajustées sur les effets "Bloc" et "Saison" (voir sections III-2-3-1-2-1 et III-2-3-1-2-2). Les valeurs de probabilités indiquées ci-dessous sont celles obtenues pour les données phénotypiques ajustées sur les effets "Bloc" et "Saison" par la méthode d'ajustement sur les moyennes des saisons.

Il ressort que la majorité des parents (11 sur les 15 parents impliqués) avaient une forte probabilité (0,8-0,9) d'être hétérozygotes ('Qq') pour le QTL détecté sur le GL1 ; cet état

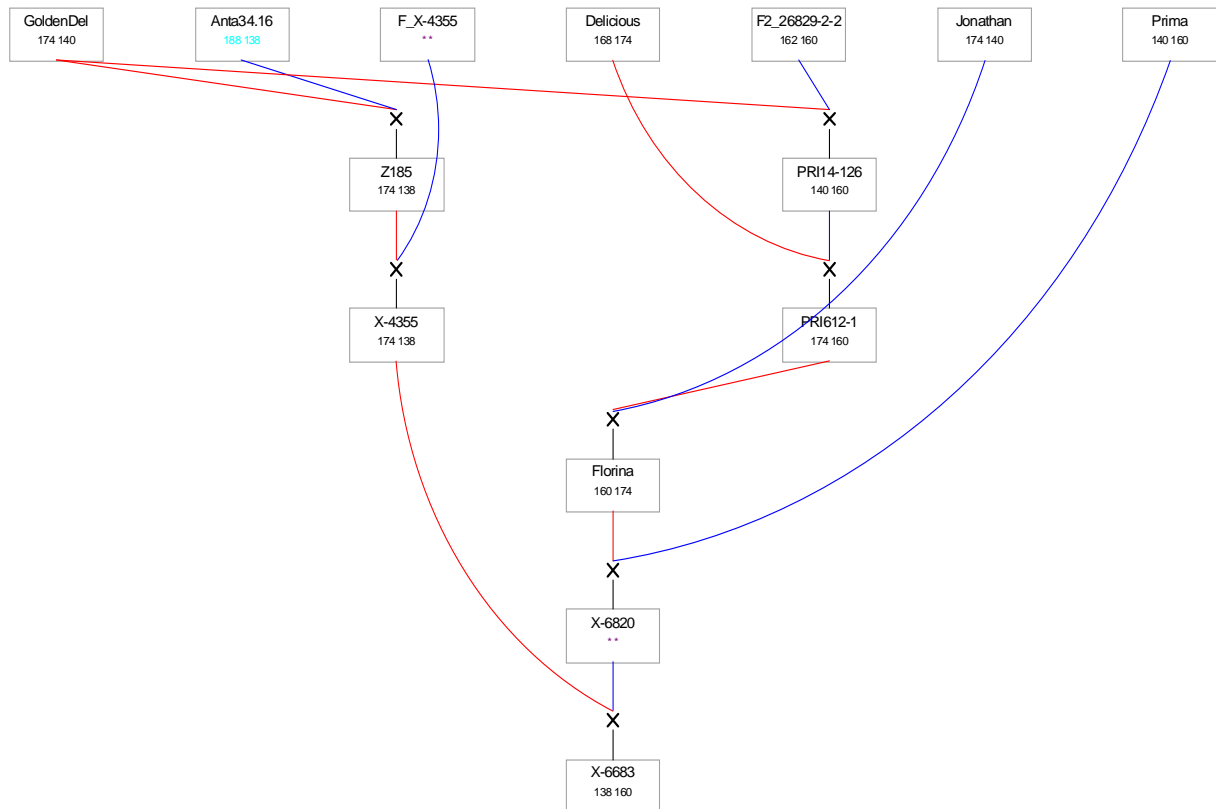


Figure 13. Suivi des allèles du marqueur CH-Vf1, lié au QTL de résistance à la tavelure du GL1, le long du pedigree du parent 'X6683'. La taille des allèles est donnée pour chaque individu ; une donnée manquante est indiquée par le symbole "**". Chaque individu (hormis les fondateurs) est issu du croisement (symbolisé par une croix) entre sa mère, reliée par un trait rouge, et son père, relié par un trait bleu.

reflétait leur état hétérozygote *Vf-v*. En effet, ces parents portaient tous une "dose" de l'allèle favorable du marqueur CH-Vf1 (160pb) lié au gène majeur *Vf*. Cette cohérence entre l'état hétérozygote *Vf-v* et l'état hétérozygote pour le QTL se vérifiait également pour la plupart des ancêtres connus pour porter le gène *Vf*, tel 'Baujade', 'X4638'... il a ainsi été possible de remonter jusqu'au génotype fondateur 'F2-26829-2-2', connu pour avoir transmis l'allèle favorable à *Vf*, puisque issu du géniteur sauvage *Malus floribunda* #821. Deux parents ('Rubinette' et 'X6417') avaient préalablement été identifiés comme ne portant pas l'allèle favorable au gène *Vf*, ce qui concorda avec leur forte probabilité de porter deux allèles défavorables au QTL ('QQ', l'allèle Q correspondant à une valeur élevée d'AUDPC, donc à un allèle défavorable en termes de résistance vis-à-vis de la tavelure). Par contre, deux autres parents ('X6683' et 'Red Winter 3177') avaient une forte probabilité (0,86 et 0,74, respectivement) de porter deux allèles favorables ('qq', l'allèle q correspondant à un allèle de faible valeur d'AUDPC) au QTL, alors que le marqueur CH-Vf1 n'indiquait qu'une seule "dose" de l'allèle favorable (160bp) lié au gène *Vf*. Quels étaient ces "autres" allèles favorables du marqueur CH-Vf1 liés au QTL du GL1 ? Comme l'illustre son pedigree sur la figure 13, l'individu 'X6683' dérive de la variété fondatrice 'Antonovka 34.16' qui lui a transmis l'allèle de 138pb, allèle également présent chez la "mère" ('X4355') et la "grand-mère" ('Z185') de 'X6683'. Ces individus, 'X4355' et 'Z185', présentaient une probabilité significative (0,63 et 0,58, respectivement) d'être hétérozygotes ('Qq') pour le QTL du GL1 alors qu'ils ne portaient pas l'allèle favorable lié au gène *Vf*; il en était de même pour 'Antonovka 34.16' mais avec une probabilité plus faible (0,47). L'allèle 138bp du marqueur CH-Vf1 est donc apparu lié à un allèle favorable au QTL du GL1 probablement hérité de la variété 'Antonovka 34.16', allèle qui serait indépendant de l'allèle favorable lié à *Vf*. Le parent 'X6683' serait donc en situation homozygote 'qq' grâce à la présence d'un allèle favorable lié à *Vf* et d'un allèle favorable hérité d'Antonovka 34.16'. De manière similaire, un troisième allèle favorable (174pb) lié au QTL du GL1 proviendrait de 'Red Winter', "mère" du parent 'Red Winter 3177' (Figure 14). En effet, ce dernier portait les allèles de 160pb et 174pb au marqueur CH-Vf1, allèles hérités respectivement de 'Prima' et 'Red Winter'. La forte probabilité (0,71) de 'Red Winter' d'être hétérozygote pour le QTL confirmait l'hypothèse d'un troisième allèle favorable lié au QTL du GL1. Il faut souligner cependant que, contrairement aux autres parents et à leurs ascendants, la corrélation entre les valeurs de probabilités génotypiques à ce QTL obtenues à partir des différents jeux de données phénotypiques n'était pas satisfaisante pour le parent 'Red Winter 3177' et sa "mère" 'Red Winter'. Il n'en reste pas moins que la comparaison des moyennes phénotypiques des classes génotypiques du marqueur CH-Vf1 dans la descendance issue de 'Red Winter 3177' indiquait la présence de deux allèles favorables à ce QTL chez ce parent bien que l'ANOVA ne soit pas significative ; ceci se vérifie quel que soit le jeu de données phénotypiques utilisé (résultats non montrés).

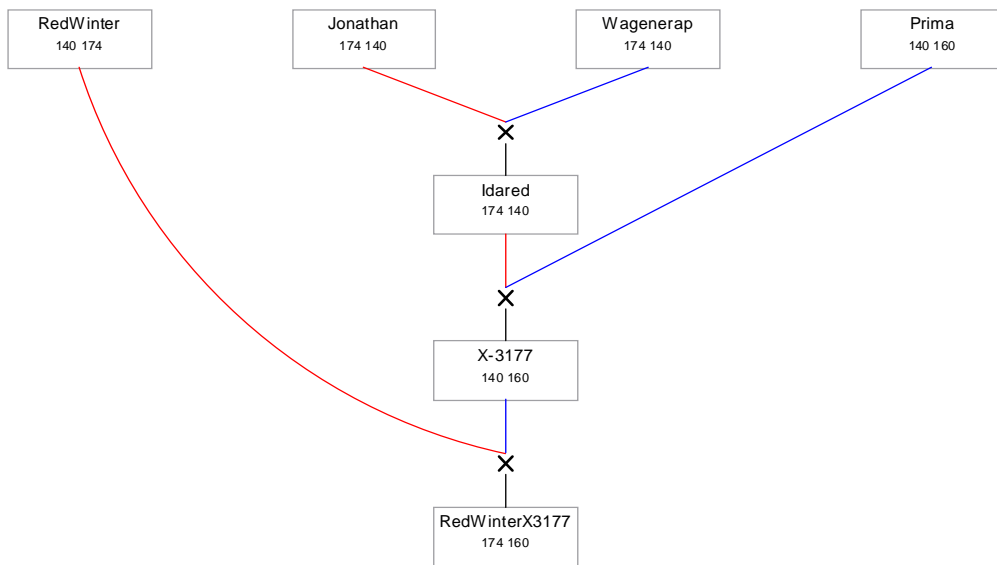


Figure 14. Suivi des allèles du marqueur CH-Vf1, lié au QTL de résistance à la tavelure du GL1, le long du pedigree du parent 'Red Winter 3177'. Chaque individu (hormis les fondateurs) est issu du croisement (symbolisé par une croix) entre sa mère, reliée par un trait rouge, et son père, relié par un trait bleu.

Notons que le gène majeur *Vf* n'a qu'une seule et même origine génétique même si elle n'apparaît pas clairement ici. En effet, 'Prima' est ici définie comme une variété fondatrice porteuse de *Vf* du fait de difficultés à reconstituer son pedigree grâce aux marqueurs, or nous savons que cette variété dérive sans ambiguïté du même fondateur 'F2-26829-2-2' issu du pommier sauvage *Malus floribunda* #821 (Durel et al. 1998).

En résumé, le modèle génétique bi-allélique (Q/q) implémenté dans FlexQTL™ nous a permis d'identifier trois allèles (160pb, 138pb et 174pb) du marqueur CH-Vf1 lié à l'allèle favorable au QTL du GL1. L'allèle '160pb' était hérité uniquement du pommier sauvage *M. floribunda* #821 et n'apparaissait dans aucun autre fondateur non relié à ce génotype sauvage : il se comportait donc comme un 'allèle privé' marquant la présence de l'allèle favorable au gène majeur *Vf*. L'allèle '138pb' apparaissait dans la variété fondatrice 'Antonovka 34.16' et ses descendants. Il apparaissait aussi dans le pedigree d'un autre génotype ('X6417'), dérivant lui aussi d'une variété du groupe des 'Antonovka' ('Antonovka P.I. 172632'), mais n'était alors pas associé à l'allèle favorable au QTL du GL1. Cet allèle '138pb' était cependant un 'allèle privé' des variétés 'Antonovka' et de leurs descendants. L'allèle '174pb' était par contre présent chez plusieurs génotypes ne portant pas l'allèle favorable au QTL du GL1, comme on peut le constater sur les pedigrees de 'X6683' et 'Red Winter 3177' (Figures 13 et 14) où il apparaît aussi chez les variétés 'Golden Delicious', 'Red Delicious', 'Jonathan' et 'Wagenerap'.

III-3-2-2-2- QTL sur le GL17

Nous avons recherché l'origine génétique de la résistance apportée par le QTL du GL17 en suivant la méthodologie adoptée pour le QTL du GL1. Les valeurs de probabilités indiquées ci-dessous sont celles obtenues à partir des données phénotypiques ajustées sur les effets "Bloc" et "Saison" par la méthode d'ajustement sur les moyennes des saisons. Les valeurs obtenues à partir des autres jeux de données avec lesquels le QTL du GL17 avait été détecté (données ajustées sur l'effet "Bloc" à l'automne, voir section III-2-3-1-1 ; données ajustées sur les effets "Bloc" et "Saison" par la méthode d'ajustement par régression, voir section III-2-3-1-2-2) sont similaires à celles indiquées ici.

Nous avons ainsi identifié, d'après les valeurs des probabilités, les parents portant un (état hétérozygote 'Qq') ou deux allèles favorables (état homozygote favorable 'qq') au QTL. Cinq parents sur 15 étaient hétérozygotes avec une forte probabilité : 'Dorianne' (0,79), 'Rubinette' (0,85), 'X3318' (0,81), 'X6564' (0,77) et 'X6808' (0,79). 'X3263' et 'X6683' étaient, quant à eux, homozygotes favorables (probabilités de 0,67 et 0,87, respectivement). Les huit parents restants étaient homozygotes défavorables ('QQ'), c'est-à-dire ne portaient aucun allèle favorable au QTL, ou bien leur état homozygote/hétérozygote était incertain (probabilités inférieures à 0,5). Pour chacun des parents possédant l'allèle de résistance au

Tableau 11. Valeurs de probabilités génotypiques (fournies par le logiciel FlexQTL™) pour le QTL de résistance à la tavelure du GL17 pour les variétés fondatrices porteuses de cette résistance. Dans la cadre d'un modèle bi-allèlique, trois classes génotypiques sont possibles à un QTL donné : "QQ" (homozygote défavorable), "qq" (homozygote favorable) et "Qq" (hétérozygote). Les valeurs en rouge correspondent aux valeurs de probabilités génotypiques retenues.

| | QQ | qq | Qq |
|---------------------|------|------|------|
| 'Golden Delicious' | 0,11 | 0,12 | 0,77 |
| 'Jonathan' | 0,07 | 0,63 | 0,30 |
| 'Rall's Janet' | 0,04 | 0,47 | 0,49 |
| 'Red Delicious' | 0,46 | 0,12 | 0,42 |
| 'Red Winter' | 0,07 | 0,31 | 0,62 |
| 'Reinette Clochard' | 0,05 | 0,48 | 0,47 |

QTL (hétérozygotes ou homozygotes favorables), nous avons comparé les niveaux de résistance liés aux différents allèles de deux marqueurs flanquant ce QTL, CH01h01 et Hi03c05, au sein des descendance dans lesquelles ces parents étaient impliqués afin de déterminer les allèles favorables de ces marqueurs pour chaque parent. Afin d'identifier les variétés fondatrices à l'origine de la résistance apportée par ce QTL du GL17, nous avons alors suivi les allèles des marqueurs CH01h01 et Hi03c05 le long du pedigree des parents porteurs de résistance. Cette analyse a notamment révélé des origines communes de résistance. Tel était le cas des variétés fondatrices 'Golden Delicious' et 'Reinette Clochard' qui avaient transmis, respectivement, leurs allèles favorables aux parents 'Rubinette' et 'X6683', et 'Dorienne' et 'X6808'. Les parents homozygotes favorables, 'X3263' et 'X6683', avaient, quant à eux, hérité d'un allèle favorable différent (pour chacun des deux marqueurs) provenant de la même variété fondatrice 'Jonathan' qui s'est révélée porteuse de deux allèles favorables (probabilité de 'qq' = 0,63). Les variétés fondatrices 'Red Delicious', 'Rall's Janet', ou encore 'Red Winter' étaient également sources de résistance, résistance qu'elles avaient transmise à des parents distincts. Les probabilités de présence d'un ou de deux allèles favorables au QTL estimées pour ces variétés fondatrices étaient en adéquation avec les observations ci-dessus en tenant compte du fait que certaines valeurs étaient parfois inférieures au seuil de 0,7 que nous nous étions fixé (Tableau 11). L'origine de la résistance apportée par le QTL du GL17 a ainsi pu être déterminée pour l'ensemble des parents porteurs de cette résistance, à l'exception du parent 'X6683' pour lequel il reste une incertitude concernant l'origine de son second allèle favorable. En effet, nous avons vu qu'il avait hérité d'un allèle favorable de 'Jonathan', et son second allèle favorable semblerait provenir de 'Golden Delicious' mais nous ne pouvons l'affirmer car nous n'avons pas connaissance des allèles des marqueurs CH01h01 et Hi03c05 pour les variétés 'F_X4355' et 'Antonovka 34.16', ancêtres de 'X6683'. En définitive, sur les 26 génotypes fondateurs appartenant à la population en pedigree, six ont été identifiés comme sources de résistance pour ce QTL.

III-4- Discussion

Cette partie de ma thèse avait pour objectif de rechercher des QTL de résistance à la tavelure ségrégeant dans un sous-ensemble de la population d'amélioration INRA d'Angers en plus de la présence du gène *Vf*. Cet objectif se basait sur l'observation de différences significatives entre des cultivars-*Vf* lorsque ceux-ci sont confrontés à des souches virulentes-*Vf*, mais comportait le risque de ne rien trouver du tout du fait des choix expérimentaux et méthodologiques effectués. Les résultats obtenus sont un peu décevants puisqu'ils ne nous ont pas permis d'identifier clairement de nouvelles régions génomiques confortant significativement le niveau de résistance à la tavelure apporté par *Vf*. Ils nous ont cependant

apporté des éléments d'information qui viennent éclairer ou conforter les connaissances acquises par ailleurs par mon équipe d'accueil ou à l'étranger. Nous discutons donc ces résultats dans ce contexte et proposons des pistes de réflexion ou d'expérimentation pour enrichir cette démarche.

III-4-1- Peu de QTL renforçant le gène majeur *Vf* face aux souches pathogènes virulentes-*Vf*

Au vu de nos résultats, il semblerait que nous n'ayons pas pleinement répondu à la question de départ qui était "A quoi est due la différence de sensibilité/résistance des cultivars de pommier portant le gène majeur *Vf* face aux souches de *Venturia inaequalis* capables de contourner ce gène ?". Il faut noter que les génotypes-*Vf* connus pour présenter des niveaux différents de résistance, en verger, vis-à-vis de souches virulentes-*Vf* sont généralement des génotypes hétérozygotes *Vf-v*. Par exemple, 'Pitchounette' (dénommée aussi 'X3318') est très peu sensible en verger contrairement à 'Ariane' qui est très sensible.

L'analyse de notre population en pedigree a révélé deux principaux QTL : l'un sur le GL1, dans la région génomique de *Vf*, et l'autre sur le GL17. Toutefois, le QTL du GL1 vient en partie du contraste entre l'état homozygote *Vf-Vf* et l'état hétérozygote *Vf-v*. Or comme indiqué ci-dessus, nous recherchions initialement les loci de résistance différenciant les génotypes hétérozygotes *Vf-v* entre eux ; aussi le contraste *Vf-Vf/Vf-v* ne permet pas de répondre à notre question de départ. En revanche, les autres allèles favorables au QTL du GL1 provenant d'Antonovka 34.16' et 'Red Winter' répondent partiellement à cette question. D'autre part, le QTL du GL17 peut également expliquer cette différence entre génotypes-*Vf*. Nous pouvons rapprocher ce résultat d'observations faites en verger par mon équipe d'accueil, dans le Nord (Villeneuve d'Ascq) et l'Ouest (Angers) de la France. En effet, des génotypes portant à la fois les gènes majeurs *Vf* et *Vg* et deux QTL sur les GL11 et 17 y étaient significativement plus résistants que les génotypes ne portant que les deux gènes majeurs sans aucun QTL. Toutefois, il paraît peu probable qu'à eux seuls les QTL des GL1 et 17 puissent expliquer complètement la différence de résistance observée entre les génotypes-*Vf*.

D'autres QTL ont été identifiés dans notre population en pedigree mais de façon moins nette. Le QTL du GL2 a été localisé dans une région génomique portant un cluster de gènes majeurs (Figure 4 du chapitre 1) ainsi qu'un QTL conférant une résistance partielle vis-à-vis de souches de races 1, 6, et '6+7', et d'un inoculum local français (Calenge et al. 2004). Un QTL a été détecté sur le GL3, à une position un peu décalée par rapport à un QTL identifié avec des inocula locaux hollandais et italien dans les descendances 'Fiesta' x 'Discovery' et 'Durello di Forlì' x 'Fiesta', respectivement (projet DARE, Durel et al. 2003 +

résultats non publiés). Un autre QTL a été mis en évidence en bas du GL6, région où Liebhard et al. (2003b) avaient cartographié un QTL avec un inoculum local suisse dans la descendance 'Fiesta' x 'Discovery'. Le QTL du GL10 semblait co-localiser avec le gène majeur *Vd* issu de 'Durello di Forlì' (Tartarini et al. 2004), cultivar qui possède également un QTL dans cette région génomique efficace vis-à-vis de la souche 1066 (race 7) et d'un inoculum local italien (projet DARE, Durel et al. 2003 + résultats non publiés). Il serait intéressant de valider ces différents QTL. Pour cela, il serait plus judicieux de restreindre le nombre de parents en ne sélectionnant que les parents possédant vraisemblablement (sur la base de leur probabilité génotypique) au moins l'un des QTL cités ci-dessus. Il serait alors souhaitable d'augmenter le nombre d'individus par descendance tout en restant avec un effectif total raisonnable, ce qui améliorerait la puissance de détection des QTL.

III-4-2- Raisons potentielles d'une faible détection de QTL additionnels

D'un point de vue stratégique et pour des raisons de disponibilité en place dans les serres, nous avons testé une partie de la population au printemps puis l'autre partie à l'automne. Il nous paraissait plus judicieux de tester un sous-effectif de chacune des descendance au printemps plutôt que de ne tester que certaines descendance dans leur totalité. Au vu des résultats du test pathologique du printemps (variations phénotypiques intra et inter-descendance, héritabilités correctes), nous avons décidé de poursuivre l'analyse de cette population en inoculant, à l'automne, les individus restants de chaque descendance. Afin de rendre compte de la corrélation entre les deux saisons, certains génotypes ont été testés à la fois au printemps et à l'automne (génotypes doublons). Nous supposons l'existence d'une meilleure corrélation entre les deux saisons d'autant plus que nous travaillions avec des plants greffés et non des plants issus de semis. Une expérimentation sur tous les individus à une seule saison aurait vraisemblablement augmenté la puissance de détection des QTL : dans notre cas, il aurait été préférable de réaliser ce test pathologique au printemps étant donné que la moyenne phénotypique et l'héritabilité au sens strict étaient plus élevées, ce qui laisse supposer de meilleures conditions de développement de la maladie qu'à l'automne.

Les QTL recherchés en serre ne sont pas forcément de bons indicateurs pour révéler les bases génétiques des différences de résistance observées en verger entre les génotypes-*Vf*. Nous ne rentrerons pas ici dans le détail de cette corrélation serre-verger car elle sera explicitée dans la discussion générale. Toutefois, il existait des différences de résistance significatives entre les parents du pedigree dans notre test en serre (résultats non montrés), aussi des QTL pouvaient y être recherchés.

Les 87 marqueurs SSR sélectionnés recouvraient environ 75% du génome du pommier, aussi certaines régions génomiques n'ont pas été explorées.

Bink et al. (2008) ont récemment mené des essais de simulation sur ces 13 mêmes descendances du pedigree HiDRAS-INRA : ils ont simulé deux groupes de liaison (GLx et GLy) portant, chacun, deux QTL. Ils ont ainsi montré que le nombre de QTL était surestimé sur le GLx lorsque le modèle "QTL" ne prenait pas en compte les QTL du GLy (GLy exclu de l'analyse). Ces derniers QTL pouvaient cependant être pris en compte dans l'analyse avec GLy exclu, en ajoutant au modèle "QTL" une composante polygénique, soit un modèle "QTL + TIM". Le nombre de QTL détectés sur le GLx était alors plus cohérent avec le nombre simulé. Dans le cas d'une non-saturation de la carte génétique, on est dans une situation analogue à celle d'exclure un GL où il y aurait potentiellement des QTL. Il serait donc intéressant de tester un modèle "QTL + TIM" sur notre jeu de données pour tenter de préciser le nombre de QTL en considérant d'éventuels QTL sur des régions génomiques non recouvertes par des marqueurs.

Dans notre étude, nous avons privilégié les QTL à effet additif. D'autres mécanismes de résistance pourraient également être impliqués, telles des interactions intra-locus (dominance) ou des interactions épistatiques. La détection des effets de dominance, seuls ou en combinaison avec les effets additifs, est implémentée dans le logiciel FlexQTL™. Nous n'avons pas recherché ces effets faute de temps mais cela pourrait être envisagé à court terme. En revanche, les effets d'épistasie ne sont pas décelables par FlexQTL™ (du moins pour le moment).

Le logiciel FlexQTL™ se base uniquement sur un modèle génétique bi-allélique. Or comme nous avons pu le constater par des analyses approfondies sur les QTL des GL1 et 17, plus de deux origines alléliques ont été identifiées pour chacun de ces QTL. Il aurait pu être intéressant d'utiliser un modèle multi-allélique s'il avait été disponible, car rien ne prouve que le déterminisme génétique de nos QTL soit strictement ou même approximativement bi-allélique. Toutefois, l'estimation du nombre d'allèles aurait pu être gênée par le fait qu'un nombre limité d'allèles fondateurs auraient été transmis aux descendances et les différences entre les effets alléliques auraient pu ne pas être suffisantes pour tous les distinguer vu le nombre limité de descendants étudiés (Jannink and Wu 2003). En outre, si le nombre d'allèles à un même QTL est supérieur à deux, le modèle bi-allélique reste applicable si on autorise des QTL bi-alléliques très proches (distance minimale entre deux QTL fixée à 0) (Bink et al. 2008). Dans ce cas, un déterminisme génétique tri-allélique pourrait par exemple se caractériser par la détection de deux QTL très proches dont les origines alléliques (favorables/défavorables) remonteraient à des fondateurs différents selon le QTL considéré. Dans notre étude, nous avons permis que des QTL soient très proches les uns des autres ;

cependant nous n'avons pas détecté de tels QTL, aussi le modèle bi-allélique semble être satisfaisant.

L'effectif total d'individus testés est-il suffisant pour permettre une recherche de QTL suffisamment efficace face à autant de fondateurs (au nombre de 26) ? Au début du projet HiDRAS, nous n'avions aucune expérience sur la puissance de détection de QTL dans un tel pedigree. Aussi les descendances (du moins celles présentes à l'INRA d'Angers) avaient été sélectionnées pour leur degré d'apparentement assez important (afin de favoriser l'apport d'informations mutuelles entre les descendances) et pour leur taille suffisante qui permettait d'envisager la recherche de QTL (à fort effet) descendance par descendance ou parent par parent, si nous ne trouvions rien en pedigree. Des simulations seraient souhaitables pour optimiser le choix du nombre de descendances et du nombre d'individus par descendance en fonction de la structure du pedigree (pedigree très imbriqué, c'est-à-dire présentant un niveau élevé d'apparentement entre les générations, ou inversement pedigree très lâche), du nombre, de l'effet et de la fréquence allélique des QTL.

III-4-3- Limites méthodologiques

III-4-3-1- Expression différentielle de la résistance entre saisons

Les loci de résistance identifiés au printemps n'ont pas été détectés à l'automne, et *vice versa*. Aussi l'analyse conjointe des deux saisons pouvait présenter le risque de "diluer" les effets des QTL identifiés à chacune des saisons de façon à les rendre indétectables par cette analyse conjointe. En revanche, un même QTL, ayant un effet trop faible au printemps et à l'automne pour pouvoir être identifié à l'une ou l'autre des saisons, aurait pu voir son effet renforcé par l'analyse conjointe des données, et de ce fait aurait pu être détecté. Comme l'ont montré nos résultats, la majorité des QTL identifiés au printemps et à l'automne ont été de nouveau détectés dans l'analyse conjointe des données. Un QTL supplémentaire a également été identifié par l'analyse conjointe des données du printemps et de l'automne.

Le pedigree n'était pas représenté exactement de manière équivalente au printemps et à l'automne du fait que seuls les parents et deux génotypes par descendance ont été testés aux deux saisons ; de plus, les effectifs par descendance n'étaient pas identiques d'une saison à l'autre. Ces différences génotypiques pourraient être une des causes de l'expression différentielle de la résistance entre le printemps et l'automne. D'autre part, il est possible que le déterminisme de la résistance à la tavelure diffère selon le stade physiologique des plantes. Nous avons déjà évoqué cette hypothèse dans le cas de la descendance 'Gala' x 'Dülmener

Rosenapfel' qui montrait également un niveau global de résistance plus élevé à l'automne qu'au printemps. Les QTL détectés étaient identiques entre les deux saisons mais il s'agissait de plants issus de semis et non de plants greffés. Aussi les variations peuvent être plus ou moins fortes selon les stades de croissance.

D'autres raisons, non spécifiques à cette étude en pedigree, pouvant être à l'origine de la différence entre le printemps et l'automne seront explicitées dans la discussion générale. De même, nous proposerons des expérimentations permettant de confirmer ou d'infirmer cette expression différentielle de la résistance à la tavelure entre les deux saisons. D'autre part, dans l'hypothèse d'une expression non différentielle entre le printemps et l'automne, nous suggérerons des expérimentations visant à gommer cette différence qui n'a pas de réalité biologique.

III-4-3-2- Biais causé par les données phénotypiques des ancêtres

Nous avons constaté que la prise en compte des données phénotypiques des ancêtres diminuait globalement la puissance de détection des QTL. Une hypothèse pourrait être une différence d'origine physiologique ou épigénétique entre la valeur propre de ces ancêtres et leur valeur en descendance. Certains des ancêtres sont en effet de très vieilles variétés ('Golden Delicious', 'Red Delicious', 'Rome Beauty', 'Jonathan', ...) qui pourraient avoir atteint un stade physiologique nettement différent de celui de leurs descendants ou avoir accumulé des méthylations de l'ADN dont une partie serait éliminée au niveau des descendants suite à l'étape d'hybridation. Une étude statistique plus approfondie pourrait être menée en considérant ou non les données phénotypiques des ancêtres mais également celles des parents, ceci sur différents jeux de données phénotypiques (données ajustées sur l'effet "Bloc" au printemps ; données ajustées sur les effets "Bloc" et "Saison" selon les deux méthodes d'ajustement).

III-4-3-3- Inoculum multi-souches

Il était trop long et trop lourd d'envisager des tests pathologiques indépendants avec des souches monoconidiales appartenant à différentes races de *V. inaequalis*. Aussi nous avons opté pour des tests avec un inoculum multi-souches. Nous posons l'hypothèse qu'un tel mélange permettrait d'identifier en priorité des QTL de résistance à large spectre d'action. D'après des résultats préliminaires de mon équipe d'accueil, nous supposons notamment que la présence d'une (ou plusieurs) souche(s) avirulente(s) n'induisait pas l'élicitation de mécanismes de défense vis-à-vis des souches virulentes. Pouvons-nous confirmer cette hypothèse ? De même, n'existeraient-ils pas des phénomènes de compétition ou au contraire

de synergie entre les souches inoculées simultanément ? Un mélange multi-souches ayant été utilisé dans nos différentes études (recherche de nouveaux loci de résistance, analyse de combinaisons génétiques contrastées), nous aborderons ces questions globalement et tenterons d'apporter des éléments de réponse dans la discussion générale.

III-4-4- Avantages et limites de l'approche en pedigree

- Avantages :

La recherche de QTL se fait ordinairement à partir d'un croisement entre deux parents (croisement simple), or les sélectionneurs travaillent habituellement plusieurs descendance issues de croisements entre des variétés plus ou moins apparentées et présentant différents caractères agronomiques d'intérêt. L'approche de cartographie en pedigree peut ainsi s'adapter aux populations d'amélioration. La recherche de QTL à partir d'un croisement simple aboutit à l'identification et l'exploitation possible d'un ou de deux allèles favorables à un QTL donné alors que le programme d'amélioration peut contenir d'autres allèles favorables non mis en évidence par ce croisement. La sélection uniquement à partir du ou des allèles identifiés dans le croisement simple peut entraîner que des génotypes potentiellement intéressants seront écartés, diminuant ainsi l'efficacité du programme de sélection et favorisant l'érosion génétique. En revanche, une population en pedigree, issue de multiples fondateurs, expose une plus grande variabilité d'origines alléliques à ce même QTL, comme nous avons pu l'observer pour les QTL détectés sur les GL1 et 17. Grâce aux marqueurs, les allèles d'un QTL peuvent être suivis le long du pedigree, il est alors possible d'identifier le(s) génotype(s) fondateur(s) portant l'(les) allèle(s) favorable(s) à un QTL donné. Dans notre étude, trois variétés sont ainsi à l'origine de la résistance apportée par le QTL du GL1 et six pour le QTL du GL17. Il est notamment possible de déterminer l'origine parentale de deux allèles marqueurs de même taille mais associés à des phénotypes différents. Tel est le cas de l'allèle à 123pb du marqueur CH01h01 lié au QTL du GL17 : cette taille d'allèle du marqueur correspond à l'allèle favorable (au QTL) transmis par 'Red Winter' mais à l'allèle défavorable de 'Golden Delicious' (à ce même QTL). Le fait de pouvoir disposer des génotypes aux marqueurs sur une grande partie du pedigree permet ainsi de suivre la transmission des allèles de génération en génération, et de calculer des probabilités d'identité par descendance' (IBD) entre deux allèles de deux descendants différents en tout point du génome. Le calcul des probabilités d'IBD est aussi implémenté dans FlexQTL™. L'approche en pedigree étant directement applicable aux populations d'amélioration, elle peut tirer partie de données de phénotypage déjà acquises et permet également de réduire le temps de valorisation des allèles favorables détectés au niveau de la création variétale. Une

approche similaire de détection de QTL au sein d'une population d'amélioration en se basant sur les IBD a ainsi été décrite et expérimentée chez le blé par Crépieux et al. (2004 et 2005).

Dans un croisement simple, l'effet d'un QTL est évalué dans un fond génétique particulier. L'effet de ce QTL dans une toute autre variété n'est donc pas prévisible du fait d'éventuelles interactions épistatiques entre ce QTL et le nouveau fond génétique. L'analyse d'une population en pedigree permet d'avoir une estimation globale de l'effet d'un QTL.

Chez une espèce hétérozygote comme le pommier, l'approche en pedigree permet d'identifier des allèles favorables aux QTL dans des configurations non détectables (homozygotie favorable) en croisement simple. Par exemple, une analyse en croisement simple des deux descendance issues du parent 'X6683' n'a pas révélé le QTL sur le GL1 (résultats non montrés) alors qu'il le fut par l'approche en pedigree. En effet, 'X6683' porte deux allèles favorables à ce QTL : l'allèle favorable à Vf (issu de *M. floribunda* #821) et l'allèle favorable transmis par 'Antonovka 34.16'. La même situation a été observée au niveau du QTL du GL17, lui aussi homozygote chez ce même parent 'X6683'.

Les relations d'apparentement entre les individus d'une population semblent compenser la perte d'informations due à un faible effectif par descendance. Or comme le soulignaient Darvasi et al. (1993), la puissance de détection des QTL dépend principalement de l'effectif ; ceci est d'autant plus vrai pour l'identification de QTL à effet modéré voire faible. Dans notre étude, lorsque l'on ne prenait pas en compte les relations d'apparentement entre les individus, aucun QTL n'était détecté sur le GL17 alors qu'il l'était dès que l'on introduisait le pedigree dans son ensemble.

- Limites :

Comme indiqué précédemment, il est important de prendre en considération la structure du pedigree afin d'optimiser le nombre de descendance et le nombre d'individus par descendance de façon à avoir une représentativité satisfaisante de chacun des fondateurs dans les descendance. Par ailleurs, un paramètre essentiel pour la puissance et la précision de la détection d'un QTL au sein d'un pedigree est le nombre de "méioses informatives" sur l'ensemble des individus génotypés disponibles. Ce paramètre est largement fonction du polymorphisme disponible aux marqueurs choisis.

D'autres limites de l'approche en pedigree relèvent plus ici du logiciel utilisé que de l'approche en pedigree proprement dite. Il s'agit d'une limite liée au modèle bi-allélique, ou encore d'une non-détection d'épistasies. Nous ne détaillerons pas ces limites étant donné qu'elles ont déjà été explicitées auparavant.

III-4-5- Caractéristiques propres aux principaux QTL détectés

En mettant de côté les craintes quant à la stabilité des QTL détectés différenciellement au printemps et à l'automne, nous pouvons relever plusieurs éléments intéressants en termes d'architecture et de fonctionnement génétiques de trois régions du génome influençant la résistance à la tavelure.

III-4-5-1- Région génomique de *Vf*...

III-4-5-1-1- Deux doses de *Vf* valent mieux qu'une !

Nous avons démontré que les individus portant deux "doses" de l'allèle favorable au gène majeur *Vf* étaient significativement plus résistants que les individus ne portant qu'une seule "dose" de cet allèle favorable. Cette différence entre des individus homozygotes *Vf-Vf* et des individus hétérozygotes *Vf-v* avait déjà été mise en évidence par Gessler et al. (1997), Kellerhals et al. (1999) et Tartarini et al. (2000) vis-à-vis de souches de *V. inaequalis* avirulentes-*Vf*. Nos résultats confortent et enrichissent ces résultats antérieurs : les individus homozygotes *Vf-Vf* sont plus résistants que les individus hétérozygotes *Vf-v* non seulement vis-à-vis de souches avirulentes-*Vf* mais également face à un inoculum en mélange où les souches virulentes-*Vf* sont largement majoritaires (3 sur 4).

La supériorité de la situation homozygote *Vf-Vf* peut aussi être mise en relation avec les résultats récents de Malnoy et al. (2008) qui ont démontré que des génotypes transformés ne portant qu'un seul paralogue du locus *Vf* (*Vfa1* ou *Vfa2*) ne montraient qu'une résistance partielle alors que les variétés résistantes sélectionnées qui portent conjointement les deux paralogues présentent un niveau de résistance plus élevé. Ces auteurs ont également montré que le niveau d'expression de l'un ou de l'autre des deux paralogues *Vfa1* ou *Vfa2* dans les différents clones transgéniques dont ils disposaient présentait une corrélation significative avec le niveau de résistance partielle observé. En s'appuyant sur ces résultats, nous pouvons avancer l'hypothèse qu'un génotype homozygote *Vf-Vf* obtenu par sélection traditionnelle pourrait ainsi présenter un niveau d'expression conjoint des deux paralogues supérieur à celui des génotypes hétérozygote *Vf-v*, et par là même conférer une résistance accrue.

III-4-5-1-2- Diversité de résistance au locus

L'analyse en pedigree a notamment mis en évidence des sources de résistance, autres que le gène *Vf* (fondateur *M. floribunda* #821), dans la région génomique du GL1 : allèles

favorables au QTL provenant des parents 'X6683' (fondateur 'Antonovka 34.16') et 'Red Winter 3177' (fondateur 'Red Winter'). La co-localisation entre le QTL détecté sur le GL1 et le gène majeur *Vf* laisserait supposer qu'ils appartiennent soit à une même série allélique soit à une famille multigénique. Dans le premier cas, les allèles favorables au QTL du GL1 issus d'"Antonovka 34.16" ou de 'Red Winter' seraient donc des allèles du gène *Vf*. Dans le second cas, il a été rapporté que *Vf* appartenait à une famille de gènes liés nommés *HcrVf* ou *Vfa* selon les équipes (Vinatzer et al. 2001 ; Xu and Korban 2002 ; Belfanti et al. 2004). Les allèles favorables du (des) gène(s) sous-jacent(s) au QTL du GL1 pourraient alors être des paralogues du gène *Vf* au sein de cette famille *HcrVf/Vfa*.

Revenons plus particulièrement sur l'allèle favorable au QTL (allèle à 138pb du marqueur CH-Vf1) provenant du parent 'X6683'. Calenge et al. (2004) avaient détecté un QTL dans la région génomique portant *Vf* chez 'TN10-8' ; l'allèle favorable du marqueur CH-Vf1 lié au QTL était également à 138pb. Or 'TN10-8' dérive de la variété 'Antonovka P.I. 172632' qui appartient au groupe des 'Antonovka' au même titre qu'"Antonovka 34.16". Ceci peut laisser supposer que les variétés 'X6683' et 'TN10-8' auraient hérité d'un allèle ancestral commun. Néanmoins, 'X6683' et 'TN10-8' faisaient tous les deux partie du pedigree étudié, or seul l'allèle de 'X6683' a été mis en évidence comme allèle favorable au QTL du GL1 mais pas l'allèle de 'TN10-8'. Le génotype fondateur 'O53T136' a transmis l'allèle favorable au QTL uniquement à 'TN10-8' qui ne l'a transmis qu'au parent 'X6417' ; ce dernier a ensuite donné naissance à deux descendance. Parallèlement, l'allèle favorable d'"Antonovka 34.16" n'a été transmis qu'à travers une seule lignée aboutissant à deux descendance. Les deux descendance issues de 'TN10-8' comptent 50 et 25 individus alors que celles issues de 'X6683' comprennent toutes les deux 50 individus. Ce moindre effectif et/ou un effet du QTL de 'TN10-8' éventuellement plus faible que celui de 'X6683' pourrai(en)t expliquer que nous n'ayons pas mis en évidence le QTL de 'TN10-8'. De fait, Calenge et al. (2004) avaient démontré que le QTL de 'TN10-8' avait un fort effet sur les souches de *V. inaequalis* bloquées par le gène majeur *Vf* mais un effet nettement moindre sur les souches contournant *Vf* ; or l'inoculum testé ici sur la population en pedigree était composé aux $\frac{3}{4}$ de souches virulentes-*Vf*.

Afin de valider l'effet des QTL détectés sur le GL1 de 'X6683' et 'Red Winter 3177', il serait intéressant d'analyser spécifiquement une descendance issue de chacun de ces parents ou de l'un de leurs apparentés. Afin d'aller plus loin et de comparer les effets de ces QTL et du gène majeur *Vf*, il faudrait croiser 'X6683' (ou l'un de ses apparentés) d'une part, et 'Red Winter' (ou l'un de ses apparentés) d'autre part, avec un génotype portant le gène *Vf*. Une étude similaire pourrait être envisagée pour comparer les effets du gène *Vf* et du QTL de 'TN10-8'. Il faut noter qu'un minimum de 150-200 individus par descendance est nécessaire

pour permettre une détection convenable des QTL. A titre d'exemple, Calenge et al. (2004) ont pu identifier le QTL du GL1 chez 'TN10-8' à partir d'une descendance composée de 149 individus alors qu'il n'a pas été possible de le détecter dans nos descendance de 25 ou 50 individus.

III-4-5-1-3- Ne jetons pas Vf!

Il a été démontré que le gène majeur *Vf* apportait une résistance contre les races 1 à 5 de *V. inaequalis* (Parisi et al. 1993), mais était contourné par les races 6 et 7 (Parisi et al. 1993 ; Roberts and Crute 1994). Le contournement de ce gène par des souches virulentes du champignon semblait remettre en cause des années d'effort de sélection. Néanmoins, Durel et al. (2000b) avaient identifié un QTL dans la région génomique de *Vf* sur le GL1, dans une descendance 'Prima' x 'Fiesta' inoculée avec une souche pathogène de race 6 (souche 302). Par contre, avec une seconde souche de race 6 (EU-D42), aucun effet QTL n'avait été détecté. L'allèle favorable au QTL détecté avec la souche 302 était en phase avec la présence de l'allèle favorable à *Vf* hérité de la variété 'Prima'. Nos travaux semblent conforter ces premiers résultats : une résistance partielle est maintenue au niveau de *Vf* avec un mélange multi-souches représentant une plus grande diversité de virulences vis-à-vis du gène *Vf* (virulences des races 6 et 7, virulence '6+7'). Mais il convient de souligner que l'effet du QTL du GL1 que nous avons identifié vient assez largement du contraste observé entre les descendants homozygotes *Vf-Vf* et les descendants hétérozygotes *Vf-v* (voir 2^{ème} paragraphe de la section III-3-2-2-1). Paradoxalement, notre étude ne fournissait aucune indication en termes de contraste entre des descendants hétérozygotes *Vf-v* et des descendants homozygotes *v-v*, puisque ces derniers ont été éliminés au stade semis. La situation n'est donc pas clarifiée entre (i) un effet résiduel du gène *Vf* (ou d'un paralogue) à l'état hétérozygote qui s'amplifierait à l'état homozygote, ou (ii) un effet résiduel de ce même locus au seul état homozygote alors qu'il resterait faible ou quasi-inexistant à l'état hétérozygote en présence de plusieurs souches virulentes-*Vf*. Depuis longtemps, il a été proposé que les gènes majeurs, une fois contournés par une souche pathogène, pouvaient conserver un effet résiduel (Pedersen and Leath 1998) ; tel fut le cas chez le pathosystème peuplier-*Melampsora larici-populina* (Dowkiw and Bastien 2007). Dans notre cas de figure, l'originalité du résultat obtenu réside dans une résistance accrue du gène majeur à l'état homozygote par rapport à l'état hétérozygote.

III-4-5-2- QTL sur le GL17 faible mais constant

Le QTL du GL17 apporte une résistance, certes modérée, mais efficace vis-à-vis d'une grande diversité de l'agent pathogène. Nos travaux sur la population en pedigree confortent non seulement nos résultats obtenus sur la descendance 'Gala' x 'Dülmener Rosenapfel' mais également des résultats antérieurs (Calenge et al. 2004 ; Liebhard et al. 2003b ; voir détails des études dans la discussion de l'article). L'ensemble de ces résultats montre la stabilité de ce QTL dans le contrôle de la résistance du pommier à la tavelure. En effet, ce QTL s'exprime dans des fonds génétiques différents, à des stades physiologiques différents (semis, greffes), dans des conditions environnementales (serre, verger) et expérimentales (tests souche par souche ou en mélange de souches) différentes. Cependant, des notations du niveau de résistance à la tavelure sur feuilles ont été réalisées sur des descendance issues de géotypes porteurs d'un QTL sur le GL17 ('Fiesta' et 'Discovery'), dans trois vergers expérimentaux répartis sur le territoire français (Villeneuve d'Ascq, Angers, Lanxade ; Rapport CTPS "Durabilité des résistances variétales à des bioagresseurs", octobre 2007). Il a été constaté que le QTL du GL17 (issu de 'Fiesta' ou 'Discovery') ne conférait aucun avantage en termes de résistance quand il était présent seul chez des descendants, ceci quelque soit le site. En revanche, associé au QTL du GL11 (issu de 'Fiesta'), le QTL du GL17 pouvait s'avérer efficace (Angers et Lanxade) ou non (Villeneuve d'Ascq). Enfin, il confortait significativement l'effet du gène majeur *Vf* lorsqu'il y était associé. En conclusion, ce QTL présente donc apparemment un intérêt très limité voire nul sur le terrain lorsqu'il est le seul facteur de résistance du géotype considéré, par contre il semble très utile à utiliser pour le combiner avec d'autres facteurs de résistance. Les sources de résistance sont multiples pour ce QTL : six variétés (fondateurs) sont à l'origine de cette résistance alors que la résistance apportée par le QTL du GL1 ne provient que de trois variétés. Nous constatons ainsi que la diversité de résistance diffère entre ces deux loci de résistance dans notre matériel d'étude. Dans l'avenir, il sera certainement utile de chercher à identifier s'il existe plus de deux allèles à ces QTL dans l'optique de n'utiliser que les plus efficaces en sélection.

III-4-5-3- QTL sur le GL11 ?

Comme montré dans le chapitre 1, 'Gala' possède un QTL de résistance à la tavelure sur le GL11, QTL hérité de la variété 'Cox'. Au regard du pedigree et en se basant sur les marqueurs les plus proches de ce QTL (CH04h02 et CH04a12), nous avons pu montrer que 'Cox' aurait également transmis ses allèles favorables à la variété 'Rubinette' (dénommée aussi 'X4930'). En outre, une autre variété connue pour porter un QTL dans cette même région génomique du GL11 appartenait au pedigree étudié : 'Prima' (Durel et al. 2003). 'Prima' était définie comme fondateur dans la population en pedigree, mais ses ancêtres

étaient connus par ailleurs (Durel et al. 1998). Se basant sur le marqueur le plus proche du pic du QTL, CH04h02, (sachant que l'allèle favorable du marqueur CH04a12 n'était pas connu), il semblerait que 'Prima' ait hérité son allèle favorable de la variété 'Rome Beauty'. En dépit de la présence de ces variétés dans le pedigree analysé, aucun QTL n'a été détecté sur le GL11 dans notre étude alors que ce QTL est considéré comme ayant un large spectre d'action (Durel et al. 2004), et de ce fait était potentiellement identifiable avec notre inoculum en mélange. Il faut cependant rappeler que Durel et al. (2003) avaient montré un effet récessif du QTL sur le GL11 dans la descendance 'Prima' x 'Fiesta'. De même, comme nous l'avons explicité dans le chapitre 1, la résistance apportée par le QTL du GL11 de 'Gala' pourrait aussi être récessive ; la même démonstration pourrait être faite pour 'Rubinette'. Suivant l'hypothèse d'une résistance récessive, celle-ci ne peut se manifester qu'en la présence simultanée de deux allèles favorables au QTL. En analysant l'ensemble du pedigree, une telle situation ne pouvait se rencontrer que dans des descendance issues de croisements entre des individus dérivant de 'Cox' et/ou de 'Rome Beauty'. Quatre croisements de ce type existaient. L'un correspondait au croisement entre 'Red Winter 3177' (dérivant de 'Prima') et 'Galarina' (dérivant de 'Gala'). L'analyse des données génotypiques a montré que 'Galarina' avait bien hérité des allèles favorables des marqueurs CH04h02 et CH04a12 de 'Gala' mais que 'Red Winter 3177' n'avait hérité d'aucun allèle de 'Prima'. Par conséquent, aucun descendant de ce croisement ne pouvait être homozygote récessif à ce QTL. Les trois autres croisements impliquaient le parent 'X3318' qui avait hérité de l'allèle défavorable du marqueur CH04h02 de 'Rome Beauty'. De nouveau, aucun descendant de ces croisements ne pouvait être homozygote récessif à ce QTL. Ceci pourrait expliquer la non-détection de QTL sur le GL11 dans la population en pedigree étudiée. Cette non-détection de QTL n'exclut cependant pas le fait que des variétés, autres que celles déjà connues, pourraient porter un QTL sur le GL11 mais dans une situation non détectable ici.

L'intérêt et l'utilisation de ces QTL en vue d'une gestion durable de la résistance du pommier à la tavelure seront explicités dans la discussion générale.

CHAPITRE 3 :

CONSTRUCTION DE GENOTYPES "PROTOTYPES"

I- INTRODUCTION

Le gène majeur *Vf*, introgressé à partir du pommier sauvage *Malus floribunda*, a été très (trop ?) largement utilisé en création variétale (Laurens 1999). A la fin des années 1980, deux nouvelles races de *Venturia inaequalis* capables de contourner ce gène sont apparues. Ces phénomènes de contournement montrent la fragilité des stratégies de sélection basées uniquement sur une résistance monogénique. Le cumul raisonné de loci de résistance majeure et/ou partielle dans un même génotype pourrait conférer une résistance à spectre plus large face à la variabilité et à l'évolution de l'agent pathogène (Gessler and Blaise 1994). Le cumul de loci ou 'gene pyramiding' peut se raisonner en fonction de : (i) type de loci (gènes majeurs ou QTL), (ii) spectre d'action des loci de résistance, (iii) complémentarité des résistances en ciblant des phases différentes du processus infectieux, (iv) complémentarité des types de reconnaissance, voies de signalisation et mécanismes de défense engagés lorsque ce type d'information est disponible (ce qui n'est généralement pas le cas). La caractérisation biologique de loci de résistance, autrement dit connaître les paramètres épidémiologiques (efficacité de l'infection, temps de latence, quantité de spores émises, ...) qu'ils contrôlent, est une méthodologie lourde à mettre en place, c'est pourquoi ce type d'études est aussi limité. En revanche, de nombreux loci de résistance majeure ou partielle ont été identifiés et cartographiés sur le génome du pommier. Le spectre de résistance vis-à-vis d'une certaine diversité de l'agent pathogène a également été précisé pour de nombreux QTL connus et pour certains gènes majeurs.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai réalisé un plan de croisements demi-diallèle 5x5 entre des géniteurs portant divers loci de résistance déjà bien caractérisés (cartographiés, spectre d'action généralement connu). Le but de ce plan de croisements était de générer un maximum de combinaisons génétiques différentes afin de disposer de "prototypes" génétiques dont la composition a été suivie à l'aide de marqueurs moléculaires. Nous avons analysé les effets cumulatifs des loci de résistance et leurs interactions au sein des différentes combinaisons génétiques et leur influence sur le niveau de résistance à la tavelure. L'analyse conjointe des données phénotypiques et génotypiques visait à initier la modélisation du niveau de résistance des génotypes en fonction des loci de résistance portés et face à la variabilité de l'agent pathogène. Ces données devaient également nous apporter des éléments de réponse sur les "règles de construction" de génotypes en vue d'une efficacité de la résistance face à la variabilité de *V. inaequalis*.

Comme pour les études précédentes, nous avons opté pour des inoculations avec un mélange de souches de *V. inaequalis* plutôt que pour des inoculations successives souche par

Tableau 1. Plan de croisements demi-diallèle entre cinq géotypes de pommier. Les loci de résistance (gènes majeurs, QTL) sont indiqués pour chacun des géotypes : les gènes majeurs sont dénommés par leur nom usuel, et les QTL par l' (les) initiale(s) du géotype suivie(s) du numéro du GL. Les croisements sont indiqués selon la nomenclature usuelle : parent femelle x parent mâle ; le croisement entre 'Dülmener Rosenapfel' et 'Russian Seedling R12740-7A' a échoué.

| | 'A10-15' <i>Vg, A1, A2, A11, A17</i> | 'Dülmener Rosenapfel' <i>Rvi14, DR6, DR17</i> | 'Fiesta' <i>F11, F17</i> | 'Russian Seedling R12740-7A' <i>Vh2, Vh4</i> | 'X6683' <i>Vf, Vg, X1, X17</i> |
|---|--|---|------------------------------------|--|--|
| 'A10-15' <i>Vg, A1, A2, A11, A17</i> | | | | | |
| 'Dülmener Rosenapfel' <i>Rvi14, DR6, DR17</i> | DRxA | | | | |
| 'Fiesta' <i>F11, F17</i> | FxA | FxDR | | | |
| 'Russian Seedling R12740-7A' <i>Vh2, Vh4</i> | RSxA | - | FxRS | | |
| 'X6683' <i>Vf, Vg, X1, X17</i> | XxA | XxDR | FxX | XxRS | |

souche. Le mélange utilisé ici représentait une plus grande diversité génétique de l'agent pathogène.

II- MATERIELS ET METHODES

II-1- Matériels végétal et fongique

Un plan de croisements demi-diallèle a été réalisé entre cinq géotypes en 2005 (Tableau 1).

Les cinq géotypes ont été sélectionnés pour leur diversité de loci de résistance (gènes majeurs et/ou QTL) par ailleurs bien caractérisés pour la plupart, c'est-à-dire cartographiés sur le génome du pommier et ayant un spectre de résistance connu :

- 'A10-15', issu du croisement 'Discovery' x 'TN10-8', porte le gène majeur *Vg* localisé sur le groupe de liaison (GL) 12 (transmis par 'Discovery'), ainsi que des QTL spécifiques sur le GL1 (allèle favorable au QTL transmis par 'TN10-8'), le GL2 (allèles favorables au QTL transmis par 'Discovery' et 'TN10-8'), et deux QTL généraux sur les GL11 et 17 (allèles favorables transmis par 'Discovery').

- 'Dülmener Rosenapfel' a été intégré à ce plan de croisements car il avait montré un fort niveau de résistance en serre et en verger (résultats du projet DARE + communication personnelle d'Andrea Peil). Il ne possédait pas de liens d'apparentement avec les autres géotypes sélectionnés, et était de ce fait une source potentielle de facteurs de résistance supplémentaires. Notre analyse de la descendance 'Gala' x 'Dülmener Rosenapfel' a permis d'identifier un gène majeur, nommé *Rvi14*, localisé sur le GL6, et deux QTL, l'un co-localisant avec *Rvi14* sur le GL6, et l'autre supposé à large spectre sur le GL17. Ces loci de résistance ont alors été ciblés dans les descendances en ségrégation issues de ce géotype. Précisons que dans l'étude du plan de croisements demi-diallèle, nous avons suivi indifféremment le gène majeur *Rvi14* et le QTL sur le GL6. Nos connaissances actuelles ne nous permettent pas de dire s'il s'agit d'un seul et même gène. Dans la suite, nous assimilerons le gène majeur et le QTL au gène majeur.

- 'Fiesta' porte des QTL généraux sur le GL11 et le GL17.
- 'Russian Seedling R12740-7A' est connu pour ses gènes majeurs *Vh2*, *Vh4* et *Vr-DW* (ce dernier gène majeur, hypothétique, n'a pas pu être suivi dans notre étude car sa localisation génomique n'est pas déterminée).

- 'X6683' a été sélectionné parce qu'il possédait le gène majeur *Vg* mais surtout le gène majeur *Vf*, gène non présent chez les autres géotypes impliqués dans le plan de croisements. 'X6683' montrait également un niveau de résistance supérieur à d'autres

Tableau 2. Caractéristiques de souches de *Venturia inaequalis* inoculées sur les descendants du plan de croisements demi-diallèle.

| Souche | Cultivar ou hybride d'origine^a | Pays | Race |
|---------------|--|-------------|-----------------------|
| 1760 | 'Judaine' | France | 7 |
| 2088 | 'Judeline' | France | 7 |
| 2199 | 'Florina' | Danemark | 6 ou 6+7 ^b |

^a Cultivars ou hybrides hôtes sur lesquels les souches ont été récoltées.

^b Souche combinant les virulences des races 6 et 7.

génotypes portant la combinaison $Vg + Vf$ (résultats du programme de création variétale apportés par François Laurens), ce qui laissait supposer l'existence d'autres facteurs de résistance. Cette résistance supplémentaire pouvait trouver son origine chez la variété 'Antonovka 34.16' (arrière-grand-père de 'X6683'), laquelle était connue pour porter une résistance de type polygénique. L'analyse de la population en pedigree a ainsi révélé que 'X6683' portait deux allèles favorables à deux QTL : celui co-localisant avec le gène Vf et celui du GL17.

Un plan diallèle consiste à croiser n génotypes deux à deux ; pour tout croisement entre deux génotypes, chaque génotype est utilisé en tant que mâle et en tant que femelle. Dans un plan demi-diallèle, tout croisement entre deux génotypes n'est réalisé que dans un seul sens, autrement dit chacun des deux génotypes est utilisé soit en mâle soit en femelle. Le choix entre parent mâle ou parent femelle s'est basé sur les différences de précocité de floraison entre les génotypes. 'Fiesta', fleurissant plus tardivement que les quatre autres génotypes, a été utilisé uniquement en tant que femelle, et inversement 'A10-15' n'a été utilisé qu'en tant que mâle du fait de sa floraison précoce. Entre ces deux génotypes "extrêmes", apparaissaient par ordre décroissant de précocité de floraison, 'Russian Seedling R12740-7A', 'Dülmener Rosenapfel' et 'X6683' ; ces trois génotypes ont alors été utilisés tantôt en tant que mâle tantôt en tant que femelle. Le plan demi-diallèle 5x5 devait aboutir à dix croisements, or le croisement 'Dülmener Rosenapfel' x 'Russian Seedling R12740-7A' n'a pas réussi pour des raisons probables d'incompatibilité gamétophytique. Les neuf autres descendances étaient représentées en moyenne par 250 individus (soit un total d'environ 2300 descendants).

Des plants témoins sensibles à la tavelure, issus d'un croisement 'Golden Delicious' x 'Granny Smith', ont été ajoutés à l'essai.

Un mélange de huit souches monoconidiales de *V. inaequalis* a été testé sur l'ensemble des descendances. Ces souches représentaient une large diversité génétique du champignon se développant sur le pommier cultivé. Cinq de ces souches ont déjà été présentées dans les études précédentes (caractéristiques indiquées dans le tableau 1 du chapitre 2) : EU-B04 et EU-NL19 (race 1), EU-D42 (race 6), 1066 (race 7), et EU-NL24 (virulences des races 6 et 7). Les trois souches monoconidiales suivantes ont complété l'inoculum : les souches monoconidiales 1760 et 2088 de race 7, et la souche monoconidiale 2199 possédant la virulence d'une race 6 ou les virulences combinées des races 6 et 7 (indétermination sur la virulence de cette souche vis-à-vis du gène majeur Vfh). Différentes caractéristiques de ces trois souches monoconidiales sont données dans le tableau 2.

II-2- Tests pathologiques

II-2-1- Elevage des plants

Les pépins issus des neuf croisements ont été recueillis suite à la récolte 2005. Ils ont ensuite été stratifiés pendant un mois et demi avant d'être semés début 2006. Après un mois de croissance, les plants ont été repotés afin de favoriser leur développement. Ces plants issus de semis ont ainsi été élevés en serre jusqu'à ce que les pousses aient atteint un stade 6-8 feuilles (soit environ un mois après le repotage), avant d'être inoculés au printemps. Après ce premier test pathologique, les plants ont continué leur croissance pendant environ deux mois puis ont été rabattus avant d'être placés en chambre froide (vernalisation) pour une durée de deux mois et demi (été 2006). A l'automne, les plants ont été repotés ; puis, après un mois de croissance, ils ont de nouveau été inoculés avec le même mélange multi-souches que celui utilisé au printemps.

II-2-2- Dispositif expérimental

Chaque génotype n'était bien évidemment représenté que par une seule copie sachant qu'il s'agissait de plants issus de semis, que ce soit les descendants du plan de croisements ou les témoins sensibles. Le dispositif expérimental était organisé en blocs complets randomisés (correspondant aux tablettes). Toutefois, il faut noter que la randomisation n'était pas strictement respectée. En effet, pour des raisons pratiques de manutention, des groupes de deux ou trois génotypes par descendance étaient disposés les uns à la suite des autres, et la succession des neuf descendances suivait un ordre constant. Néanmoins, une même descendance ne se retrouvait pas systématiquement à côté d'une autre même descendance du fait des décalages d'un rang à un autre. Toujours pour des raisons pratiques de manutention, la disposition des plants d'une saison à l'autre fut globalement conservée. Quelques modifications ont été apportées : les plants situés aux extrémités des blocs au printemps ont été intervertis avec des plants situés plus au centre ; après la sortie de la chambre froide, les plants ont été repotés dans des pots plus grands que ceux utilisés au printemps, ce qui entraîna des décalages entre les rangs.

II-2-3- Inoculations

Pour chaque test pathologique, les inocula ont de nouveau été préparés à partir de feuilles de pommier tavelées congelées selon la méthode développée par Parisi and

Tableau 3. Concentration et taux de germination des souches monoconidiales de *Venturia inaequalis* inoculées sur les descendants du plan de croisements demi-diallèle, aux deux saisons.

| Souche | PRINTEMPS | | AUTOMNE | |
|---------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | Concentration (en spores/ml) | Taux de germination (en %) | Concentration (en spores/ml) | Taux de germination (en %) |
| EU-B04 | 420000 | 72 | 395000 | 85 |
| EU-NL19 | 420000 | 75 | 420000 | 87 |
| EU-D42 | 420000 | 75 | 423000 | 79 |
| 1066 | 423000 | 91 | 420000 | 90 |
| 1760 | 398000 | 55 | 419000 | 56 |
| 2088 | 422000 | 81 | 405000 | 89 |
| EU-NL24 | 420000 | 75 | 420000 | 76 |
| 2199 | 417000 | 91 | 420000 | 88 |

Note : La concentration correspond à la concentration initiale de chacune des souches monoconidiales avant mélange.

Lespinasse (1996). Les huit suspensions monoconidiales ont d'abord été préparées séparément puis mélangées en proportions égales. La concentration finale de chacune des souches était d'environ 5.10^4 spores/ml (Tableau 3). Le taux de germination des conidies était similaire d'une saison à l'autre pour chacune des souches, et variait de 55 à 90% (Tableau 3).

Les inocula ont été pulvérisés sur les plants selon la méthode proposée par Chevalier et al. (1991). Les conditions de développement de la maladie étaient identiques à celles suivies dans les études précédentes (cf section III-2-2-3 du chapitre 2).

II-2-4- Lecture des symptômes

Deux caractères ont été notés sur feuilles : symptômes de résistance caractéristiques de gènes majeurs étudiés, et sévérité de sporulation. Les symptômes de résistance ont été notés 7 jours après inoculation puis vérifiés après un délai d'une semaine. Différents symptômes de résistance ont été distingués : dépressions cellulaires localisées en forme de têtes d'épingle ou 'pin-points' caractéristiques du gène *Vh4* (Figure 1) ; nécroses soit larges associées au gène *Vg* (Figure 1) soit en forme d'étoiles associées au gène *Vh2* (Figure 1) ; symptômes de type chlorotique localisés induits par le gène *Rvi14* (Figure 1). La sévérité de sporulation a été notée sur feuilles 14, 21 et 28 jours après inoculation. Elle a été évaluée sur la feuille la plus tavelée, selon l'échelle de Croxall (1952) (Tableau 7 du chapitre 2). Comme pour les études précédentes, la sensibilité des génotypes à la tavelure a été estimée à travers l'AUDPC, calculée à partir des sévérités de sporulation évaluées aux trois dates.

II-3- Détection des loci de résistance

II-3-1- Données phénotypiques

Les données phénotypiques ont été analysées saison par saison et descendance par descendance, selon le modèle d'analyse de variance suivant (logiciel SAS 2000) :

$$Y_{ijkb} = \mu_{ij} + G_{ijk} + B_b + \varepsilon_{ijkb} \quad [1]$$

avec Y_{ijkb} , le phénotype (AUDPC) de l'individu k de la descendance ij dans le bloc b ; μ_{ij} , la moyenne phénotypique générale de la descendance ij ; G_{ijk} , l'effet du génotype k dans la descendance ij ; B_b , l'effet du bloc (tablette) b ; et ε_{ijkb} , l'effet résiduel.

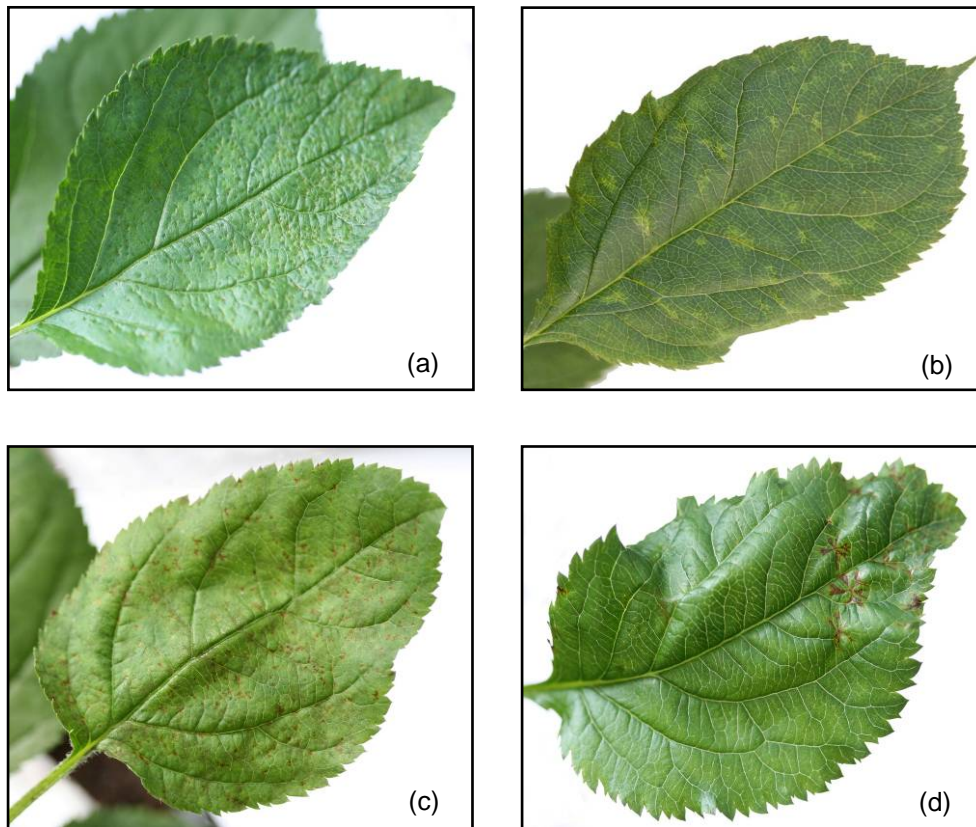


Figure 1. Symptômes de résistance du pommier à la tavelure : (a) dépressions cellulaires localisées en forme de têtes d'épingle ou 'pin-points' caractéristiques du gène *Vh4* ; (b) symptômes de type chlorotique localisés induits par le gène *Rvi14* ; (c) nécroses larges associées au gène *Vg* ; (d) nécroses en forme d'étoiles associées au gène *Vh2*.

Pour chaque descendance à chacune des saisons, les données phénotypiques individuelles ont été ajustées sur l'effet "Bloc" lorsqu'il était significatif. Ce sont ces données ajustées qui ont été utilisées pour la suite de l'étude.

Aucun ajustement entre les saisons n'a été effectué compte tenu de la divergence des données d'une saison à l'autre (voir détails dans la section "Résultats").

Nous avons calculé les aptitudes générales à la combinaison (AGC), dans un plan de croisements demi-diallèle 4x4 ('Russian Seedling R12740-7A' exclu, voir explication dans la partie "Résultats"), selon la formule suivante (Gallais 1989) :

$$g_i = 1/(p-2)Y_{i+} - 2Y_{++}/[p(p-2)] \quad [2]$$

avec g_i , l'AGC du parent i ; p , le nombre de descendance ; Y_{i+} , la somme des moyennes phénotypiques des descendance dérivant du parent i ; et Y_{++} , la somme des moyennes phénotypiques de toutes les descendance.

Les aptitudes spécifiques à la combinaison (ASC) ont été déterminées comme suit :

$$s_{ij} = Y_{ij} - g_i - g_j - \mu \quad [3]$$

avec s_{ij} , les effets d'interaction entre les apports gamétiques des parents i et j ; Y_{ij} , la moyenne phénotypique du croisement entre les parents i et j ; g_i , l'effet génétique du parent i ; g_j , l'effet génétique du parent j ; μ , la moyenne phénotypique générale des six croisements.

Les quatre parents n'étant pas représentatifs d'une population quelconque, nous ne pouvions pas utiliser un modèle d'analyse de variance à effets aléatoires ; nous n'avons donc pas cherché à estimer les variances des AGC et ASC.

II-3-2- Données génotypiques

Un génotypage ciblé de régions du génome portant les loci de résistance (gènes majeurs et QTL) ségrégeant dans les descendance a été réalisé en collaboration avec la plateforme INRA-GAP de génotypage de Clermont-Ferrand. Des marqueurs SSR ont été préférentiellement sélectionnés puisque ce sont des marqueurs codominants et hautement polymorphes. En fonction des SSR connus chez le pommier, nous avons tenté d'encadrer chaque région génomique ciblée avec deux marqueurs auxquels nous avons parfois ajouté un marqueur situé à proximité des gènes majeurs/du pic des QTL. Pour le gène majeur

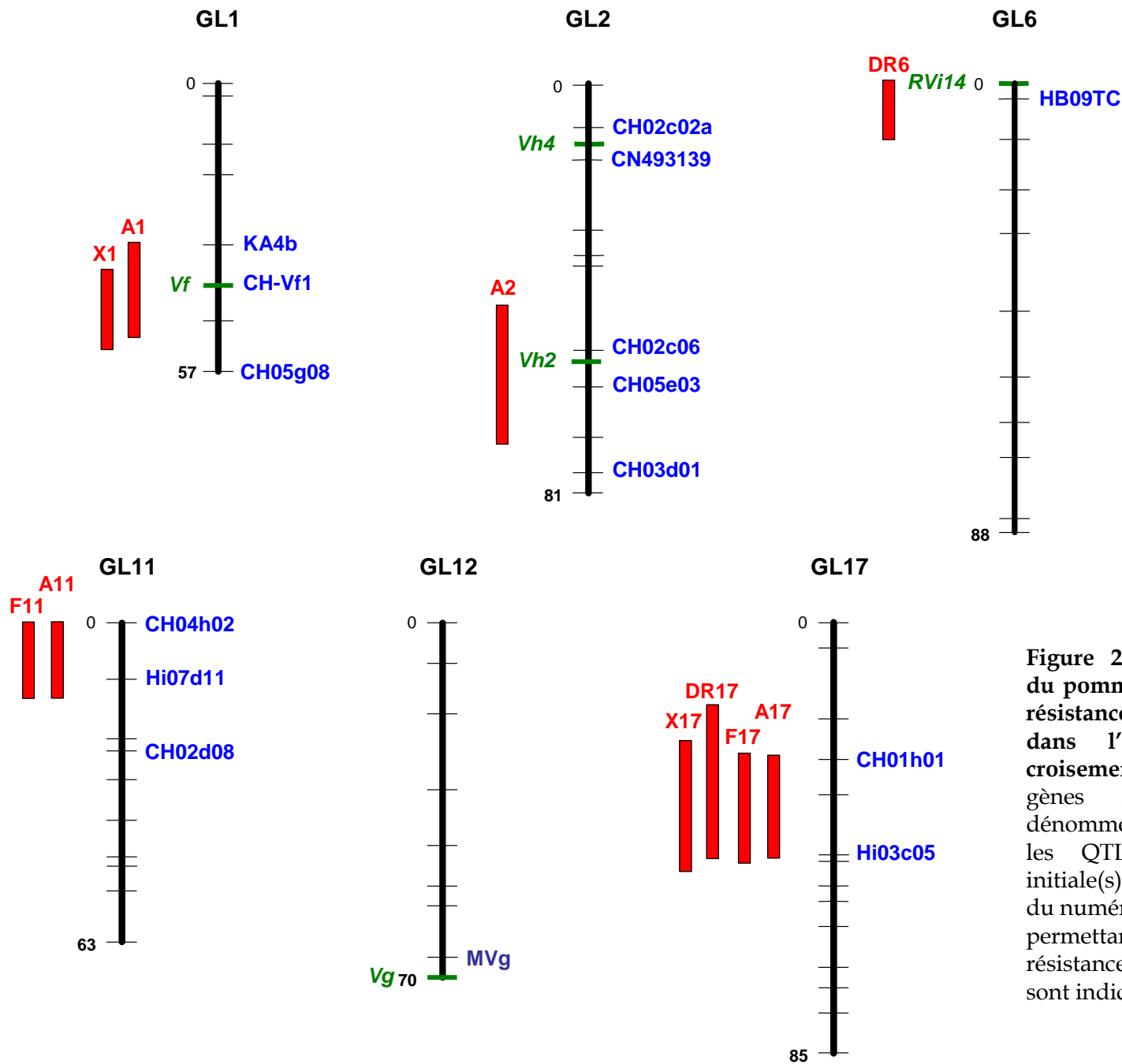


Figure 2. Régions génomiques du pommier, portant des loci de résistance à la tavelure, ciblées dans l'étude du plan de croisements demi-diallèle. Les gènes majeurs (vert) sont dénommés par leur nom usuel, et les QTL (rouge) par l'(les) initiale(s) du génotype suivie(s) du numéro du GL. Les marqueurs permettant de suivre les loci de résistance dans les descendances sont indiqués en bleu.

Rvi14 (ou QTL), un seul marqueur SSR a pu être utilisé. Le gène majeur *Vg a*, quant à lui, été suivi à l'aide d'un marqueur CAPS ('cleaved amplified polymorphic sequence') qui co-localisait avec ce gène (résultat extérieur à ma thèse : marqueur SCAR '-sequence-characterised amplified region'- MVg). L'extraction d'ADN et l'amplification par PCR-multiplex ont été réalisées comme décrit dans l'article présenté au chapitre 2 (voir section "DNA extraction and specific PCR amplification").

Les différentes régions génomiques ciblées accompagnées de leurs marqueurs sont représentées sur la figure 2. Notons que des QTL identifiés chez différents génotypes dans une même région génomique étaient assimilés à un seul et même QTL. Tous les loci de résistance à la tavelure connus n'ont pas été suivis dans le plan de croisements demi-diallele pour des raisons d'ampleur de travail. En effet, nous avons privilégié des régions génomiques portant des clusters de loci de résistance (gènes majeurs + QTL spécifiques) ou des QTL généraux. De ce fait, les QTL spécifiques connus sur le bas du GL5, sur le GL13 et le GL15 n'ont pas pu être ciblés.

Des cartes génétiques parentales (femelle et mâle considérés séparément), réduites aux marqueurs sélectionnés ci-dessus, ont été créées pour chacune des descendance afin de confirmer la position de ces marqueurs les uns par rapport aux autres chez les différents parents. Des cartes intégrées 'femelle + mâle' ont ensuite été construites pour chaque descendance. L'ensemble de ces cartes a été réalisé à l'aide du logiciel JoinMap® V3.0 (Van Ooijen and Voorrips 2001, PRI, Wageningen, The Netherlands). Un seuil de LOD de 6 a été utilisé pour définir les régions génomiques ciblées ; quelques marqueurs liés à leurs voisins avec un $LOD \leq 3$ ont été assignés à un même GL sur la base de résultats de cartographie déjà connus (en particulier la carte génétique de référence de Silfverberg-Dilworth et al. 2006).

II-3-3- Détection intra-descendance des loci de résistance

II-3-3-1- Loci additifs et dominants

La détection des loci de résistance (gènes majeurs et QTL) a été réalisée à l'aide du logiciel MapQTL® V4.0 (Van Ooijen et al. 2002, PRI, Wageningen, The Netherlands). Pour chaque descendance, les cartes parentales et la carte intégrée 'femelle + mâle' ont été exploitées. Nous avons effectué une cartographie par intervalle en modèle simple-QTL (fonction "Interval Mapping" (IM)). Puis, nous avons utilisé un modèle multi-QTL (fonction "restricted Multiple QTL Mapping"). Ce modèle permet de réaliser la cartographie par intervalle sur un GL en ajustant les données phénotypiques sur les QTL détectés sur les autres GL, en utilisant les marqueurs aux QTL comme cofacteurs. Les cofacteurs choisis

correspondaient aux marqueurs les plus proches des gènes majeurs ou des pics des QTL détectés par IM ; un marqueur par locus a été sélectionné. Le seuil de détection des loci a été fixé à un LOD de 3. Notons que pour des données phénotypiques ne suivant pas une distribution normale (cas de certaines descendances à l'automne), nous nous sommes restreints à une détection des loci par un test de Kruskal-Wallis réalisé au niveau de chaque marqueur.

Une détection globale multi-descendances des QTL n'a malheureusement pas pu être réalisée. Le logiciel MCQTL (Jourjon et al. 2005) aurait été tout à fait adapté à la recherche de QTL dans un tel demi-diallèle, mais la version 'outbred' n'était pas encore complètement opérationnelle au moment de l'analyse du plan de croisements. Le logiciel FlexQTL™ peut aussi traiter sans problème un tel plan de croisements du fait de sa grande flexibilité vis-à-vis des pedigrees traités, mais nous avons manqué de temps pour recoder les données selon le format de ce logiciel ; par ailleurs, mon laboratoire d'accueil n'avait pas encore finalisé sa position vis-à-vis de PRI-Wageningen quand à l'utilisation de ce logiciel qui n'était utilisable librement que pour traiter les données acquises dans le cadre du projet européen HiDRAS. Un projet de collaboration récent entre mon laboratoire d'accueil (+ équipe de B. Mangin, BIA de l'INRA de Toulouse) et M. Bink (PRI-Wageningen) vise justement à comparer les résultats de cartographie obtenus par MCQTL et FlexQTL™ sur un autre demi-diallèle partiel pour lequel les données de phénotypage (résistance à la tavelure en verger) et de génotypage recouvrant l'ensemble du génome sont disponibles (suite du projet de post-doc d'A. N'Diaye).

II-3-3-2- Interactions épistatiques

Pour chaque descendance, une analyse de variance multi-facteurs, à l'aide du logiciel SAS (SAS 2000), a été réalisée afin de détecter d'éventuelles interactions épistatiques entre les marqueurs liés aux loci de résistance présents chez les parents. Des interactions d'ordre 1 ont été analysées. Un seul marqueur par région génomique ciblée a été intégré dans l'ANOVA ; ce marqueur a été choisi en fonction de sa proximité avec les gènes majeurs ou le pic des QTL. Nous avons fixé un seuil de probabilité de 1.10^{-4} pour prendre en compte une interaction.

II-3-4- Probabilités de présence de l'allèle parental favorable aux gènes majeurs et QTL détectés

Nous avons calculé pour chaque individu de chaque descendance une probabilité de présence de l'allèle parental favorable (PPAF) à chaque locus de résistance ségrégeant dans

Tableau 4. Probabilité de présence de l'allèle favorable (PPAF) au locus de résistance (gène majeur ou QTL) suivi par un seul marqueur. A⁺ : allèle favorable du marqueur ; A⁻ : allèle défavorable du marqueur ; - : donnée manquante ; nd : non déterminé.

| Allèle du marqueur | Etat du locus | PPAF |
|--------------------|---------------|------|
| A ⁺ | Présent | 1 |
| A ⁻ | Absent | 0 |
| - | nd | 0,5 |

Tableau 5. Probabilité de présence de l'allèle favorable (PPAF) au locus de résistance (gène majeur ou QTL) suivi par des marqueurs flanquants. A⁺ : allèle favorable du marqueur ; A⁻ : allèle défavorable du marqueur ; - : donnée manquante ; nd : non déterminé ; r : taux de recombinaison entre les marqueurs flanquant le locus de résistance.

| Allèle du marqueur 1 | Allèle du marqueur 2 | Etat du locus | PPAF |
|----------------------|----------------------|---------------|-----------------|
| A1 ⁺ | A2 ⁺ | Présent | 1 |
| A1 ⁺ | A2 ⁻ | nd | 0,5 |
| A1 ⁻ | A2 ⁺ | nd | 0,5 |
| A1 ⁻ | A2 ⁻ | Absent | 0 |
| A1 ⁺ | - | nd | $(1-r)*1+r*0,5$ |
| A1 ⁻ | - | nd | $r*0,5+(1-r)*0$ |
| - | A2 ⁺ | nd | $(1-r)*1+r*0,5$ |
| - | A2 ⁻ | nd | $r*0,5+(1-r)*0$ |
| - | - | nd | 0,5 |

Note : Les éventuelles doubles recombinaisons entre les marqueurs n'ont pas été prises en compte.

les descendances, conditionnellement aux informations de génotypage disponibles. La présence de l'allèle favorable à un gène majeur ou QTL suivi par un seul marqueur était associée à la présence de l'allèle favorable de ce marqueur (Tableau 4). Dans le cas de gènes majeurs ou QTL encadrés par deux marqueurs, la PPAF à ces gènes majeurs ou QTL était affectée comme indiqué dans le tableau 5. Synthétiquement, si les allèles favorables des deux marqueurs flanquant un locus d'intérêt étaient présents, une PPAF de 1 était attribuée à ce locus, et inversement, une PPAF de 0 reflétait la présence des deux allèles défavorables de ces marqueurs flanquants. En outre, une recombinaison avérée entre les deux marqueurs flanquant un locus entraînait une indétermination sur la présence de l'allèle favorable au locus considéré, d'où une PPAF de 0,5 (1 chance sur 2 d'avoir l'allèle favorable au locus dans une telle situation). Lorsqu'une donnée de génotypage manquait pour l'un des deux marqueurs flanquants, un calcul de probabilité intégrant le taux de recombinaison entre les deux marqueurs permettait d'estimer la PPAF. Dans le cas extrême de données manquantes pour les deux marqueurs, une PPAF de 0,5 était attribuée.

Compte tenu des loci de résistance détectés dans les différentes descendances (voir section "Résultats"), nous avons attribué les PPAF aux loci comme indiqué ci-après. Pour le gène majeur *Vg* (issu du parent 'A10-15'), la PPAF à ce gène était considérée comme étant égale à la PPAF du marqueur MVg (marqueur étroitement lié à ce gène). De manière similaire, pour le gène majeur (ou QTL) sur GL6 (issu du parent 'Dülmener Rosenapfel'), un seul marqueur (HB09-SSR) était disponible pour suivre sa ségrégation dans les descendances, aussi la PPAF à ce gène majeur (ou QTL) était considérée comme étant égale à la PPAF de ce marqueur. Pour le QTL sur le GL11 (issu du parent 'Fiesta'), trois marqueurs avaient été sélectionnés pour suivre sa ségrégation. Il s'est avéré que le marqueur CH04h02 était le plus proche du pic du QTL dans la descendance dans laquelle il avait été détecté ; la PPAF à ce QTL a donc été associée à la PPAF de ce seul marqueur. Pour le QTL sur le GL17 (issu des parents 'Dülmener Rosenapfel', 'A10-15' et 'Fiesta'), le pic du QTL était situé entre les deux marqueurs CH01h01 et Hi03c05. La distance séparant ces deux marqueurs était nécessaire au calcul de la PPAF au QTL. CH01h01 et Hi03c05 étaient relativement peu distordus dans la descendance FxA alors qu'ils l'étaient fortement dans les descendances DRxA et FxDR (Tableau 6) ; la distance entre ces marqueurs n'a alors pu être estimée qu'à partir de la première descendance. Elle était évaluée à 10 cM, distance correspondant à celle indiquée dans la carte de référence de Silfverberg-Dilworth et al. (2006). En conséquence, la PPAF au QTL sur le GL17 a été basée sur un taux de recombinaison de 10%. Il faut souligner que, pour un locus de résistance supposé ségréger dans deux descendances, mais détecté dans une seule d'entre elles, nous avons quand même attribué des PPAF de 0 à 1 aux individus de la descendance dans laquelle ce locus n'avait pas été identifié. Tel fut le cas du QTL sur le GL11 issu de 'Fiesta', détecté dans FxA mais non dans FxDR. Pour un locus de résistance dont nous n'attendions aucune ségrégation dans une descendance donnée, nous

Tableau 6. Ségrégation des classes génotypiques des marqueurs CH01h01 et Hi03c05, liés au QTL de résistance à la tavelure du GL17, dans trois descendance de plan de croisements demi-diallèle. A : 'A10-15', DR : 'Dülmener Rosenapfel' et F : 'Fiesta'. a et b : allèles aux marqueurs chez le parent femelle ; c et d : allèles aux marqueurs chez le parent mâle ; -- : donnée manquante.

| | | ac | ad | bc | bd | -- | Chi ² | p |
|-------------|----------------|----|----|----|----|----|------------------|--------|
| DRxA | CH01h01 | 36 | 64 | 35 | 56 | 5 | 13,25 | 0,0041 |
| | Hi03c05 | 25 | 69 | 33 | 64 | 5 | 30,38 | ~0 |
| FxA | CH01h01 | 47 | 36 | 40 | 64 | 4 | 9,81 | 0,0202 |
| | Hi03c05 | 36 | 64 | 39 | 48 | 4 | 10,15 | 0,0173 |
| FxDR | CH01h01 | 70 | 64 | 79 | 64 | 9 | 2,18 | 0,5365 |
| | Hi03c05 | 99 | 43 | 94 | 41 | 9 | 43,10 | ~0 |

avons considéré que la PPAF à ce locus était nulle pour tous les individus de cette descendance.

Le grand intérêt du calcul de ces PPAF aux gènes majeurs et QTL est d'attribuer une valeur à chaque individu pour chacun des loci de résistance issus de chaque parent même s'il manque de l'information génotypique (données de génotypage manquantes). Ce calcul permet alors d'obtenir un jeu complet de probabilités pour l'ensemble des individus et l'ensemble des loci visés permettant de valoriser au mieux l'ensemble des données disponibles.

II-4- Elaboration du modèle génétique

L'analyse conjointe des données phénotypiques et des données génotypiques nous a permis d'initier l'élaboration d'un modèle génétique qui décrit le phénotype observé (niveau de sensibilité ou AUDPC) comme la somme d'une composante génétique et d'une composante résiduelle. La composante génétique se décline comme une combinaison linéaire des effets additifs des gènes majeurs et QTL ciblés à laquelle s'ajoutent les effets génétiques résiduels (effets associés au fond génétique des descendance). Le modèle génétique global s'écrit sous la forme suivante :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha Vf + \beta Vg + \dots + \kappa Q11 + \dots + \lambda Q17 + \phi_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad [4]$$

avec Y_{ijk} , la valeur phénotypique observée de l'individu k de la descendance ij ; μ , la moyenne phénotypique générale de l'ensemble des individus, tous croisements confondus ; $\alpha, \beta, \dots, \kappa, \dots, \lambda$, les effets additifs globaux des gènes majeurs et des QTL ; $Vf, Vg, \dots, Q11, \dots, Q17$, la "dose" d'allèle favorable aux loci considérés ; ϕ_{ij} , les effets génétiques résiduels de la descendance ij (croisement entre les parents i et j) ; et ε_{ijk} , l'effet résiduel.

Pour chaque individu k , la "dose" d'allèle favorable à un locus donné correspond à la PPAF dans le cas où l'allèle favorable ne peut être hérité que d'un seul parent. Lorsque l'allèle favorable peut être hérité conjointement des deux parents, la "dose" correspond à la somme de la PPAF propre à l'allèle maternel et de la PPAF propre à l'allèle paternel. La "dose" d'allèle favorable peut donc varier de 0 (homozygote 'absent/absent' avéré sur la base des marqueurs) à 2 (homozygote 'présent/présent' avéré sur la base des marqueurs). Cependant, il pouvait être nécessaire de tenir compte d'une éventuelle relation de dominance entre les deux allèles d'un même locus. En effet, une dominance complète à un locus se serait traduite par un niveau de résistance équivalent en présence d'un seul ou de deux allèles favorables dont nous aurions tenu compte en ne faisant alors varier la "dose" d'allèle favorable que de 0 à 1. Pour tester la relation d'additivité/dominance, nous avons

comparé, au sein de chaque descendance, les moyennes phénotypiques des différentes classes génotypiques (combinaisons alléliques) possibles pour un locus donné.

Ce modèle génétique a été établi en suivant les différentes étapes décrites ci-dessous.

II-4-1- Relation d'additivité/dominance aux gènes majeurs et QTL détectés

Une ANOVA a été réalisée par descendance, à l'aide du logiciel SAS (SAS 2000), afin de tester l'effet des différents loci sur le niveau de sensibilité et de comparer les différentes combinaisons alléliques possibles à de chaque locus (existence de relation d'additivité ou de dominance, dans le cas où l'allèle favorable pouvait être hérité conjointement du père et de la mère). Le modèle suivant a été utilisé :

$$Y_{ijk} = \mu_{ij} + A1 + A2 + \dots + An + \varepsilon_{ijk} \quad [5]$$

avec Y_{ijk} , la valeur phénotypique observée de l'individu k de la descendance ij ; μ_{ij} , la moyenne phénotypique de la descendance ij ; $A1, A2, \dots, An$, les effets des différents allèles ou combinaisons alléliques des n loci de résistance (gènes majeurs ou QTL) détectés dans la descendance ij ; et ε_{ijk} , l'effet résiduel.

Pour plus de simplicité, n'ont été retenus dans cette ANOVA intra-descendance que les individus qui avaient des PPAF (pour chaque allèle parental hérité) égales à 0 ou 1.

Pour chacune des descendance, une comparaison des moyennes phénotypiques (test de Student Newman-Keuls, $p = 0,05$) des différentes combinaisons alléliques a permis de préciser le déterminisme (additif/dominant) au sein des loci où un allèle favorable apparaissait être hérité conjointement des deux parents.

II-4-2- Effets additifs globaux des gènes majeurs et QTL détectés

II-4-2-1- Ajustement des données phénotypiques sur le fond génétique de chaque descendance

Préalablement à une analyse conjointe des descendance pour estimer les effets additifs globaux des loci de résistance ciblés par les marqueurs, il était nécessaire d'ajuster les valeurs phénotypiques individuelles sur l'effet moyen du fond génétique de la descendance à laquelle appartenait chaque individu. Pour cela, nous avons considéré que la

valeur moyenne d'une descendance provenait de la somme des effets de deux types de loci de résistance :

(i) les loci inconnus, soit du fait d'une situation homozygote (fixée) qui les a rendus indétectables, soit du fait d'un polymorphisme non encore détecté car trop faible ou d'origine épistatique ; ces loci étaient donc non-ciblés par le génotypage, et contribuaient au fond génétique sur lequel nous voulions réaliser l'ajustement des données individuelles ;

(iii) les loci (ségrégeant ou non) que nous cherchions à modéliser et qui avaient donc été génotypés.

Pour réaliser l'ajustement des valeurs phénotypiques individuelles au fond génétique moyen de chaque descendance, nous ne souhaitons prendre en compte que les effets des loci inconnus dans le calcul de ce fond génétique et non les effets des loci ciblés. Nous avons donc soustrait les effets de ces derniers loci du calcul de la valeur moyenne de chaque descendance de la manière suivante :

$$\mu_{ij} - \sum_{l=1}^L (f_{ij,l} * q_{ij,l}) = \phi_{ij} \quad \text{la moyenne résiduelle de la descendance } ij \text{ correspondant au fond génétique lié aux seuls loci de résistance inconnus}$$

avec μ_{ij} , la moyenne phénotypique observée de la descendance ij ; L , le nombre de loci de résistance ciblés (détectés) dans la descendance ij ; $f_{ij,l}$, la fréquence de l'allèle parental favorable à un locus de résistance l donné (gène majeur ou QTL) dans la descendance ij ; et $q_{ij,l}$, l'effet associé à cet allèle favorable (au locus l) dans la descendance ij (voir estimation de l'effet ci-dessous) : cet effet a une valeur négative puisqu'il réduit l'AUDPC (qui mesure un niveau de sensibilité).

Nous avons ensuite effectué l'ajustement des valeurs phénotypiques individuelles de la manière suivante :

$$Y_{ijk}^{aj} = Y_{ijk} - \phi_{ij} = Y_{ijk} - [\mu_{ij} - \sum_{l=1}^L (f_{ij,l} * q_{ij,l})] \quad [6]$$

avec Y_{ijk}^{aj} , la valeur phénotypique ajustée de l'individu k de la descendance ij ; Y_{ijk} , la valeur phénotypique observée de l'individu k appartenant à la descendance ij ; et ϕ_{ij} , le fond génétique de la descendance ij lié aux loci inconnus, comme défini ci-dessus.

Afin d'estimer les effets des allèles favorables ($q_{ij,l}$) aux loci de résistance de chacun des parents, une régression multiple (méthode stepwise) des valeurs phénotypiques sur les PPAF de chaque individu à chaque locus a été réalisée indépendamment pour chaque descendance (ij), selon la formule suivante :

$$Y_{ijk} = \mu_{ij} + \sum_{l=1}^L (q_{ij,l} * PPAF_{ijk,l}) + \varepsilon_{ijk} \quad [7]$$

avec Y_{ijk} , la valeur phénotypique de l'individu k (dans la descendance ij) ; μ_{ij} , la moyenne phénotypique de la descendance ij ; L , le nombre de loci de résistance ciblés dans la descendance ij ; $q_{ij,l}$, l'effet associé à l'allèle favorable au locus l dans la descendance ij ; $PPAF_{ijk,l}$, la PPAF au locus l pour l'individu k de la descendance ij . Pour un locus ségrégeant conjointement à partir des deux parents de la descendance, le terme " $(q_{ij,l} * PPAF_{ijk,l})$ " devait en plus être indexé relativement à l'origine maternelle ou paternelle de l'allèle favorable considéré.

Quelques mots sur la sélection stepwise ou pas à pas... Cette méthode consiste à faire entrer dans le modèle de régression les variables explicatives –indépendantes– (ici les PPAF aux loci de résistance) l'une après l'autre dans l'ordre de leur niveau de corrélation partielle avec la variable expliquée –dépendante– (ici le niveau de sensibilité ou AUDPC) ou avec le résidu de variable dépendante restant encore à expliquer. A chaque étape, le processus vérifie si les corrélations partielles de l'ensemble des variables déjà introduites sont encore significatives (une variable qui ne le serait plus serait rejetée). Le processus s'arrête lorsque toutes les variables explicatives sont introduites dans le modèle ou lorsque le résidu de variable dépendante restant à expliquer n'est plus corrélé significativement à aucune variable explicative non encore introduite dans le modèle. Les effets des allèles favorables aux loci de résistance ($q_{ij,l}$) correspondaient aux coefficients de régression partiels du modèle final de régression obtenu. Un même parent intervenant dans plusieurs descendance, différents effets d'un même allèle favorable à un locus de résistance de ce parent ont ainsi pu être déterminés. Ce sont ces effets qui ont été utilisés dans l'équation [6].

Il faut souligner que, pour le QTL du GL11 de 'Fiesta', un effet significatif de l'allèle favorable F11 (q_{FxA_F11}) a été détecté dans la descendance FxA, alors que l'effet du même allèle F11 (q_{FxD_F11}) était non détecté dans la descendance FxD. Pour l'ajustement des valeurs phénotypiques individuelles de la descendance FxD sur le fond génétique ϕ_{FxD} (équation [6]), nous avons cependant fait le choix d'utiliser la valeur q_{FxA_F11} de l'autre descendance FxA en remplacement de la valeur de q_{FxD_F11} , compte tenu d'une moyenne phénotypique équivalente entre ces deux descendance.

II-4-2-2- Estimation des effets additifs globaux des loci de résistance

En effectuant une analyse conjointe sur l'ensemble des descendance disponibles, les effets additifs globaux des gènes majeurs et QTL ont été estimés par la régression multiple (méthode stepwise) suivante :

$$Y_{ijk}^{aj} = o + \alpha Vf + \beta Vg + \dots + \kappa Q11 + \dots + \lambda Q17 + \varepsilon_{ijk}^{aj} \quad [8]$$

avec Y_{ijk}^{aj} , la valeur phénotypique ajustée de l'individu k de la descendance ij (déterminée par l'équation [6]) ; o, l'ordonnée à l'origine (proche de "0") ; $\alpha, \beta, \dots, \kappa, \dots, \lambda$, les effets additifs globaux des gènes majeurs et des QTL détectés ; Vf, Vg, ..., Q11, ..., Q17, la "dose" d'allèle favorable aux loci considérés ; et ε_{ijk}^{aj} , l'effet résiduel.

Remarquons que cette équation [8] est très similaire à l'équation [4] : on s'est affranchi de l'effet du fond génétique des descendance dans l'équation [8], effet qui était intégré dans l'équation [4]. Notons par ailleurs que les effets additifs globaux ($\alpha, \beta, \kappa, \lambda, \dots$) décrits ici (et dans l'équation [4]) sont analogues aux effets q_{ij-1} de l'équation [7], la différence venant du fait que ces effets sont ici estimés dans une régression multi-descendance alors qu'ils sont estimés descendance par descendance dans l'équation [7]. De même, les "doses" de l'équation [8] sont basées sur les mêmes PPAF que celles utilisées descendance par descendance dans l'équation [7].

II-4-3- Estimation des effets génétiques résiduels propres à chaque parent

Pour des raisons que nous exposerons ultérieurement, nous avons dû nous restreindre à l'analyse d'un plan demi-dialléle 3x3 (trois descendance considérées). Aussi, dans ces conditions, le nombre de descendance pris en compte n'excédant pas le nombre de parents mis en jeu, il n'était pas possible de dissocier les AGC résiduelles des ASC résiduelles (comme traité par Verhoeven et al. 2005), nous parlons alors d'effets génétiques résiduels.

L'effet génétique résiduel propre à chaque parent a été déterminé en adaptant la formule [2] :

$$g_i^{res} = 1/(p-2) \phi_{i+} - 2\phi_{++}/[p(p-2)]$$

avec g_i^{res} , l'effet génétique résiduel du parent i ; p, le nombre de descendance ; ϕ_{i+} , la somme des fonds génétiques résiduels des descendance impliquant le parent i (c'est-à-dire la somme des moyennes résiduelles des descendance correspondant aux fonds génétiques) ; et ϕ_{++} , la somme des fonds génétiques résiduels de toutes les descendance.

L'effet génétique résiduel de la descendance ij (ϕ_{ij}) correspondait à la somme des effets génétiques résiduels des parents i et j.

La formule [2] est d'ordinaire appliquée au calcul de l'AGC, or comme nous l'avons indiqué précédemment, nous ne pouvions pas distinguer l'AGC de l'ASC. Dans notre cas, l'ASC résiduelle, estimée comme la différence entre la valeur résiduelle d'un croisement $i \times j$ et sa valeur prévue sur la base de l'AGC résiduelle de ses deux parents, serait nulle quel que soit le croisement. Il n'est alors pas exclu que l'effet génétique résiduel estimé par l'équation ci-dessus comprenne en partie l'ASC résiduelle.

II-5- Comparaison de l'efficacité relative de différentes constructions de génotypes

En restant dans le cadre d'un plan de croisements demi-diallèle 3x3, une ANOVA a été réalisée sur les trois descendances (issues des trois géniteurs conservés), à l'aide du logiciel SAS (SAS 2000), afin de tester l'effet de combinaisons génotypiques contrastées sur le niveau de sensibilité, selon le modèle suivant :

$$Y_{ijk}^{aj} = \mu^{aj} + C + \varepsilon_{ijk}^{aj} \quad [9]$$

avec Y_{ijk}^{aj} , la valeur phénotypique ajustée de l'individu k de la descendance ij (déterminée par l'équation [6]) ; μ^{aj} , la moyenne phénotypique générale ajustée ; C , l'effet des combinaisons génotypiques ; et ε_{ijk}^{aj} , l'effet résiduel.

Pour cette ANOVA, n'ont été retenus que les individus qui présentaient des PPAF de valeurs entières (0 ou 1).

Une comparaison des moyennes phénotypiques (test de Student Newman-Keuls, $p = 0,05$) des différentes combinaisons génotypiques a été effectuée dans l'optique de : (i) hiérarchiser les combinaisons entre elles, et (ii) identifier d'éventuelles équivalences, en termes de niveau de résistance, entre des combinaisons génotypiques différentes.

III- RESULTATS

III-1- Analyse des données phénotypiques

III-1-1- Symptômes de résistance

III-1-1-1- Ségrégation des symptômes chlorotique et nécrotique

Les symptômes phénotypiques ont été notés au printemps puis vérifiés à l'automne.

Symptôme chlorotique associé à *Rvi14*

Le symptôme de type chlorotique associé au gène *Rvi14* était peu distordu dans la descendance FxDR ($p(X^2 \geq 5,27) = 0,0217$). La distance entre le symptôme, assimilé à un marqueur qualitatif, et le marqueur HB09-SSR (non distordu) était estimée à 2,5 cM, valeur du même ordre que celle observée au chapitre 2 dans la descendance 'Gala' x 'Dülmener Rosenapfel' (4,0 cM). En revanche, ce symptôme était fortement distordu dans les deux autres descendance où il ségrégeait (DRxA : $p(X^2 \geq 21,15) \sim 0$; XxDR : $p(X^2 \geq 40,80) \sim 0$) alors que le marqueur lié à ce gène (HB09-SSR) ne l'était pas du tout : le symptôme était tantôt préférentiellement présent (DRxA) tantôt préférentiellement absent (XxDR). Pour tenter de comprendre l'origine des distorsions de ségrégation du symptôme phénotypique, nous avons recherché d'éventuelles interactions épistatiques avec les autres loci ciblés, mais sans résultat. En effet, le symptôme phénotypique noté aurait pu être "pollué" par un symptôme phénotypique similaire généré par la présence d'un autre locus de résistance (cas de la descendance DRxA où il y a présence d'un symptôme chlorotique potentiellement lié au QTL du GL1 de 'A10-15') ou au contraire "masqué" par la présence d'un autre locus de résistance (cas de la descendance XxDR où il y a présence d'un symptôme nécrotique lié au gène *Vg* de 'X6683').

Symptôme nécrotique large associé à *Vg*

La ségrégation du symptôme nécrotique associé au gène *Vg* n'a été évaluée que dans trois descendance sur quatre car ce gène était présent chez tous les descendants XxA ('X6683' étant homozygote). Le symptôme nécrotique ségrégeait 1 : 1 ($p(X^2 \geq 1,25) = 0,2632$) dans la descendance issue, encore une fois, du parent 'Fiesta' (FxA). La distance entre le symptôme, assimilé à un marqueur qualitatif, et le marqueur MVg (non distordu) était

Tableau 7. Ségrégation du symptôme phénotypique associé au gène majeur *Vg*, dans la descendance 'Russian Seedling R12740-7A' x 'A10-15' (RSxA), en fonction du polymorphisme du marqueur CH-Vf1 chez le parent 'A10-15'. *Vg*⁺ et *vg*⁻ : allèles favorable et défavorable au gène majeur *Vg*, respectivement ; CH-Vf1⁺ et CH-Vf1⁻ : allèles favorable et défavorable au marqueur CH-Vf1, respectivement, lié au QTL de 'A10-15' hérité de 'TN10-8'. Aucune épistasie n'a été détectée entre le symptôme phénotypique et le marqueur CH-Vf1.

| | | <i>Vg</i> ⁺ | <i>vg</i> ⁻ | |
|----------|---------------------|------------------------|------------------------|----|
| 'A10-15' | CH-Vf1 ⁺ | 11 | 62 | 73 |
| | CH-Vf1 ⁻ | 9 | 67 | 76 |
| | | 20 | 129 | |

Tableau 8. Ségrégation du symptôme phénotypique associé au gène majeur *Vg*, dans la descendance 'Dülmener Rosenapfel' x 'A10-15' (DRxA), en fonction du polymorphisme du marqueur CH-Vf1 chez le parent 'A10-15'. *Vg*⁺ et *vg*⁻ : allèles favorable et défavorable au gène majeur *Vg*, respectivement ; CH-Vf1⁺ et CH-Vf1⁻ : allèles favorable et défavorable au marqueur CH-Vf1, respectivement, lié au QTL de 'A10-15' hérité de 'TN10-8'. Les nombres en rouge indiquent une ségrégation 1 : 1 ($p(X^2 \geq 0,55) = 0,4602$) du symptôme en présence de l'allèle défavorable du marqueur CH-Vf1.

| | | <i>Vg</i> ⁺ | <i>vg</i> ⁻ | |
|----------|---------------------|------------------------|------------------------|----|
| 'A10-15' | CH-Vf1 ⁺ | 16 | 53 | 69 |
| | CH-Vf1 ⁻ | 30 | 36 | 66 |
| | | 46 | 89 | |

estimée à 1,5 cM. Cette valeur est cohérente avec les résultats obtenus dans d'autres descendances où un (sur 200 individus) voire aucun recombinant entre le marqueur MVg et le symptôme n'était observé (résultats de l'équipe extérieurs à ma thèse). En revanche, une forte distorsion a été observée dans les descendances DRxA ($p(X^2 \geq 14,24) \sim 0$) et RSxA ($p(X^2 \geq 81,97) \sim 0$) en défaveur du symptôme. Aucune épistasie significative avec les autres loci ciblés n'a été mise en évidence dans la descendance RSxA (pour exemple, voir tableau 7) tandis que plusieurs ont été détectées dans la descendance DRxA. Le QTL du GL1, situé au voisinage du marqueur CH-Vf1 (Tableau 8), apporté par 'A10-15', et les QTL du GL17, situés au voisinage du marqueur CH01h01 (Tableau 9), provenant des deux parents, 'Dülmener Rosenapfel' et 'A10-15', interagissaient avec le gène *Vg*. Nous avons retrouvé une ségrégation 1 : 1 du symptôme lié au gène *Vg* en l'absence de l'allèle favorable à ces QTL.

'Fiesta' s'est ainsi révélé être le génotype permettant de visualiser au mieux les phénotypes correspondant aux différents gènes majeurs.

III-1-1-2- Cartographie génétique des gènes majeurs *Vh2* et *Vh4*

Les gènes majeurs *Vh2* et *Vh4* avaient été localisés sur le GL2 du génome du pommier, mais chez deux génotypes différents dérivant de 'Russian Seedling R12740-7A' (Bus et al. 2005a). Trois descendances issues de 'Russian Seedling R12740-7A' étaient à disposition dans notre demi-diallèle, aussi nous souhaitons les valoriser en cartographiant ces deux gènes chez leur génotype d'origine. La présence/absence de l'allèle favorable aux gènes *Vh2* et *Vh4* était associée à la présence/absence des symptômes correspondants (nécroses en forme d'étoile pour *Vh2*, et 'pin-points' pour *Vh4*).

D'après la littérature, la distance génétique entre ces deux gènes, *Vh2* et *Vh4*, était grande : elle était évaluée à 40 cM environ (Bus et al. 2005a). Hemmat et al. (2002) avaient également montré que ces deux gènes étaient épistatiques. La probabilité associée au chi² d'indépendance entre ces gènes, était inférieure au seuil de $1/10000$ quelle que soit la descendance (Tableau 10). Cela traduisait une "liaison" entre les gènes *Vh2* et *Vh4* qui pouvait correspondre à une interaction épistatique et/ou à une liaison physique entre ces gènes. L'analyse de la ségrégation de chacun de ces gènes a révélé que *Vh4* n'était pas ou peu distordu (Tableau 10) tandis que *Vh2* l'était nettement (Tableau 10) quelle que soit la descendance. Cette distorsion était en faveur de l'absence de l'allèle favorable à *Vh2*, et était accentuée en présence de l'allèle favorable à *Vh4*. Par contre, dans les sous-populations ne possédant pas l'allèle favorable à *Vh4*, nous retrouvons une ségrégation proche de 1 : 1 du gène *Vh2* pour les trois descendances (Tableau 10). Ce résultat indique une signature d'épistasie entre les gènes majeurs *Vh2* et *Vh4*, sous l'hypothèse d'une absence de distorsion

Tableau 9. Ségrégation du symptôme phénotypique associé au gène majeur Vg , dans la descendance 'Dülmener Rosenapfel' x 'A10-15' (DRxA), en fonction du polymorphisme du marqueur CH01h01 chez les parents 'A10-15' et 'Dülmener Rosenapfel'. Vg^+ et vg^- : allèles favorable et défavorable au gène majeur Vg , respectivement ; CH01h01⁺ et CH01h01⁻ : allèles favorable et défavorable au marqueur CH01h01, respectivement, lié soit au QTL de 'A10-15' hérité de 'Discovery' soit au QTL de 'Dülmener Rosenapfel'. Les nombres en rouge indiquent une ségrégation 1 : 1 ('A10-15' : $p(X^2 \geq 0,02) = 0,8908$; 'Dülmener Rosenapfel' : $p(X^2 \geq 0) = 1$) du symptôme en présence de l'allèle défavorable du marqueur CH01h01 provenant de l'un ou l'autre des parents.

| | | Vg^+ | vg^- | |
|-----------------------|----------------------|--------|--------|----|
| 'A10-15' | CH01h01 ⁺ | 30 | 59 | 89 |
| | CH01h01 ⁻ | 26 | 27 | 53 |
| | | 56 | 86 | |
| | | Vg^+ | vg^- | |
| 'Dülmener Rosenapfel' | CH01h01 ⁺ | 10 | 50 | 60 |
| | CH01h01 ⁻ | 36 | 36 | 72 |
| | | 46 | 86 | |

sur le GL portant ces gènes (absence de distorsion confirmée par la cartographie génétique des marqueurs situés sur ce groupe de liaison).

Ces deux gènes majeurs ont été cartographiés comme des caractères qualitatifs en plus des marqueurs du GL2 (logiciel JoinMap®). Pour le gène *Vh2*, seules les données des individus ne possédant pas l'allèle favorable à *Vh4* ont été prises en considération (une donnée manquante étant attribuée aux individus possédant l'allèle favorable à *Vh4*) ; pour le gène *Vh4*, aucune restriction n'a été faite. *Vh2* et *Vh4* ont ainsi pu être positionnés sur un seul et même groupe de liaison, avec un LOD supérieur ou égal à 9, pour deux descendance sur trois (FxRS et XxRS, Figure 3) ; la position de ces deux gènes était conservée pour la troisième descendance (RSxA, Figure 3) mais la jonction entre les deux parties du groupe de liaison ne s'est pas réalisée même à un LOD très faible. *Vh4* se cartographiait à environ 7 cM au-dessus du marqueur CH02c02a, en haut du groupe de liaison. Bus et al. (2005a) l'avait positionné à 5 cM en-dessous de ce même marqueur. Quant à *Vh2*, il se cartographiait entre les marqueurs CH05e03 (distant d'environ 4 cM) et CH03d01 (distant d'environ 10 cM), en bas du groupe de liaison. Bus et al. (2005a) l'avait positionné au-dessus de CH03d01 (distant de 10 ou 15 cM), et tantôt au-dessus tantôt au-dessous de CH05e03 (distant de 4 ou 10 cM).

III-1-2- Sévérité de sporulation

Comme nous pouvons le remarquer sur la figure 4, les descendance issues du parent 'Russian Seedling R12740-7A' étaient globalement très résistantes (au minimum 80% des individus) quelle que soit la saison. Aussi, nous avons préféré exclure ces descendance des analyses génétiques suivantes (cartographie de loci de résistance et élaboration du modèle génétique).

D'autre part, la figure 5 illustre une nette différence de distribution de l'AUDPC entre les deux saisons : les individus étaient en moyenne plus résistants à l'automne qu'au printemps (Tableau 11). Ceci se vérifiait d'autant plus et la distribution était d'autant plus biaisée vers la résistance pour les descendance issues du parent 'Dülmener Rosenapfel'. La corrélation entre les deux saisons était faible quelle que soit la descendance : elle variait de 0,19 à 0,43 (Tableau 11). Nous avons alors jugé préférable de traiter séparément les données du printemps et les données de l'automne, par ailleurs ajustées sur l'effet "Bloc" propre à chaque saison.

Tableau 10. Ségrégation des allèles aux gènes majeurs *Vh4* et *Vh2* dans les trois descendance issues du parent 'Russian Seedling R12740-7A' (RS). A : 'A10-15', F : 'Fiesta' et X : 'X6683'. *Vh2⁺/Vh4⁺* et *vh2⁻/vh4⁻* : allèles favorables (+) et défavorables (-) aux gènes majeurs *Vh4* et *Vh2*, respectivement.

| | <i>Vh2⁺</i> | <i>vh2⁻</i> | |
|------------------------|------------------------|------------------------|-----|
| <i>Vh4⁺</i> | 8 | 83 | 91 |
| <i>vh4⁻</i> | 32 | 51 | 83 |
| | 40 | 134 | 174 |

FxRS

| INDEPENDANCE | | HOMOGENEITE | | | | | |
|------------------|----------|--|----------|--|--------------------|------|--------|
| <i>Vh4/Vh2</i> | | <i>Vh4⁺/vh4⁻</i> | | <i>Vh2⁺/vh2⁻</i> | | | |
| Chi ² | <i>p</i> | Chi ² | <i>p</i> | Pop. entière | Ss-pop. <i>vh4</i> | | |
| Chi ² | <i>p</i> | Chi ² | <i>p</i> | Chi ² | <i>p</i> | | |
| 69,17 | ~0 | 0,37 | 0,5442 | 50,78 | ~0 | 4,35 | 0,0370 |

RSxA

| | <i>Vh2⁺</i> | <i>vh2⁻</i> | |
|------------------------|------------------------|------------------------|-----|
| <i>Vh4⁺</i> | 5 | 92 | 97 |
| <i>vh4⁻</i> | 29 | 47 | 76 |
| | 34 | 139 | 173 |

| INDEPENDANCE | | HOMOGENEITE | | | | | |
|------------------|----------|--|----------|--|--------------------|------|--------|
| <i>Vh4/Vh2</i> | | <i>Vh4⁺/vh4⁻</i> | | <i>Vh2⁺/vh2⁻</i> | | | |
| Chi ² | <i>p</i> | Chi ² | <i>p</i> | Pop. entière | Ss-pop. <i>vh4</i> | | |
| Chi ² | <i>p</i> | Chi ² | <i>p</i> | Chi ² | <i>p</i> | | |
| 93,80 | ~0 | 2,55 | 0,1103 | 31,86 | ~0 | 4,26 | 0,0389 |

XxRS

| | <i>Vh2⁺</i> | <i>vh2⁻</i> | |
|------------------------|------------------------|------------------------|-----|
| <i>Vh4⁺</i> | 2 | 102 | 104 |
| <i>vh4⁻</i> | 34 | 27 | 61 |
| | 36 | 129 | 165 |

| INDEPENDANCE | | HOMOGENEITE | | | | | |
|------------------|----------|--|----------|--|--------------------|------|--------|
| <i>Vh4/Vh2</i> | | <i>Vh4⁺/vh4⁻</i> | | <i>Vh2⁺/vh2⁻</i> | | | |
| Chi ² | <i>p</i> | Chi ² | <i>p</i> | Pop. entière | Ss-pop. <i>vh4</i> | | |
| Chi ² | <i>p</i> | Chi ² | <i>p</i> | Chi ² | <i>p</i> | | |
| 133,01 | ~0 | 11,21 | 0,0008 | 26,21 | ~0 | 0,80 | 0,3701 |

III-1-3- AGC et ASC

D'après les valeurs d'AGC calculées pour les quatre géniteurs ('Russian Seedling R12740-7A' exclu) à chacune des saisons (Tableau 12), nous pouvions classer ces géniteurs par ordre décroissant d'effet favorable sur le niveau de résistance à la tavelure : 'Dülmener Rosenapfel' > 'A10-15' > 'X6683' > 'Fiesta'. L'AGC d'un génotype caractérise la valeur en descendance de ce génotype, mais dépend des populations dans lesquelles il est étudié.

Les valeurs d'ASC et de ce fait l'ampleur des différences entre ASC étaient moindres que les valeurs d'AGC et l'ampleur des différences entre AGC (Tableau 12), ceci traduisait alors un effet faible des interactions entre les apports gamétiques des géniteurs par rapport aux effets propres des ces géniteurs. Ces observations se vérifiaient d'une saison à l'autre.

Concernant les parties suivantes sur la détection des loci de résistance et l'élaboration du modèle génétique, nous détaillerons les résultats relatifs au printemps, ceux de l'automne se limiteront, quant à eux, à l'écriture du modèle génétique.

III-2- Détection intra-descendance des loci de résistance

Les descendance issues du parent 'Russian Seedling R12740-7A' étant exclues des analyses génétiques, les gènes majeurs *Vh2* et *Vh4* étaient eux-mêmes exclus. Les loci de résistance à suivre dans les six descendance restantes étaient les suivants : le gène majeur *Vf* (issu de 'X6683') et le QTL (issu de 'A10-15' et 'X6683') sur le GL1, le QTL sur le GL2 (issu de 'A10-15'), le gène majeur (ou QTL) sur le GL6 (issu de 'Dülmener Rosenapfel'), le gène majeur *Vg* sur le GL12 (issu de 'A10-15' et 'X6683'), le QTL sur le GL11 (issu de 'A10-15' et 'Fiesta'), et le QTL sur le GL17 (issu de 'Dülmener Rosenapfel', 'A10-15', 'Fiesta', et 'X6683').

Parmi les six régions génomiques ciblées, quatre ont été détectées avec le mélange multi-souches sur l'ensemble des six descendance : GL6, GL11, GL12 et GL17 (Tableau 13). Par contre, aucun effet significatif n'a été détecté sur les GL1 et 2. L'analyse des cartes parentales a révélé des facteurs de résistance sur les GL6 et GL17 de 'Dülmener Rosenapfel' (descendance DRxA et FxDR), les GL12 et GL17 de 'A10-15' (descendance DRxA et FxA), et le GL17 de 'Fiesta' (descendance FxA et FxDR). Ces régions ont été confirmées par l'analyse des cartes intégrées 'femelle + mâle', laquelle a notamment permis d'identifier une région supplémentaire sur le GL11 dans la descendance FxA. Les facteurs de résistance ont ainsi été identifiés dans les trois descendance, DRxA, FxA et FxDR, mais aucun dans les descendance faisant intervenir le parent 'X6683'. Ce résultat sera discuté ultérieurement en lien avec les résultats obtenus au chapitre 2 avec la population en pedigree HiDRAS-INRA.

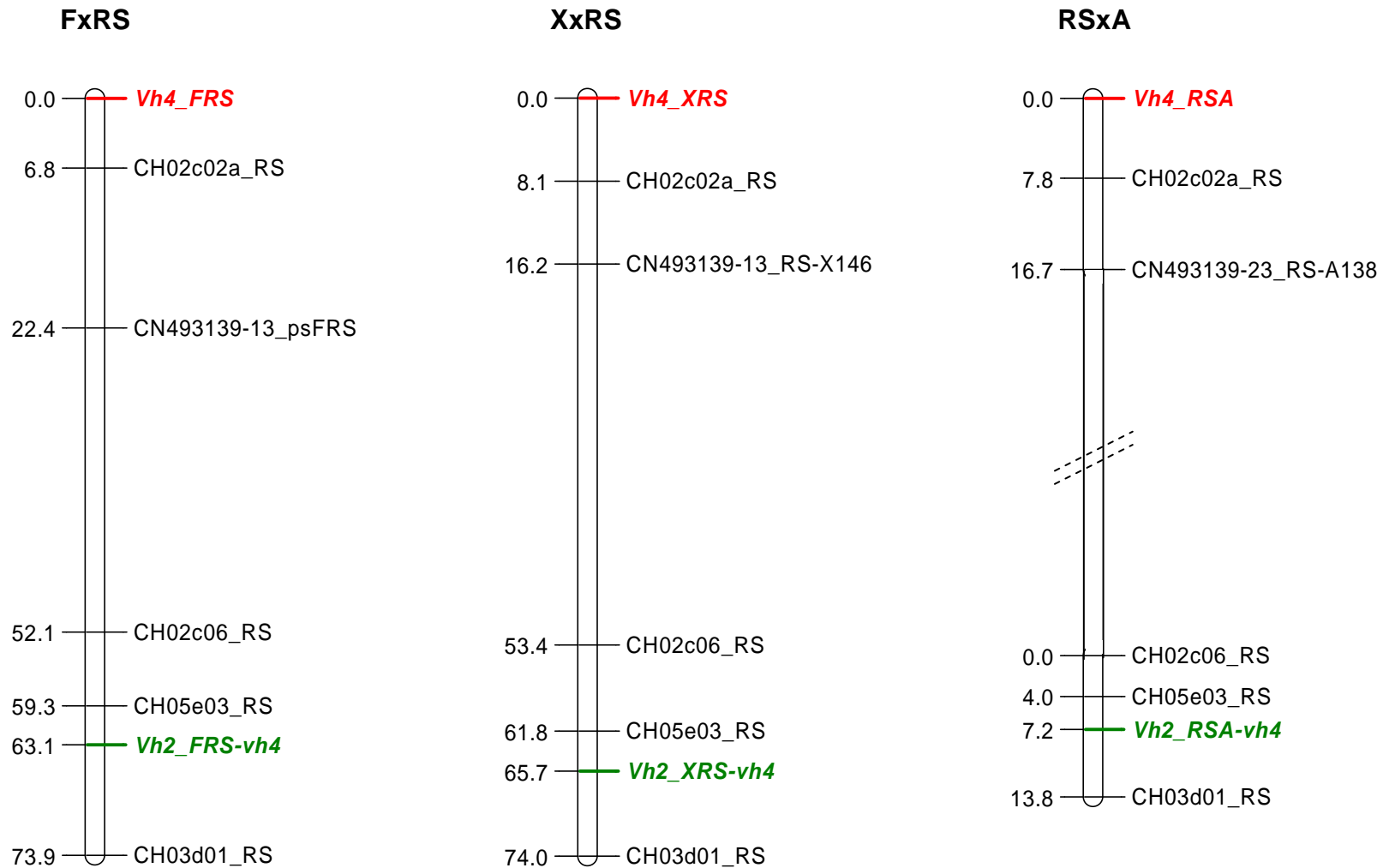


Figure 3. Cartographie génétique des gènes majeurs *Vh4* et *Vh2* sur le GL2 de 'Russian Seedling R12740-7A' (RS), pour les trois descendance issues de ce géniteur (logiciel JoinMap®). Les distances génétiques sont indiquées en cM. A : 'A10-15', F : 'Fiesta' et X : 'X6683'. Pour le gène *Vh2*, seules les données des individus ne possédant pas l'allèle favorable au gène *Vh4* ont été prises en considération ; pour le gène *Vh4*, aucune restriction n'a été faite.

L'ANOVA multi-facteurs n'a mis en évidence que quelques interactions épistatiques modérées ($0,003 < p < 0,030$) qui, de plus est, n'étaient pas répétables entre les descendance. Par exemple, une épistasie entre les loci des GL11 et 17 de 'A10-15' détectée dans la descendance DRxA n'a pas été retrouvée dans la descendance FxA.

Au vu de ces différents résultats, seules les trois descendance DRxA, FxA et FxDR ont été conservées pour l'élaboration du modèle génétique, et les effets épistatiques des loci de résistance n'ont pas été pris en compte.

III-3- Elaboration du modèle génétique

Considérant les gènes majeurs et QTL détectés avec le mélange multi-souches dans les trois descendance, le modèle génétique global était le suivant en reprenant l'équation [4] :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha Rvi14 + \beta Vg + \kappa Q11 + \lambda Q17 + \phi_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

avec Y_{ijk} , la valeur phénotypique observée de l'individu k de la descendance ij ; μ , la moyenne phénotypique générale de l'ensemble des individus, les trois croisements confondus ; α et β , κ et λ , les effets additifs globaux des gènes majeurs et des QTL détectés, respectivement ; $Rvi14$, Vg , $Q11$, et $Q17$, la "dose" des allèles favorables aux gènes majeurs ou QTL détectés ; ϕ_{ij} , les effets génétiques résiduels de la descendance ij ; et ε_{ijk} , l'effet résiduel.

III-3-1- Relation d'additivité/dominance aux gènes majeurs et QTL détectés

La première étape de l'élaboration du modèle génétique a consisté à déterminer s'il existait une relation d'additivité ou de dominance entre allèles favorables hérités conjointement de deux parents pour les différents loci de résistance ségrégeant dans l'une et/ou l'autre des trois descendance, dans les cas où cette situation pouvait apparaître.

Une PPAF a été calculée à chaque locus de résistance pour tous les individus des trois descendance. Ne prenant en compte que les individus présentant des PPAF de valeurs entières (0 ou 1), une ANOVA visant à tester, pour chacune des trois descendance, les effets des allèles et surtout des combinaisons alléliques des loci de résistance sur le niveau de sensibilité, a :

- confirmé la différence de sensibilité liée à la présence/absence des gènes majeurs $Rvi14$ (GL6) et Vg (GL12) dans les différentes descendance dans lesquelles ils étaient impliqués ;

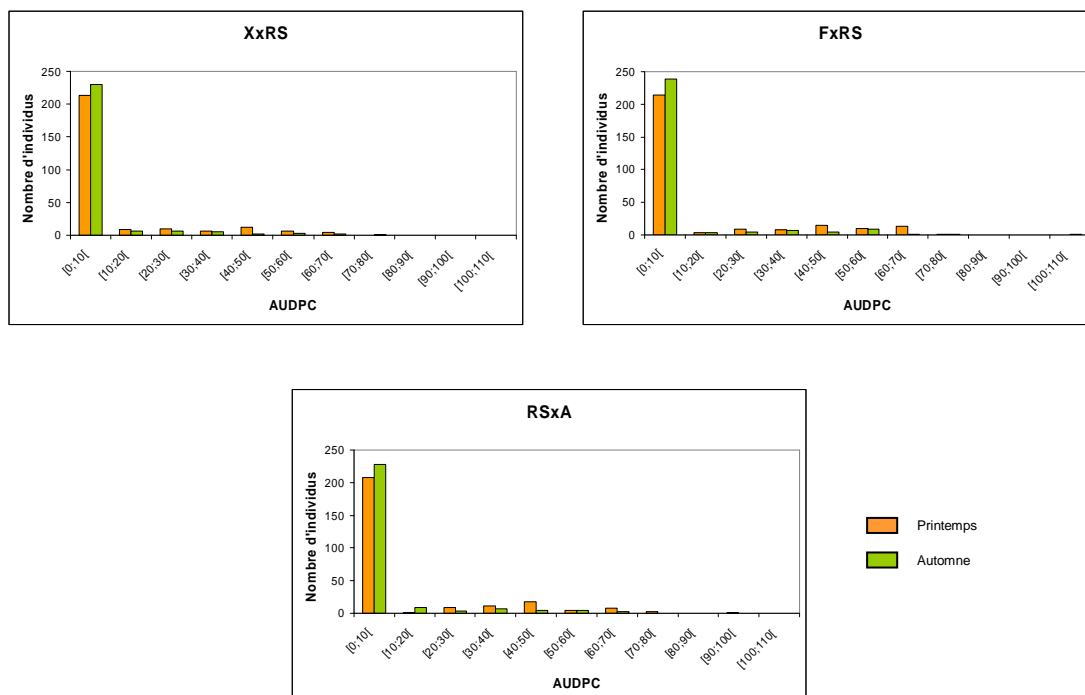


Figure 4. Distribution des données phénotypiques, aux deux saisons, des descendances issues du parent 'Russian Seedling R12740-7A' (RS). A : 'A10-15', F : 'Fiesta', et X : 'X6683'.

- mis en évidence l'effet du QTL du GL11 chez 'Fiesta', mais uniquement dans la descendance FxA et non dans la descendance FxDR ;
- révélé un effet "dose" du QTL du GL17, autrement dit les individus ayant hérité des deux allèles parentaux favorables à ce QTL étaient significativement plus résistants que ceux qui n'en portaient qu'un seul, ces individus étant eux-mêmes plus résistants que ceux possédant les deux allèles défavorables ; cette observation se vérifiait quelle que soit la descendance. Les résultats obtenus (Tableau 14) montrent que la situation était globalement additive pour les trois descendance (DRxA et FxA montrant une additivité presque parfaite, et FxDR montrant une situation de dominance partielle d'une "dose" allélique favorable par rapport à deux "doses").

La "dose" des allèles favorables aux loci de résistance à inclure dans le modèle génétique global prenait alors les valeurs "0" (absence de l'(des) allèle(s) favorable(s) au gène majeur ou QTL), "1" (présence de l'(d'un) allèle favorable au gène majeur ou QTL), ou "2" (présence des deux allèles favorables au QTL). Par exemple, pour un descendant DRxA qui possédait l'allèle favorable au gène majeur *Rvi14* (issu de 'Dülmener Rosenapfel') et l'allèle favorable de chacun des parents au QTL du GL17 (provenant pour cette descendance des parents 'Dülmener Rosenapfel' et 'A10-15'), les "doses" des différents allèles favorables étaient les suivantes : "1" pour le gène majeur *Rvi14*, "0" pour le gène majeur *Vg*, "0" pour le QTL du GL11, et "2" pour le QTL du GL17. Des "doses intermédiaires" étaient attribuées à certains individus du fait de l'incertitude sur la présence de l'allèle favorable à tel ou tel locus de résistance ($0 < \text{PPAF} < 1$). Prenons l'exemple simple d'un autre descendant DRxA qui possédait l'allèle favorable au gène majeur *Rvi14*, les allèles défavorables au QTL du GL17, et qui avait une chance sur deux de posséder l'allèle favorable lié au gène majeur *Vg* (incertitude due à une donnée manquante). Les "doses" des allèles favorables étaient alors : "1" pour le gène majeur *Rvi14*, "0,5" pour le gène majeur *Vg*, "0" pour les QTL des GL11 et 17.

III-3-2- Effets additifs globaux des gènes majeurs et QTL détectés

La deuxième étape de l'élaboration du modèle génétique consistait à estimer les effets additifs globaux des loci de résistance, c'est-à-dire les effets moyennés sur les trois descendance analysées.

Comme détaillé en "Matériels et Méthodes", afin de ne pas "polluer" les effets des loci de résistance par un effet "descendance", les valeurs phénotypiques individuelles ont été préalablement ajustées sur l'effet moyen du fond génétique de la descendance à laquelle appartenait chaque individu. Nous ne souhaitons prendre en compte que les effets des loci inconnus dans le calcul de ce fond génétique et non les effets des loci ciblés. Aussi, nous

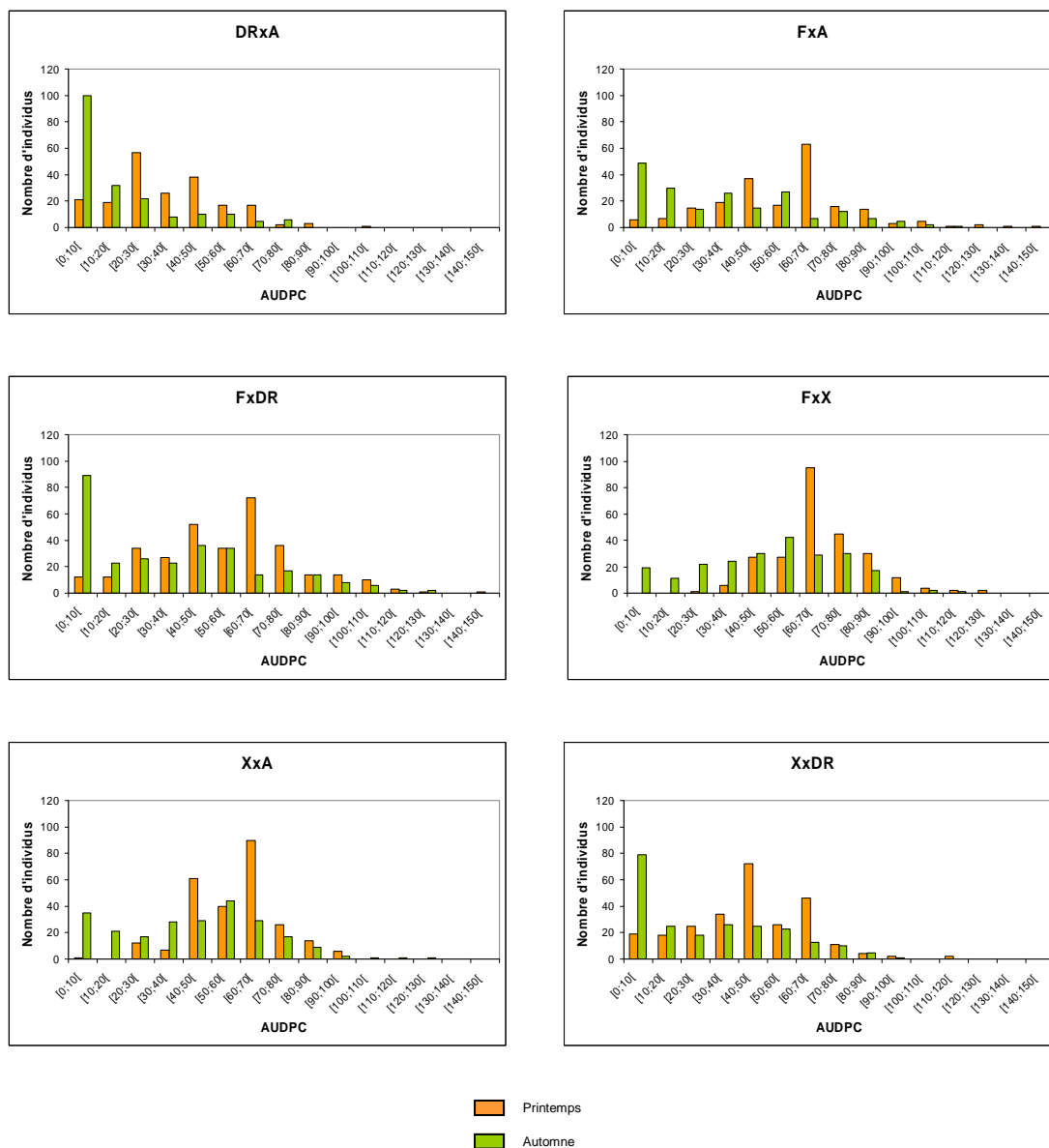


Figure 5. Distribution des données phénotypiques, aux deux saisons, des descendances issues des parents 'A10-15' (A), 'Dülmener Rosenapfel' (DR), 'Fiesta' (F) et 'X6683' (X).

avons soustrait les effets de ces derniers loci de la valeur moyenne de chaque descendance. Ces effets variaient-ils d'une descendance à l'autre ? Globalement, l'effet d'un locus parental ségrégeant dans deux descendances était similaire d'une descendance à l'autre (Tableau 15). Nous pouvions remarquer parfois des différences d'effet importantes en valeurs brutes. Mais ces différences s'estompaient si elles étaient relativisées par rapport aux moyennes phénotypiques des descendances afin de prendre en compte un probable "effet d'échelle". Le QTL du GL17 issu de 'A10-15' en est un exemple ($14,1/33,0 = 42,7\% \sim 23,2/55,4 = 41,9\%$; Tableau 15). A l'inverse, l'exemple du QTL du GL17 issu de 'Dülmener Rosenapfel' montre que des effets proches en valeurs brutes pouvaient différer en valeurs relatives (Tableau 15). Ces différences laissent supposer une éventuelle épistasie entre certains loci de résistance et le fond génétique. D'autre part, le R^2 total obtenu pour chacune des trois descendances était très similaire : il variait de 33 à 35%. Les contributions des loci de résistance à la variation phénotypique étaient difficilement comparables du fait d'un nombre variable de loci ségrégeant d'une descendance à une autre. En conclusion, le calcul du fond génétique ne prenant en compte que les effets des loci inconnus (ϕ_{ij}) a été effectué sur la base des valeurs de chaque effet ($q_{ij,1}$) propre à chaque descendance (équation [7]).

Les effets globaux des gènes majeurs et QTL ont été estimés à partir des données phénotypiques individuelles ajustées sur l'effet du fond génétique, selon la régression multiple suivante : $Y_{ijk}^{aj} = o + \alpha Rvi14 + \beta Vg + \kappa Q11 + \lambda Q17 + \varepsilon_{ijk}^{aj}$. L'ordonnée à l'origine (o) de cette régression étant proche de "0", nous avons donc jugé que l'ajustement au fond génétique était correct ; en d'autres termes, l'effet des loci inconnus et l'effet moyen des loci ciblés avaient été bien pris en compte dans chacune des descendances.

Les effets globaux obtenus se traduisaient alors par une réduction de l'AUDPC de : 14,1 et 10,5 unités pour les gènes majeurs *Rvi14* et *Vg*, respectivement ; 8,9 et 16,4 unités pour les QTL 11 et 17, respectivement (Tableau 15). Ces loci de résistance expliquaient environ 29% de la variation phénotypique totale multi-descendances. Le QTL du GL17 semblait avoir la plus forte influence sur la variation du niveau de résistance. Il faut pourtant noter que c'était le seul locus qui ségrégeait dans les trois descendances ; en effet, les autres loci ne ségrégeaient que dans deux descendances. De plus, nous avons montré un effet "dose" de ce QTL qui accentuait alors sa contribution à la variation phénotypique.

III-3-3- Effets génétiques résiduels

Les effets génétiques résiduels (g^{res}) des parents 'Dülmener Rosenapfel', 'A10-15' et 'Fiesta' étaient égaux à -10,8, -4,7, et 15,4, respectivement. Ces résultats montrent que 'Dülmener Rosenapfel' peut apporter une résistance supplémentaire ; il en est de même pour 'A10-15' mais dans une moindre mesure. Concernant 'Fiesta', il n'est pas possible d'affirmer

Tableau 11. Paramètres associés aux données phénotypiques (AUDPC), aux deux saisons, de six descendance du plan de croisements demi-diallèle. A : 'A10-15', DR : 'Dülmener Rosenapfel', F : 'Fiesta' et X : 'X6683' ; CV : coefficient de variation ; P : données phénotypiques du printemps ; A : données phénotypiques de l'automne.

| | DRxA | | FxA | | FxD | | FxD | | XxA | | XxD | |
|----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | P | A | P | A | P | A | P | A | P | A | P | A |
| Moyenne | 33,3 | 15,4 | 55,5 | 33,1 | 54,1 | 35,6 | 67,1 | 48,8 | 57,6 | 41,7 | 43,1 | 27,2 |
| CV | 0,58 | 1,34 | 0,43 | 0,84 | 0,46 | 0,89 | 0,23 | 0,50 | 0,26 | 0,62 | 0,47 | 0,90 |
| ρ^a | 0,37 | | 0,43 | | 0,41 | | 0,22 | | 0,19 | | 0,26 | |

^a La valeur du coefficient de corrélation entre les données phénotypiques du printemps et de l'automne est indiquée avec $p < 0,0001$.

Tableau 12. Valeurs des aptitudes générales à la combinaison (AGC) et des aptitudes spécifiques à la combinaison (ASC) calculées pour quatre géniteurs du plan de croisements demi-diallèle, au printemps et à l'automne.

| | 'A10-15' | | 'Dülmener Rosenapfel' | | 'Fiesta' | | | |
|-----------------------|------------|-------|-----------------------|-------|----------|-------|------------|--------|
| 'A10-15' | | | | | | | -4,46 | -5,35 |
| 'Dülmener Rosenapfel' | -1,47 | -1,53 | | | | | -12,70 | -11,35 |
| 'Fiesta' | -2,41 | -3,48 | 3,90 | 5,02 | | | 10,59 | 8,3 |
| 'X6683' | 3,90 | 5,02 | -2,41 | -3,48 | -1,47 | -1,53 | 6,57 | 8,4 |
| | ASC | | | | | | AGC | |

que toute la résistance a été explorée chez cette variété sachant que les valeurs ci-dessus ont été estimées uniquement par rapport à la moyenne générale des trois descendance étudiées ici. Des allèles favorables à des loci de résistance (additifs ou épistatiques) encore non détectés chez 'Fiesta' peuvent exister. Cette remarque souligne le fait que nous n'avons pas de "ligne de base" de sensibilité qui traduirait le niveau de sensibilité maximale qu'un génotype (extrême) porteur d'aucun allèle favorable à tous les facteurs de résistance connus ou inconnus pourrait atteindre. L'AGC résiduelle de 'Fiesta', estimée dans un plan de croisements comprenant des variétés plus sensibles que celles testées ici, pourrait donc prendre une valeur plus négative, ce qui traduirait alors l'existence d'autres facteurs de résistance non encore détectés chez cette variété.

III-3-4- Modèle génétique global

Le modèle génétique global établi à partir de l'analyse du plan de croisements demi-diallèle 3x3 au printemps s'écrivait comme suit :

$$Y_{ijk} = \mu - 14,1 * Rvi14 - 10,5 * Vg - 8,9 * Q11 - 16,4 * Q17 + \phi_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

avec Y_{ijk} , la valeur phénotypique observée de l'individu k de la descendance ij ; μ , la moyenne phénotypique générale de l'ensemble des individus, tous croisements confondus ; $Rvi14$, Vg , $Q11$, et $Q17$, la "dose" d'allèle favorable aux loci considérés ; ϕ_{ij} , les effets génétiques résiduels de la descendance ij (croisement entre les parents i et j) ; et ε_{ijk} , l'effet résiduel.

Sans chercher à rentrer dans les détails du calcul, les résultats de l'automne étaient similaires à ceux du printemps, et nous avons obtenu le modèle génétique global ci-dessous, avec un R^2 total de 22% :

$$Y_{ijk} = \mu - 10,4 * Rvi14 - 10,2 * Vg - 6,3 * Q11 - 16,6 * Q17 + \phi_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Les effets des différents loci de résistance étaient donc relativement conservés entre le modèle établi pour les données du printemps et celui établi pour les données de l'automne, malgré la plus forte résistance moyenne des descendants (en particulier ceux issus de 'Dülmener Rosenapfel') à l'automne.

Tableau 13. Paramètres associés aux QTL de résistance à la tavelure détectés par ‘restricted Multiple QTL Mapping’ (logiciel MapQTL®) dans trois descendance du plan de croisements demi-diallèle. A : ‘A10-15’, DR : ‘Dülmener Rosenapfel’ et F : ‘Fiesta’.

| | DRxA | | FxA | | FxD | |
|-------------|--|----------------|------------------------------------|----------------|------------------------------------|----------------|
| | Cartes parentales | Carte intégrée | Cartes parentales | Carte intégrée | Cartes parentales | Carte intégrée |
| GL6 | 4,2 ^a - 7,0% ^b (DR) ^c | 4,1 - 6,4% | | | 12,3 - 15,5% (DR) | 13,1 - 16,1% |
| GL11 | | | | 2,3 - 3,8% | | |
| GL12 | 4,4 - 7,2% (A) | 4,9 - 7,6% | 4,9 - 9,0% (A) | 4,9 - 8,8% | | |
| GL17 | 9,2 - 17,3% (DR) 6,7 - 13,0% (A) | 13,7 - 25,3% | 5,1 - 9,5% (F) 10,8 - 22,3% (A) | 13,9 - 31,2% | 4,7 - 7,4% (F) 9,9 - 31,2% (DR) | 15,7 - 25,0% |

^a Valeur du LOD au pic du QTL.

^b Pourcentage de variation phénotypique expliquée par le QTL.

^c Géniteur chez lequel a été détecté le QTL.

III-4- Comparaison de l'efficacité relative des différentes constructions génotypiques obtenues

Nous avons observé une hiérarchisation des combinaisons génotypiques en fonction du nombre de loci inclus : plus le nombre de facteurs de résistance augmentait, plus le niveau de résistance était élevé (Tableau 16). En ce qui concerne le QTL du GL17, nous avons considéré que la présence de deux allèles favorables à ce locus pouvait être assimilée à deux "facteurs de résistance" du fait de l'additivité des allèles constatée à ce locus.

IV- DISCUSSION

Nous ne savions pas bien comment combiner gènes majeurs (spécifiques) et/ou QTL (spécifiques ou généraux) en vue d'une efficacité optimale de la résistance du pommier à la tavelure. Dans cette partie de ma thèse, nous cherchions ainsi à initier la modélisation de la valeur de résistance des génotypes de pommier en fonction des loci de résistance portés et face à la variabilité de *Venturia inaequalis* rencontrée. Ce modèle a été basé sur l'effet de loci de résistance, estimé au sein de diverses combinaisons génotypiques et dans des fonds génétiques différents. De même, nous espérons que la comparaison de ces combinaisons génotypiques contrastées nous permettrait d'orienter le choix des loci de résistance à cumuler. Les résultats obtenus ne sont pas aussi significatifs qu'espérés. Ils nous ont néanmoins apporté des éléments de réponse à cette thématique, et ont enrichi notre réflexion sur la mise en place et l'exploitation d'éventuelles expérimentations.

IV-1- Peu de loci intégrés dans le modèle génétique

Considérant les différents loci de résistance (gènes majeurs et QTL) ciblés initialement, un certain nombre n'a pas pu être intégré au modèle génétique pour diverses raisons.

Tout d'abord, les souches contournant les gènes majeurs, *Vh2* et *Vh4*, de 'Russian Seedling R12740-7A' n'étant pas couramment testées, elles n'étaient pas en stock (feuilles tavelées congelées) et il aurait été nécessaire alors de les multiplier. Or le temps disponible avant l'inoculation n'était pas suffisant pour permettre la multiplication de ces souches, c'est pourquoi de telles souches n'ont pas été incluses dans le mélange multi-souches utilisé lors de nos tests pathologiques. Ce que l'on pouvait craindre arriva... plus des $\frac{3}{4}$ des individus de chacune des descendance issues de 'Russian Seedling R12740-7A' étaient résistants.

Tableau 14. Relation d'additivité au QTL de résistance à la tavelure du GL17 mise en évidence dans trois descendance du plan de croisements demi-diallèle. A : 'A10-15', DR : 'Dülmener Rosenapfel' et F : 'Fiesta'. Les lettres entre parenthèses traduisent le résultat d'un test de comparaison de moyennes (tests de Student Newman-Keuls) : les moyennes phénotypiques portant la même lettre ne sont pas significativement différentes à un seuil de 5%, et inversement. Les flèches indiquent les différences entre les classes génotypiques au QTL du GL17 (homozygote défavorable : "0 dose", hétérozygote : "1 dose", homozygote favorable : "2 doses").

| Descendance | "Dose" d'allèle favorable au QTL17 | Moyenne phénotypique (AUDPC) |
|-------------|------------------------------------|------------------------------|
| DRxA | 0 | 49,5 (A) |
| | 1 | 34,8 (B) |
| | 2 | 22,3 (C) |
| FxA | 0 | 73,6 (A) |
| | 1 | 57,5 (B) |
| | 2 | 36,5 (C) |
| FxD R | 0 | 66,7 (A) |
| | 1 | 55,3 (B) |
| | 2 | 32,6 (C) |

Aussi il restait trop peu d'individus par descendance pour permettre une détection de loci satisfaisante (résultats non montrés). De ce fait, les trois descendances issues de ce parent 'Russian Seedling R12740-7A', et par là même les gènes majeurs *Vh2* et *Vh4*, ont été exclus du modèle génétique.

Le QTL du GL1 transmis par 'A10-15' (l'ayant lui-même hérité de 'TN10-8') n'a été détecté dans aucune descendance impliquant ce géotype. Dans une descendance 'Discovery' x 'TN10-8', Calenge et al. (2004) avaient pourtant montré que ce QTL, issu de 'TN10-8', avait un effet fort vis-à-vis des souches avirulentes-*Vf* mais un effet faible voire inexistant face à des souches virulentes-*Vf*. Or le mélange multi-souches inoculé sur les descendants du plan de croisements demi-diallèle contenait une majorité ($6/8$) de souches virulentes-*Vf*. Cela nous amène à penser que ce QTL est inefficace face à tant de souches virulentes-*Vf*. Ce résultat conforte le résultat de l'analyse de la population en pedigree (voir chapitre 2) qui montrait que l'allèle favorable au QTL du GL1 apporté par 'TN10-8' n'était pas efficace face à un mélange de quatre souches conservant la même proportion souches virulentes-*Vf*(3)/souches avirulentes-*Vf*(1). Cette région génomique du GL1 n'a ainsi pas été intégrée dans le modèle génétique, d'autant que le locus de résistance présent dans cette région chez 'X6683' n'a pas pu être mis en évidence (détaillé plus loin).

Un autre QTL hérité de 'Discovery' et transmis par 'A10-15', le QTL du GL11, n'a pas montré d'effet face au mélange de huit souches. Ce QTL avait été identifié dans une descendance 'Fiesta' x 'Discovery' en conditions en champ (Liebhard et al. 2003b), mais il n'avait déjà pas été retrouvé en conditions en serre dans une descendance 'Discovery' x 'TN10-8' (Calenge et al. 2004). Cette différence d'efficacité de ce QTL peut s'expliquer comme suit : (i) les conditions en serre et en champ sont différentes en termes de conditions environnementales et d'âge physiologique des plants, et ce d'autant plus que les plants testés ici étaient issus de semis ; (ii) l'inoculum rencontré au champ était différent du mélange multi-souches utilisé ici. Une autre raison de la présence/absence de ce QTL selon le fond génétique pourrait aussi provenir de son déterminisme génétique potentiellement récessif (voir chapitre 2, section II-2-4). Les différentes informations dont dispose l'équipe sur ce déterminisme récessif ne sont cependant pas toujours concordantes, en particulier entre stade semis et stade greffé. Ce QTL du GL11 issu de 'A10-15' n'a alors pas pu être intégré au modèle génétique, toutefois cette région génomique du GL11 porteuse d'une résistance n'a pas été complètement exclue puisque 'Fiesta' portait également un QTL de résistance dans cette région du GL11.

'A10-15' avait également été identifié comme un géotype portant deux allèles favorables au QTL du GL2, mais allèles qui présentaient des spécificités de souches différentes (Calenge et al. 2004). Il aurait alors été possible que les effets de ces deux allèles ne soient pas équivalents face au mélange multi-souches utilisé, et donc qu'un QTL soit

Tableau 15. Effets et contributions à la variation phénotypique (estimés par régression) des loci de résistance à la tavelure détectés dans trois descendance du plan de croisements demi-diallèle. Les gènes majeurs sont dénommés par leur nom usuel, et les QTL par l'(les) initiale(s) du parent suivie(s) du numéro du GL. A : 'A10-15', DR : 'Dülmener Rosenapfel' et F : 'Fiesta' ; nd : non déterminé.

| | | Moyenne phénotypique (AUDPC) | <i>Rvi14</i> | <i>Vg</i> | F11 | A17 | DR17 | F17 | <i>R</i> ² total |
|-----------------|------|------------------------------|--|--------------------|-------------------|-------------------------|---------------------|--------------------|-----------------------------|
| PAR DESCENDANCE | DRxA | 33,0 | -10,9 ±2,3 ^a 7,7% ^b | -10,4 ±2,3 7,0% | - | -14,1 ±2,6 8,9% | -16,2 ±2,4 9,8% | - | 33,5% |
| | FxA | 55,4 | - | -13,9 ±2,9 8,2% | -9,4 ±2,9 3,7% | -23,2 ±3,1 15,2% | - | -14,1 ±3,1 8,0% | 35,1% |
| | FxDR | 53,5 | -20,0 ±2,5 15,3% | - | nd | - | -20,2 ±2,8 12,3% | -13,3 ±2,8 5,3% | 32,8% |
| GLOBAL | | | -14,1 ±1,6 5,0% | -10,5 ±1,7 3,2% | -8,9 ±1,6 3,3% | ← -16,4 ±1,2 17,7% → | | 29,2% | |

^a Effet phénotypique du locus ± écart-type.

^b Contribution du locus à la variation phénotypique.

délectable dans cette région génomique dans les descendance issues de ce parent 'A10-15'. Mais ce ne fut pas le cas, aucun QTL n'a été identifié dans cette région génomique quelle que soit la descendance. Aussi nous pouvons supposer soit que les effets de ces deux allèles étaient globalement équivalents (absence de contraste), soit que ces deux allèles n'étaient plus efficaces ni l'un ni l'autre face à ce mélange de souches. Ce locus de résistance n'a ainsi pas pu être intégré dans le modèle génétique.

Rappelons que le génotype 'X6683' avait été sélectionné pour faire partie du plan de croisements demi-diallèle car il possédait le gène majeur *Vg* mais surtout le gène majeur *Vf*, gène non présent chez les autres génotypes impliqués dans ce plan de croisements. 'X6683' montrait également un niveau de résistance supérieur à d'autres génotypes porteurs de la combinaison *Vg* + *Vf*, ce qui suggérait la présence d'autres loci de résistance. 'X6683' possédait bien d'autres loci de résistance mais dans une configuration telle qu'ils ne furent pas détectables et exploitables dans le plan de croisements. L'analyse de la population en pedigree (voir section III du chapitre 2) a ainsi révélé que 'X6683' possédait deux allèles favorables au QTL du GL17, ceci face à un mélange de quatre souches de *V. inaequalis*. Le logiciel FlexQTL™ fonctionne en modèle bi-allélique, et ne permet donc pas de hiérarchiser les deux allèles favorables à un même locus. Toutefois, comme indiqué dans le chapitre précédent, un paramétrage particulier de ce logiciel permet vraisemblablement de pallier ce problème. Dans l'étude du plan de croisements demi-diallèle, un éventuel contraste entre les deux allèles au QTL du GL17 de 'X6683' aurait dû être mis en évidence s'il avait existé, compte tenu des effectifs importants par descendance issue de ce génotype (environ 250 individus par descendance). Or aucun QTL n'a été détecté chez ce dernier quelle que soit la descendance. Ces résultats tendent donc à confirmer que les effets des deux allèles favorables au QTL17 de 'X6683' sont équivalents. Aucun QTL n'était détectable en croisement simple, ce qui souligne à nouveau l'intérêt de l'approche en pedigree développée au chapitre 2 pour clarifier de telle situation chez une espèce auto-incompatible comme le pommier. Il ne faut bien évidemment pas oublier que la population en pedigree a été inoculée avec un mélange de quatre souches alors que les descendants du plan croisements demi-diallèle l'ont été avec un mélange de huit souches. Il n'en reste pas moins que les mêmes races pathogènes étaient représentées dans chacun de ces inocula, la différence reposait sur le nombre de souches testées par race. En outre, le QTL du GL17 est connu pour avoir un large spectre d'action, et être efficace dans des fonds génétiques et à des stades physiologiques différents. Nous pouvons donc raisonnablement proposer que les deux allèles favorables au QTL du GL17 de 'X6683' avaient un effet équivalent face au mélange de huit souches utilisé. Afin de confirmer cette hypothèse, il faudrait renouveler le test pathologique sur les descendants issus de 'X6683' en inoculant les souches séparément et non plus en mélange, puis rechercher un éventuel QTL sur le GL17. Ce QTL du GL17 de 'X6683' n'a pas pu être intégré au modèle

Tableau 16. Comparaison de l'efficacité des combinaisons génotypiques par un test de Student Newman-Keuls (SNK). Les combinaisons génotypiques portant la même lettre ne sont pas significativement différentes à un seuil de 5%, et inversement. Les gènes majeurs sont dénommés par leur nom usuel (*Rvi14* et *Vg*), et les QTL par la lettre "Q" suivie du numéro du groupe de liaison (GL) ; une "simple dose" d'allèle favorable au QTL du GL17 est indiquée par un "s" et une "double dose" par un "d".

| Regroupement SNK | | | | Moyenne phénotypique* | Effectif | Combinaisons génotypiques | Nombre de facteurs de résistance |
|------------------|---|---|---|-----------------------|----------|---------------------------|----------------------------------|
| | A | | | 3,5 | 26 | Q11 | 0-1 |
| | A | | | 2,0 | 19 | 0 | |
| | B | | | -13,8 | 14 | Vg | 1 (1-2) |
| C | B | | | -18,5 | 53 | Q17s | |
| C | B | | | -20,5 | 44 | Q11_Q17s | |
| C | B | D | | -25,8 | 19 | Rvi14 | |
| C | B | D | | -28,1 | 6 | Rvi14_Vg | |
| C | B | D | | -29,9 | 41 | Vg_Q17s | 2 |
| C | B | D | | -30,0 | 45 | Rvi14_Q17s | |
| C | B | D | | -30,5 | 10 | Q11_Vg | |
| C | E | B | D | -33,1 | 31 | Q17d | |
| C | E | B | D | -33,2 | 18 | Rvi14_Q11 | |
| C | E | | D | -35,4 | 22 | Rvi14_Vg_Q17s | 3 |
| C | E | | D | -38,8 | 19 | Rvi14_Q11_Q17s | |
| | E | | D | -41,6 | 28 | Q11_Vg_Q17s | |
| | E | | D | -42,5 | 14 | Vg_Q17d | |
| | E | | D | -45,0 | 14 | Rvi14_Q17d | |
| | E | | D | -46,7 | 10 | Rvi14_Vg_Q17d | 4 (3-4) |
| | E | F | | -52,1 | 24 | Q11_Q17d | |
| G | | F | | -64,6 | 9 | Q11_Vg_Q17d | |
| G | | F | | -69,5 | 5 | Rvi14_Q11_Q17d | |

* Moyenne phénotypique ajustée sur le fond génétique de chaque descendance.

génétique ; toutefois, 'A10-15', 'Dülmener Rosenapfel' et 'Fiesta' possédaient également un QTL dans cette région génomique du GL17, aussi nous avons pu évaluer l'effet de cette région génomique sur le niveau de résistance.

Un raisonnement similaire peut être fait pour le QTL du GL1 pour lequel il a été montré, au chapitre 2, que 'X6683' possédait également deux allèles favorables face au mélange de quatre souches utilisé. Ce géotype possédait l'allèle favorable au gène majeur *Vf* et un allèle favorable hérité de la variété 'Antonovka 34.16' à un QTL co-localisant avec ce gène. Face au mélange de huit souches inoculé sur les descendants du plan de croisements demi-diallèle, aucun QTL n'a été détecté dans l'une ou l'autre des descendance impliquant le géotype 'X6683'. Ces résultats concordent à nouveau avec l'hypothèse de l'existence de deux allèles favorables ayant un effet équivalent à ce QTL. Cette région génomique du GL1 a donc dû être définitivement exclue du modèle génétique.

Enfin, 'X6683' s'est révélé porter le gène majeur *Vg* à l'état homozygote, ce qui rendit ce gène indétectable en descendance. L'effet de ce gène sur le niveau de résistance a néanmoins pu être évalué étant donné qu'il était également présent chez le géotype 'A10-15', à l'état hétérozygote cette fois-ci.

En définitive, cinq géniteurs avaient été sélectionnés pour ce projet : on ciblait 14 facteurs de résistance (gènes majeurs et QTL) répartis sur six régions génomiques. Le modèle génétique n'a pourtant pu intégrer que six facteurs, localisés sur quatre régions du génome et provenant de trois géniteurs.

IV-2- Caractéristiques propres aux loci de résistance détectés

IV-2-1- *Vg* : un gène majeur non laminé face à un mélange multi-souches

Le gène majeur *Vg*, transmis par le géniteur 'A10-15', a montré un effet significatif sur le niveau de résistance dans les descendance dans lesquelles il ségrégeait (DRxA et FxA). Comment expliquer qu'un gène majeur soit efficace face à un mélange de souches avirulentes et virulentes vis-à-vis de ce gène ? Si nous posons l'hypothèse d'une homogénéité d'agressivité entre toutes les souches contenues dans le mélange (ce qui n'est potentiellement pas juste), nous pouvons formuler le raisonnement suivant. Sur les huit souches inoculées, seules trois étaient avirulentes-*Vg*. Pour chacune des deux descendance ségrégeant pour le gène *Vg*, nous avons constaté que la moyenne phénotypique des individus portant l'allèle favorable au gène *Vg* était supérieure à la moyenne calculée en se basant sur la proportion de souches effectivement capables de se développer sur ces individus-*Vg* compte tenu de la proportion "souches virulentes-*Vg*/souches avirulentes-*Vg*"

Tableau 17. Moyennes phénotypiques (AUDPC) des descendance du plan de croisements demi-diallèle ségrégeant pour le gène majeur Vg . Vg^+ et vg^- : allèles favorable et défavorable au gène majeur Vg , respectivement. A : 'A10-15', DR : 'Dülmener Rosenapfel', et F : 'Fiesta'.

| | vg^- | Vg^+ | |
|-------------|----------|----------|-----------|
| | Observée | Observée | Attendue* |
| DRxA | 37,1 | 28,2 | 23,2 |
| FxA | 62,0 | 49,7 | 38,8 |

* Moyenne calculée en se basant sur la proportion "souches virulentes- Vg /souches avirulentes- Vg " (5/3) du mélange inoculé.

(Tableau 17). Cela laisse supposer qu'il n'existait pas de phénomène d'élicitation des défenses par les souches avirulentes-*Vg* car, dans ce cas, la moyenne phénotypique des individus portant l'allèle favorable à *Vg* aurait même dû être inférieure à la moyenne calculée. D'après ces mêmes observations sur les moyennes phénotypiques, nous aurions tendance à éliminer l'hypothèse d'un effet résiduel du gène *Vg* sur les souches virulentes-*Vg*. Cette idée est confortée par des études antérieures, menées sur des génotypes porteurs de *Vg*, qui n'ont révélé aucun effet résiduel potentiel de ce gène vis-à-vis de souches virulentes-*Vg*. Calenge et al. (2004) ont ainsi inoculé séparément huit souches virulentes-*Vg* (dont les souches EU-B04 de race 1, EU-D42 de race 6, et EU-NL24 possédant les virulences des races 6 et 7) sur une descendance 'Discovery' (porteur de *Vg*) x 'TN10-8', et n'ont mis en évidence aucun QTL dans la région génomique du GL12 portant *Vg*, et ce quelle que soit la souche. Durel et al. (2003) ont fait le même constat après inoculation de trois souches virulentes-*Vg* (dont la souche EU-D42 de race 6) sur une descendance 'Prima' (porteur de *Vg*) x 'Fiesta'. Aussi, nous suggérons un effet de filtration de l'allèle favorable au gène *Vg* sur les souches virulentes-*Vg* qui se serait traduit par une moindre sensibilité des individus portant l'allèle favorable à *Vg* par rapport à ceux portant l'allèle défavorable à ce même gène. En outre, cette filtration exercée par le gène *Vg* aurait pu être considérée comme totale si la valeur de la moyenne phénotypique observée avait été égale à la valeur calculée, or elle y était inférieure. Nous pouvons alors évoquer une éventuelle compensation, en termes de sporulation, des souches virulentes-*Vg* en l'absence des souches avirulentes-*Vg* qui étaient bloquées par le gène *Vg*.

Nous avons vu ici qu'un mélange composé aux $\frac{3}{8}$ de souches avirulentes-*Vg* permettait de mettre en évidence un effet du gène majeur *Vg*. Il serait intéressant de tester s'il existe une proportion minimale "souches avirulentes-*Vg*/souches virulentes-*Vg*" au-delà de laquelle l'effet de filtration du gène *Vg* n'est plus détectable. Il faudrait alors réaliser des tests pathologiques en diminuant cette proportion "souches avirulentes-*Vg*/souches virulentes-*Vg*" dans les mélanges multi-souches.

Comme indiqué précédemment, aucun effet du gène majeur *Vg* n'a été décelé dans les descendance issues de 'X6683' et notamment la descendance XxA. Cette dernière aurait permis de révéler un effet "dose" du gène *Vg*, s'il avait existé, puisque 'X6683' était homozygote et 'A10-15' hétérozygote pour ce gène. Nous constatons alors que, contrairement au gène majeur *Vf* (effet "dose" démontré dans l'analyse de la population en pedigree, voir chapitre 2), le gène majeur *Vg* a le même effet qu'il soit à l'état hétérozygote ou homozygote, du moins face au mélange de huit souches utilisé ici. Cela pourrait éventuellement être le reflet d'un mécanisme moléculaire sous-jacent différent entre le gène *Vg* et le gène *Vf*. En effet, le gène *Vf* confère un symptôme de type chlorotique, et est de type récepteur extra-cellulaire comme le gène *Cf* de la tomate (Vinatzer et al. 2001 ; Belfanti et al. 2004), alors que le gène *Vg* confère un symptôme de type nécrotique large, et est situé au

voisinage d'un marqueur de type NBS-LRR (Calenge et al. 2005a). Une étude de l'effet "simple dose/double dose" de l'allèle favorable aux différents gènes majeurs disponibles chez le pommier serait extrêmement intéressante à étendre (par exemple sur les gènes *Rvi14* et *Vh2* qui sont respectivement de type chlorotique et nécrotique) pour renforcer ou contredire les résultats observés au cours de ma thèse.

IV-2-2- Locus sur le GL6 : effet de filtration ou résistance à large spectre ?

Comme indiqué dans le chapitre 2, nous ne sommes actuellement pas en mesure de dire si le QTL détecté dans la région génomique du gène majeur *Rvi14* correspond à un effet de filtration ou un effet résiduel de ce gène, ou encore à un gène différent de *Rvi14* (paralogue par exemple) qui possède un large spectre d'action.

Ce QTL du GL6, transmis par 'Dülmener Rosenapfel', fut de nouveau détecté avec un mélange présentant une plus grande diversité de *V. inaequalis* (huit souches au lieu de cinq). Pourtant, les interrogations évoquées ci-dessus persistent, et nous ne pouvons pas conclure sur le spectre d'action de ce QTL. A nouveau, des expérimentations menées indépendamment avec plusieurs souches monoconidiales de différentes races devraient permettre de répondre à cette question.

IV-2-3- Des QTL à spectre large sur le GL11 et le GL17

Des tests pathologiques souche par souche ont montré l'efficacité du QTL du GL17 vis-à-vis d'un grand nombre de souches appartenant à des races différentes (Calenge et al. 2004) d'où sa qualification de QTL à large spectre. Nos travaux ont confirmé l'implication de ce QTL dans le contrôle de la résistance du pommier à la tavelure : le QTL a été détecté dans la descendance 'Gala x 'Dülmener Rosenapfel', dans la population en pedigree, et maintenant chez les descendants du plan de croisements demi-diallèle. Nous pouvons supposer que ce QTL est efficace face à chacune des souches utilisées pour nos travaux. Son efficacité face à cette diversité de l'agent pathogène pourrait être vérifiée en testant séparément des souches représentant la plus grande diversité possible de *V. inaequalis*, et plus particulièrement les souches non testées préalablement par Calenge et al. (2004).

Un raisonnement similaire peut être mené pour le QTL du GL11. La qualification de QTL à large spectre pour ce dernier se basait toutefois sur une diversité pathogène moins grande (Durel et al. 2003) que celle testée pour le QTL du GL17. Il n'en reste pas moins que le QTL du GL11 s'est manifesté face aux divers mélanges multi-souches que nous avons

utilisés. Nous aurions alors tendance à penser que ce QTL est bien à large spectre ; des tests souche par souche confirmeraient cette hypothèse.

IV-3- Portée du modèle génétique

Le modèle génétique établi fut un peu loin de nos espérances... Nous souhaitions initialement élaborer un modèle plus large tant d'un point de vue du nombre, du type, ou encore de la spécificité d'action des loci de résistance. Nous espérions également tester la valeur prédictive du modèle à travers la corrélation entre les valeurs phénotypiques prédites par le modèle et les valeurs phénotypiques observées d'une descendance faisant partie du plan de croisements mais non incluse pour l'élaboration du modèle. Cet aspect n'a pas pu être abordé étant donné que les loci ciblés ne ségrégeaient que dans trois descendances. Elaborer un modèle génétique à partir de deux descendances seulement pour pouvoir tester la valeur prédictive du modèle sur la troisième descendance n'avait alors pas véritablement de sens...

Le modèle génétique que nous avons établi n'expliquait qu'une part relativement faible de la variabilité phénotypique observée (~30% de la variation phénotypique). Plusieurs raisons peuvent être invoquées pour justifier ce résultat :

(i) chaque génotype n'a été phénotypé qu'à travers une seule copie, du fait de l'impossibilité technique de réaliser des greffes au stade semis. L'héritabilité individuelle est donc impossible à évaluer à ce stade. Même si le stade physiologique n'est pas le même, ce qui rend délicat la comparaison, les héritabilités individuelles obtenues sur des génotypes greffés de la descendance 'Discovery' x 'TN10-8', inoculée indépendamment avec différentes souches (Calenge et al. 2004), variaient entre les valeurs 0,27 et 0,72 (moyenne sur cinq souches testées : 0,49). Une héritabilité individuelle de ~0,5 pourrait donc être considérée comme une valeur probable pour notre expérimentation ;

(ii) nous n'avons pas ciblé exhaustivement l'ensemble des QTL ségrégeant potentiellement dans les descendances étudiées. Certains QTL très spécifiques ont été écartés, d'autres QTL inconnus (à effet additif ou épistatique) n'ont pas été tracés ;

(iii) la variabilité d'origine environnementale n'a été que très partiellement prise en compte à travers les effets blocs, alors que des gradients intra-blocs ont pu exister et ont été négligés.

Par ailleurs, notre démarche était exploratoire dans la mesure où nous avons ciblé certains loci de résistance dont nous avons évalué l'efficacité face à un mélange de souches particulier. Il aurait été préférable de tester l'effet de ces loci de résistance vis-à-vis de différentes souches inoculées séparément. Les effets moyens (car évalués dans plusieurs

fonds génétiques) ainsi déterminés auraient permis de définir un modèle génétique souche par souche. Ces effets auraient ensuite pu être utilisés pour reconstruire un modèle génétique face à divers mélanges multi-souches impliquant en fréquence variable telles et telles souches préalablement testées séparément. Compte tenu des impératifs temporels d'une thèse et des contraintes liées au matériel végétal, cette stratégie souche par souche ne pouvait pas être envisagée ici. Les données de résistance obtenues par Calenge et al. (2004) sur une descendance 'Discovery' x 'TN10-8' face à diverses souches de *V. inaequalis* inoculées indépendamment pourraient être utilisées pour établir, dans un premier temps, un modèle génétique souche par souche, puis un modèle "théorique" sur mélange. En outre, une étude comparative, visant à vérifier si les QTL détectés vis-à-vis de ces souches monoconidiales inoculées indépendamment sont aussi détectés vis-à-vis d'un mélange de ces mêmes souches co-inoculées, est actuellement en cours (à travers une thèse). Ces nouvelles données pourraient être utilisées pour définir un modèle "expérimental" sur mélange. Ce modèle "expérimental" pourrait être comparé au modèle "théorique" sur mélange. D'éventuels écarts entre ces deux modèles pourraient être reliés aux phénomènes (élicitation, compétition, synergie) pouvant potentiellement se produire entre les souches d'un même mélange (phénomènes détaillés en discussion générale). Bien qu'il s'agisse de l'étude d'une seule descendance, celle-ci pourra apporter des éléments de réponse.

Afin que le modèle génétique satisfasse à l'objectif initialement fixé, il serait souhaitable idéalement d'ajouter d'autres loci de résistance. En gardant le plan de croisements réalisé ici comme base, on pourrait envisager de tester d'autres gènes majeurs présentant des symptômes phénotypiques similaires ou différents de ceux causés par les gènes majeurs déjà impliqués dans ce plan de croisements. Par exemple, le gène majeur *Vm* (symptôme de type 'pin-points' comme *Vh4*), et le gène majeur *Vf* (symptôme de type chlorotique comme *Rvi14*). Les gènes majeurs *Vg* et *Vh2*, causant des symptômes nécrotiques, sont par ailleurs déjà impliqués dans le plan de croisements. D'autre part, il serait intéressant de tester des QTL spécifiques qui présenteraient des spécificités de souches/races différentes. Pour cela, il serait judicieux de vérifier si les géotypes, déjà impliqués dans le plan de croisements demi-diallele, possèdent les allèles favorables à ces QTL. Par exemple, nous savons déjà que 'A10-15' a un allèle favorable au QTL du GL5. Certes, le QTL intermédiaire sur le GL1 de 'A10-15' semble avoir été "laminé" par le mélange de souches utilisé ici, mais qu'en serait-il face à un autre mélange, et pour d'autres QTL spécifiques ou intermédiaires ? Pour l'ensemble de ces nouveaux loci ciblés, il faudrait veiller à ce qu'ils soient présents à l'état hétérozygote chez le (ou les) géniteur(s) choisi(s) pour ne pas être confronté aux problèmes rencontrés ici avec 'X6683' (trois loci à l'état homozygote) ou dans une moindre mesure avec 'A10-15' (deux allèles à un même locus avec des

spécificités différentes mais montrant potentiellement un effet global équivalent face au mélange de souches).

Enfin, d'éventuels effets d'épistasie seraient à rechercher de manière plus systématique dans l'interaction pommier-*V. inaequalis*. De tels effets ont été identifiés pour la résistance du pommier au feu bactérien (Calenge et al. 2005b) et à l'oïdium (Calenge and Durel 2006). Ils n'ont pas encore été systématiquement recherchés jusqu'à présent pour la résistance à la tavelure. Dans le plan de croisements demi-diallèle, seuls de rares effets d'épistasie ont été détectés entre certains des loci de résistance ciblés. Mais des effets d'épistasie plus importants pourraient exister entre d'autres régions du génome non ciblées par des marqueurs dans cette étude. De tels effets seraient alors à intégrer dans le modèle.

IV-4- Règles de cumul de loci de résistance

En vue d'une efficacité maximale de la résistance face à la variabilité de *V. inaequalis*, quels loci de résistance faut-il cumuler ? : le cumul d'un nombre suffisant de gènes majeurs confère-t-il une efficacité maximale, ou est-il préférable, vu la biologie et la génétique des populations du champignon, de se concentrer sur des loci de résistance partielle, en particulier ceux codant pour des résistances à large spectre ? Les conditions d'expérimentations ne nous ont pas permis de répondre clairement à cette question. Nos résultats tendent à indiquer que plus un génotype de pommier possède de loci de résistance, plus son niveau de résistance à la tavelure est élevé. Ces premières conclusions doivent être prises avec précaution car elles se basent sur une comparaison entre des combinaisons génotypiques impliquant au plus deux gènes majeurs et des QTL à spectre large. En effet, nous n'avons pas pu analyser l'effet d'autres gènes majeurs et de QTL spécifiques ou intermédiaires face au mélange multi-souches pour les raisons explicitées précédemment. Il serait intéressant de poursuivre cette comparaison de combinaisons génotypiques contrastées, en explorant une plus grande variabilité de loci de résistance, afin de définir (ou du moins de tenter de définir) des "règles de construction de génotypes" en vue d'une gestion durable de la résistance du pommier à la tavelure. L'évaluation de l'efficacité des combinaisons génotypiques serait réalisée à partir du matériel végétal utilisé, par ailleurs, pour élaborer le modèle génétique présenté ci-dessus.

Définir des "règles de cumul" de loci de résistance en vue d'une résistance efficace de la résistance du pommier face à la variabilité de *V. inaequalis* permettrait d'orienter le choix des loci de résistance à utiliser et à combiner. La combinaison de plusieurs loci de résistance au sein d'un même génotype pourrait être réalisée par sélection classique, méthode qui nécessite cependant un nombre d'années considérable. La transformation génétique permettrait de réduire le temps d'obtention de tels génotypes, mais reste encore que cette

méthodologie soit acceptée par la société... D'autre part, "combiner" ne signifie pas forcément cumuler tous les loci d'intérêt au sein d'un même génotype. Sapoukhina et al. (in prep) ont modélisé l'évolution des populations pathogènes suivant les caractéristiques invasives de celles-ci et l'hétérogénéité génétique et spatiale de la résistance de l'hôte. Ils ont ainsi démontré que le déploiement spatial plutôt que la composition génétique de la résistance de l'hôte gouvernait davantage l'évolution des populations pathogènes. Le modèle a montré qu'un mélange aléatoire de génotypes hôtes portant chacun un gène majeur de résistance différent pouvait remplacer un génotype hôte possédant une combinaison de ces gènes majeurs sans perte d'efficacité de la résistance. Des essais de simulation impliquant des QTL, et non plus uniquement des gènes majeurs, sont actuellement menés par cette équipe. Dans l'hypothèse où les conclusions tirées des simulations avec les gènes majeurs se vérifient avec les QTL, les stratégies de cumul de loci de résistance pourraient se raisonner non plus à l'échelle du génotype mais à l'échelle du verger. Il pourrait alors être envisagé de restreindre le nombre de loci cumulés au sein d'un même génotype tout en multipliant le nombre de génotypes portant des combinaisons génétiques complémentaires pour une résistance efficace, et de combiner ces génotypes sur une même parcelle. La plantation de différentes variétés sur une même parcelle devrait bien évidemment être raisonnée en fonction des contraintes de conduite culturale des différentes variétés.

DISCUSSION GENERALE

La durabilité d'une résistance est importante pour l'ensemble des espèces végétales, elle l'est d'autant plus pour une plante pérenne tel le pommier pour lequel les vergers sont exploités pendant 15-20 ans. Comment construire des génotypes de pommier montrant une efficacité maximale de la résistance face à la variabilité et l'évolution potentielle de l'agent pathogène *Venturia inaequalis*? Quels facteurs de résistance privilégier... gènes majeurs et/ou QTL? Travailler exclusivement avec des gènes majeurs est beaucoup plus simple en sélection assistée par marqueurs, mais les gènes majeurs sont connus pour être plus facilement contournables par l'agent pathogène que les résistances partielles. Qu'en est-il si l'on cumule directement plusieurs gènes majeurs dans un seul génotype? Inversement, le cumul de facteurs de résistance partielle à spectre large pourrait être une stratégie plus payante à long terme, même si elle est plus longue à mettre en œuvre. Ne disposant que de très peu de QTL à large spectre, il paraissait nécessaire d'en identifier davantage. D'autre part, le cumul raisonné de loci de résistance dans un même génotype apparaissait comme une solution à bien analyser. Le travail de thèse présenté ici avait ainsi pour objectifs de : (i) rechercher de nouvelles sources de résistance du pommier à la tavelure, en privilégiant les QTL à large spectre ; (ii) comparer l'efficacité relative de combinaisons génotypiques contrastées vis-à-vis de la variabilité de *V. inaequalis* afin d'initier un modèle du niveau de résistance des génotypes en fonction des loci de résistance portés et face à une gamme de souches pathogènes rencontrées, et d'apporter des éléments de réponse sur des "règles de construction de génotypes" en vue d'une efficacité optimale de la résistance face à *V. inaequalis*.

I- RAPPEL DES PRINCIPAUX RESULTATS

La recherche de nouveaux loci de résistance n'a pas été très fructueuse en soi... Mais elle a permis de confirmer l'implication de certaines régions génomiques dans le contrôle de la résistance du pommier à la tavelure. Nous avons ainsi identifié un nouveau gène majeur (*Rvi14*) co-localisant avec un QTL, issu de la variété résistante 'Dülmener Rosenapfel', sur le GL6, région du génome où aucune source de résistance, que ce soit pour la tavelure ou un autre bioagresseur du pommier, n'avait encore été identifiée. 'Dülmener Rosenapfel' possède également un allèle favorable au QTL sur le GL17, QTL pour lequel l'étude en pedigree a confirmé l'occurrence fréquente d'un polymorphisme. En outre, le gène majeur *Vf* à l'état homozygote ou en combinaison avec l'allèle favorable d'un QTL co-localisant avec lui, s'est montré encore efficace face à un mélange multi-souches de *V. inaequalis* comportant en particulier des souches virulentes-*Vf*.

Nos résultats montreraient que plus un génotype possède de loci de résistance, ou plus particulièrement plus il possède d'allèles favorables à différents loci, plus son niveau de résistance est élevé. L'évaluation des différentes combinaisons génotypiques face à une gamme de souches pathogènes nous a également permis d'initier la modélisation du niveau de résistance des génotypes en fonction des loci de résistance portés (et détectés) et face à une certaine diversité de l'agent pathogène.

Les différents résultats obtenus soulignent plusieurs points de discussion communs concernant l'efficacité des méthodes de détection des loci de résistance. Ces résultats ouvrent également des perspectives pour l'utilisation des loci en vue d'une gestion durable de la résistance du pommier à la tavelure.

II- EXPRESSION DIFFERENTIELLE DE LA RESISTANCE ENTRE SAISONS

Pour chacune de nos populations, nous avons effectué des tests pathologiques au printemps et à l'automne. Après inoculation au printemps, les plants étaient déposés en chambre froide afin de mimer la vernalisation, puis de nouveau inoculés à l'automne. Aussi, nous pouvions considérer que ce que nous appelons "automne" se rapprochait vraisemblablement plus d'un second "printemps".

Nous avons constaté une expression différentielle de la résistance à la tavelure entre les saisons, et ce quelle que soit la population étudiée (descendance 'Gala' x 'Dülmener Rosenapfel', population en pedigree, plan de croisements demi-diallèle). Plusieurs raisons peuvent être évoquées pour expliquer cette différence du niveau et probablement du déterminisme génétique de la résistance observée entre le printemps et l'automne. Les conditions environnementales dans la serre pouvaient être différentes d'une saison à l'autre. Plutôt que de parler de conditions environnementales contrôlées, nous devrions plutôt parler de conditions semi-contrôlées pour des essais en serre. Par exemple, la durée de lumière naturelle était bien évidemment différente entre les deux saisons même si nous avons tenté de compenser un déficit de lumière naturelle à l'automne par de la lumière artificielle. Cette différence potentielle de conditions environnementales entre les deux saisons a pu notamment influencer sur le comportement des souches pathogènes. Afin d'avoir un contrôle plus rigoureux des conditions environnementales, il serait préférable de réaliser les essais dans des enceintes climatiques, mais de telles structures avec une superficie suffisante n'étaient pas disponibles sur le site. D'autre part, les suspensions monoconidiales

étaient préparées avant chaque test pathologique, leur composition n'était alors pas strictement identique d'une saison à l'autre malgré les précautions prises et les concentrations et taux de germination des souches apparemment similaires. Il n'est cependant pas envisageable de conserver l'inoculum d'une saison à l'autre car la congélation des suspensions monoconidiales entraîne une réduction considérable du taux de germination des conidies, et même de la concentration effective du fait qu'un certain nombre de conidies se "collent" rapidement à la paroi du récipient. Par ailleurs, il pourrait exister une différence de conditions physiologiques des plants suite à un passage au froid. Enfin et peut-être surtout, il est possible que le déterminisme génétique de la résistance du pommier à la tavelure diffère selon le stade physiologique des plantes. Comme discuté dans l'article (Chapitre 2), les résistances au stade jeune plant et au stade adulte peuvent être contrôlées par les mêmes loci (Camargo et al. 1995) ou par des loci différents (Delourme et al. 2004 ; Wang et al. 2005). Certes, nos populations d'étude ne présentaient pas une telle différence physiologique, il n'en reste pas moins que les plants testés à l'automne étaient physiologiquement plus âgés que ces mêmes plants testés au printemps. Ceci était probablement plus accentué pour les plants issus de semis de l'année que pour les plants issus de greffes. Il est alors possible que le contrôle génétique de la résistance diffère significativement entre des états physiologiques différents.

Afin de confirmer ou d'infirmer un contrôle génétique différentiel de la résistance à la tavelure selon les saisons ou l'état physiologique des plants, plusieurs expérimentations pourraient être mises en place. Tout d'abord, afin de gommer les éventuelles différences de conditions environnementales dans la serre, il serait intéressant d'inoculer des génotypes de pommier en enceintes climatiques dans lesquelles les conditions sont mieux contrôlées. Il serait également préférable d'élever les plants en enceintes climatiques afin d'éviter tout biais éventuel pendant la croissance des plants précédant chaque inoculation. Comme dans nos études, les plants seraient inoculés une première fois au printemps, puis une seconde fois à l'automne après rabattage et passage au froid. En outre, il serait pertinent d'évaluer le niveau de résistance de plusieurs groupes de pommier présentant différents types de résistance (génotypes sensibles, génotypes portant un (ou plusieurs) gène(s) majeur(s), génotypes portant un (ou plusieurs) QTL, génotypes combinant gène(s) majeur(s) et QTL). Pour des raisons de simplicité d'interprétation, il serait souhaitable de réaliser des tests souche par souche plutôt que des tests multi-souches, ce type de tests permettrait notamment de mettre en évidence une éventuelle interaction "souche*saison*type de résistance". Il serait également approprié de sélectionner des souches appartenant à des races différentes et montrant des agressivités variables. Dans le même ordre d'idée, l'influence du passage au froid pourrait être testé en comparant des doubles inoculations avec ou sans vernalisation.

III- LES TESTS EN SERRE SONT-ILS REPRESENTATIFS DES CONDITIONS NATURELLES ?

La recherche de loci de résistance du pommier à la tavelure a été et est menée en conditions de serre et de verger (e.g., Liebhard et al. 2003b ; Calenge et al. 2004 ; Durel et al. 2004), mais de façon indépendante. D'une manière générale, la corrélation entre tests en serre et niveaux de résistance en verger est élevée pour des génotypes portant un gène majeur de résistance tant qu'il n'y a pas de phénomènes de contournement. Par contre, cette corrélation est plus faible quand on considère les génotypes à résistance partielle (Yves Lespinasse, communication personnelle). Paradoxalement, à notre connaissance, il n'y a pas d'expérimentations publiées sur ce sujet. Cette moindre corrélation est donc postulée sur la base de connaissances empiriques des sélectionneurs. Il serait donc intéressant d'estimer la corrélation entre serre et verger, pour cela il serait pertinent de : (1) évaluer le niveau de résistance de génotypes en verger face à un inoculum local, (2) prélever cet inoculum sur génotypes sensibles et l'inoculer en serre sur des plants greffés, correspondant aux génotypes testés en verger, pour apprécier le niveau de résistance de ces génotypes en conditions semi-contrôlées. Les tests en serre sont réalisés sur pousses en croissance, c'est-à-dire sur feuilles ; la corrélation serre-verger ne pourra alors être établie que pour la résistance sur feuilles. Or *V. inaequalis* est un champignon qui se développe tant sur feuilles que sur fruits. Aussi, l'évaluation du niveau de résistance des génotypes de pommier en verger est nécessaire pour apprécier les attaques pathogènes sur fruits. Sur une gamme de variétés à résistance partielle, Schmidt (2000) a estimé la corrélation feuilles-fruits à 0,61 en verger. De manière similaire, Liebhard et al. (2003b) ont obtenu une corrélation assez faible (0,41) entre notations sur feuilles et notations sur fruits à l'intérieur d'une descendance en ségrégation cartographiée ('Fiesta' x 'Discovery') en verger. En conséquence, seul un QTL de résistance (sur le GL17 de 'Fiesta') était commun entre résistance sur feuilles et sur fruits. Ces observations, obtenues dans un seul site, doivent être complétées par d'autres tests. Pour cette raison, une expérimentation similaire a été engagée par l'équipe de l'UMR GenHort sur plusieurs descendances déjà cartographiées pour leur résistance à la tavelure en serre : ces mêmes descendances sont actuellement suivies en verger non traité et notées pour leur résistance à la tavelure sur feuilles et sur fruits. Si un contrôle génétique différentiel des résistances sur feuilles et sur fruits se confirmait, l'expérimentation en serre (uniquement sur feuilles) ne serait pas suffisante pour rechercher des facteurs de résistance directement efficaces sur fruits. Cependant, la première étape à contrôler reste la qualité de la corrélation serre-verger sur feuilles. En effet, une variété résistante sur feuilles devrait limiter fortement la quantité d'inoculum et donc le développement d'épidémies sur fruits, même si ses fruits sont potentiellement plus sensibles. La résistance sur feuilles est donc un premier objectif de

sélection pertinent pour réduire le nombre de traitements en verger si on envisage de maintenir quelques traitements pour contrôler la sensibilité éventuelle sur fruits.

IV- INOCULUM MULTI-SOUCHES

Voulant prendre en compte une certaine variabilité de l'agent pathogène, la mise en place de tests pathologiques souche par souche s'avèrait lourde et longue... Aussi l'inoculation avec un mélange multi-souches trouvait son intérêt. De plus, ces conditions d'inoculation reflètent davantage les conditions naturelles en verger. Toutefois, certaines limites à l'utilisation d'un mélange multi-souches pourraient exister et seraient donc à vérifier. D'une part, il pourrait se produire un phénomène de compétition, ou inversement de synergie, entre les souches présentes dans le mélange. Les effets de densité sur le développement de populations pathogènes ont été analysés pour plusieurs agents phytopathogènes. Falahati-Rastegar et al. (1983), cités par O'Hara et Brown (1996), ont montré qu'à faible densité, les souches de *Puccinia hordei* (responsable de la rouille chez l'orge) les plus compétitives étaient celles qui produisaient le plus de spores, alors qu'à haute densité, les souches les plus compétitives étaient celles qui pénétraient le plus rapidement à travers les stomates. Des expérimentations visant à étudier ce type de phénomènes chez le pathosystème pommier-*V. inaequalis* sont actuellement menées à l'INRA d'Angers par l'équipe 2EPF (Ecologie Evolutive des Pathogènes Fongiques) de l'UMR Pathologie Végétale. Ces études sont, dans un premier temps, menées sur des génotypes de pommier sensibles. Il est important de souligner que les observations qui pourront être faites sur des génotypes sensibles ne seront pas directement transférables sur des génotypes possédant tel(le) ou tel(le) locus (combinaison de loci) de résistance. En effet, prenons l'exemple d'un mélange de cinq souches confrontées à des génotypes hôtes portant des combinaisons génétiques variées. Face à ces diverses combinaisons, la proportion "souches avirulentes/souches virulentes" varie, aussi les souches virulentes ne sont pas dans les mêmes conditions de compétition d'une combinaison génétique de résistance à l'autre. D'autre part, l'éllicitation des défenses pourrait potentiellement être induite par inoculation de souches avirulentes de *V. inaequalis*. Cho et Smedegaard-Petersen (1985) ont montré que l'inoculation avec des souches avirulentes d'*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* protégeaient les feuilles de l'orge d'une infection ultérieure par des souches virulentes. Un intervalle d'une heure entre l'inoculation avec une souche avirulente puis l'inoculation avec une souche virulente suffisait pour induire la résistance vis-à-vis de cette souche virulente. Dans le cas d'une co-inoculation, les souches avirulentes auraient-elles le temps de déclencher les mécanismes de défense contre les

souches virulentes ? Ces phénomènes d'élicitation sont également étudiés chez le pathosystème pommier-*V. inaequalis* par l'équipe 2EPF de l'UMR Pathologie Végétale.

Les tests réalisés avec un mélange multi-souches de *V. inaequalis* ont révélé les QTL de résistance à large spectre (QTL des GL11 et 17), quelle que soit la population de pommier étudiée. Les QTL à large spectre ne sont cependant pas les seuls à avoir été mis en évidence avec un tel inoculum... Des gènes majeurs tel *Vg* ont également montré un effet significatif sur le niveau de résistance. Afin d'analyser la portée de l'utilisation d'un mélange de souches, une étude comparative, visant à vérifier si les loci détectés vis-à-vis de souches monoconidiales inoculées indépendamment sont aussi détectés vis-à-vis d'un mélange de ces mêmes souches co-inoculées, est actuellement en cours à travers une thèse co-encadrée par mon équipe et l'équipe 2EPF. Cette étude se base sur la descendance 'Discovery' x 'TN10-8' déjà étudiée en test souche par souche par Calenge et al. (2004). Une évaluation de la fréquence de chaque souche dans la sporulation observée sur chaque descendant après co-inoculation permettrait de relier la présence/absence des gènes majeurs/QTL de résistance et le degré de filtration des souches par ces combinaisons génotypiques. La méthodologie de caractérisation des souches sporulant après une co-inoculation est actuellement développée dans la thèse sus citée.

V- PORTEE DES RESULTATS OBTENUS

D'après nos résultats, les QTL généraux maintiennent leur effet vis-à-vis d'un mélange multi-souches contrairement aux QTL spécifiques (à effet faible) qui se révèlent inefficaces face à cette variabilité de l'agent pathogène. Les gènes majeurs, même une fois contournés, contribuent à la réduction de la maladie, et ce par un phénomène de filtration des souches avirulentes. Les QTL spécifiques et les gènes majeurs présentent des spectres d'action étroits, or ils s'avèreraient ne pas avoir la même efficacité face à un mélange de souches. Cette hypothèse demande pourtant à être vérifiée sur davantage de QTL spécifiques sachant que nous ne disposons actuellement d'informations que sur l'effet d'un seul QTL spécifique (QTL du GL1 de 'A10-15').

Outre ces différences observées entre les différents types de loci de résistance, nous avons également mis en évidence l'avantage d'une "double dose" par rapport à une "simple dose" d'allèle favorable à un locus de résistance donné. Cet avantage semble se confirmer en verger. En effet, des notations effectuées dans deux vergers non traités (l'un dans le Nord de la France et l'autre près d'Angers) ont montré la bien meilleure résistance du génotype 'X6683' (portant deux "doses" d'allèle favorable aux loci *Vf*, *Vg* et QTL du GL17) en

comparaison de celle de génotypes ne portant *Vf* et *Vg* (+/- QTL du GL17) qu'à l'état hétérozygote. Cette faible sensibilité de 'X6683' s'est confirmée sur plusieurs années en présence de souches virulentes-*Vf* déjà installées dans le verger du Nord. Dans le verger angevin où le contournement du gène *Vf* s'est amplifié durant ces quatre dernières années, 'X6683' est resté relativement peu attaqué en comparaison des génotypes portant ces gènes majeurs et QTL à l'état hétérozygote dont certains ont présenté des niveaux d'attaque très élevés. Le cumul de facteurs de résistance ne doit ainsi plus se raisonner uniquement sur le nombre de loci, mais aussi sur le nombre d'allèles favorables à ces loci.

Les orientations que nous présentons ici restent bien sûr à confirmer étant donné que tous les types de combinaisons génotypiques n'ont pas été testés et qu'un suivi de long terme s'impose. Par exemple, nous n'avons pas pu comparer l'efficacité d'un ou plusieurs QTL à large spectre à celle d'un cumul de plusieurs QTL à spectre étroit montrant une complémentarité de spécificités.

VI- LE "TOUT GENETIQUE" OU LA GENETIQUE COMME "COMPOSANTE" DE LA PROTECTION INTEGREE ?

Les réflexions en cours sur des scénarii de productions agricoles plus économes en pesticides (-50% de fréquence de traitements en 10 ans proposé par le Grenelle de l'Environnement) font d'ores et déjà apparaître des besoins de recherches diversifiées mais intégrées pour préciser des stratégies alternatives à l'utilisation massive de ces produits. Dans ce contexte de Protection Intégrée, les travaux de recherche ont pour objectif de fournir aux arboriculteurs à la fois des variétés de pommier présentant une résistance accrue à la tavelure et les conditions de leur utilisation optimale pour limiter les risques de leur contournement par le champignon (prophylaxie, lutte chimique minimale, déploiement variétal dans l'espace et le temps, ...). La durabilité de la résistance ne doit donc plus être considérée comme une propriété limitée au génotype : elle dépend également de la conduite des cultures et de l'environnement global des parcelles ('paysage' au sens large). Le nouvel enjeu qui se dessine sur un plan scientifique est donc de chercher à identifier puis sélectionner des "idéotypes" végétaux pour lesquels des interventions d'ordre génétique, cultural et environnemental doivent s'articuler et même se potentialiser pour tendre vers la durabilité du système 'verger' dans son ensemble. Tel est le contenu d'un appel d'offre récent lancé par différents départements de l'INRA (GAP, SPE, EA, EcoInnov). La génétique tient donc un rôle essentiel dans la durabilité du système agricole/horticole, mais ne doit plus être considérée indépendamment des autres types d'interventions possibles. La

recherche et la caractérisation des facteurs de résistance du pommier à la tavelure vont devoir s'inscrire progressivement dans cette démarche avec une probable modification profonde des méthodologies expérimentales à employer.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarts, N., M. Metz, E. Holub, B.J. Staskawicz, M.J. Daniels, and J.E. Parker. 1998. Different requirements for *EDS1* and *NDR1* by disease resistance genes define at least two *R* gene-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 10306-10311.
- Abe, S. 2004. Breeding of a blast resistant multiline variety of rice, Sasanishiki BL. *Japan Agricultural Research Quarterly* **38**: 149-154.
- Agrios, G.N. 1988. Plant diseases caused by Fungi. In *Plant Pathology* (Third Edition). G.N. Agrios (ed.). Academic Press, San Diego, California. p.396.
- Aldwinckle, H.S., H.L. Gustafson, and R.C. Lamb. 1976. Early determination of genotypes for apple scab resistance by forced flowering of test cross progenies. *Euphytica* **25**: 185-191.
- Allen, R.L., P.D. Bittner-Eddy, L.J. Grenville-Briggs, J.C. Meitz, A.P. Rehmany, L.E. Rose, and J.L. Beynon. 2004. Host-parasite coevolutionary conflict between *Arabidopsis* and downy mildew. *Science* **306**: 1957-1960.
- Anonyme. 2003. La tavelure du pommier : Raisons de sa recrudescence et conseils pour la maîtriser en 2003. *Phytoma - La Défense des Végétaux* **559**: 33-35.
- Ayme, V. 2005. Mécanismes de contournement des résistances et évaluation *a priori* de leur durabilité dans l'interaction Piment (*Capsicum annuum* L.) - Virus Y de la pomme de terre (PVY). Thèse de doctorat, Spécialité Biologie des populations et écologie, Université Montpellier II, Montpellier.
- Ayme, V., J. Petit-Pierre, S. Souche, A. Palloix, and B. Moury. 2007. Molecular dissection of the potato virus Y VPg virulence factor reveals complex adaptations to the *pvz2* resistance allelic series in pepper. *Journal of General Virology* **88**: 1594-1601.
- Bagga, H.S. and D.M. Boone. 1968. Genes in *Venturia inaequalis* controlling pathogenicity to crabapples. *Phytopathology* **58**: 1176-1182.
- Baldi, P., A. Patocchi, E. Zini, C. Toller, R. Velasco, and M. Komjanc. 2004. Cloning and linkage mapping of resistance gene homologues in apple. *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 231-239.
- Ballini, E., J.B. Morel, G. Droc, A. Price, B. Courtois, J.L. Notteghem, and D. Tharreau. 2008. A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 859-868.
- Bariana, H.S., N. Parry, L.R. Barclay, R. Loughman, R.J. McLean, M. Shankar, R.E. Wilson, N.J. Willey, and M. Francki. 2006. Identification and characterization of stripe rust resistance gene *Yr34* in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **112**: 1143-1148.
- Behura, S.K., F.H. Valicente, S.D. Rider, Jr., M. Shun-Chen, S. Jackson, and J.J. Stuart. 2004. A physically anchored genetic map and linkage to avirulence reveals recombination suppression over the proximal region of hessian fly chromosome A2. *Genetics* **167**: 343-355.
- Belfanti, E., E. Silfverberg-Dilworth, S. Tartarini, A. Patocchi, M. Barbieri, J. Zhu, B.A. Vinatzer, L. Gianfranceschi, C. Gessler, and S. Sansavini. 2004. The *HcrVf2* gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 886-890.
- Bénaouf, G. and L. Parisi. 1997. Pathogenicity of *Venturia inaequalis* strains from *Malus floribunda* 821: comparison with race 6 on apple clones. *Bulletin IOBC-WPRS* **20**: 8-11.
- Bénaouf, G. and L. Parisi. 2000. Genetics of host-pathogen relationships between *Venturia inaequalis* races 6 and 7 and *Malus* species. *Phytopathology* **90**: 236-242.
- Berbee, M.L. 2001. The phylogeny of plant and animal pathogens in the Ascomycota. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **59**: 165-187.

- Bink, M.C.A.M., P. Uimari, M.J. Sillanpaa, L.L.G. Janss and R.C. Jansen. 2002. Multiple QTL mapping in related plant populations via a pedigree-analysis approach. *Theoretical and Applied Genetics* **104**: 751-762.
- Bink, M.C.A.M., M.P. Boer, C.J.F. ter Braak, J. Jansen, R.E. Voorrips and W.E. Van de Weg. 2008. Bayesian analysis of complex traits in pedigreed plant populations. *Euphytica* **161**: 85-96.
- Blaise, P. and C. Gessler. 1994. Cultivar mixtures in apple orchards as a mean to control apple scab? *Norwegian Journal of Agricultural Sciences* **17**: 105-112.
- Blanc, G., A. Charcosset, B. Mangin, A. Gallais, and L. Moreau. 2006. Connected populations for detecting quantitative trait loci and testing for epistasis: an application in maize. *Theoretical and Applied Genetics* **113**: 206-224.
- Bolar J.P., S.K. Brown, J.L. Norelli, and H.S. Aldwinckle. 1999. Factors affecting the transformation of 'Marshall McIntosh' apple by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **55**: 31-38.
- Bonas, U. and T. Lahaye. 2002. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Current Opinion in Microbiology* **5**: 44-50.
- Boone, D.M. 1971. Genetics of *Venturia inaequalis*. *Annual Review of Phytopathology* **9**: 297-318.
- Boone, D.M. and G.W. Keitt. 1957. *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. XII. Genes controlling pathogenicity of wild-type lines. *Phytopathology* **47**: 403-409.
- Bosland, P.W. and P.H. Williams. 1988. Pathogenicity of geographic isolates of *Fusarium oxysporum* from crucifers on a differential set of crucifer seedlings. *Journal of Phytopathology* **123**: 63-68.
- Boudichevskaia, A., H. Flachowsky, A. Peil, C. Fischer, and F. Dunemann. 2006. Development of a multiallelic SCAR marker for the scab resistance gene *Vr1/Vh4/Vx* from R12740-7A apple and its utility for molecular breeding. *Tree Genetics and Genomes* **2**: 186-195.
- Boyd, L.A. 2006. Can the durability of resistance be predicted? *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**: 2523-2526.
- Brown, J.K.M. 2002. Comparative genetics of avirulence and fungicide resistance in the powdery mildew fungi. In *The powdery mildews: a comprehensive treatise*. W.R.B. R.R. Bélanger, A.J. Dik and T.L.V. Carver (eds.). APS Press, St Paul, Minnesota. pp. 56-65.
- Buckler, E.S. and J. Thornsberry. 2002. Plant molecular diversity and applications to genomics. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 107-111.
- Burdon, J.J. 1993. Genetic variation in pathogen populations and its implications for adaptation to host resistance. In *Durability of disease resistance*. T. Jacobs and J.E. Parlevliet (eds.). Kluwer Academic Publishers. pp. 41-56.
- Bus, V.G.M., C. Ranatunga, S.E. Gardiner, H.C.M. Bassett, and E.H.A. Rikkerink. 2000. Marker assisted selection for pest and disease resistance in the New Zealand apple breeding programme. *Acta Horticulturae* **538**: 541-547.
- Bus, V.G.M., W.E.v.d. Weg, C.E. Durel, C. Gessler, L. Parisi, E. Rikkerink, S. Gardiner, B. Meulenbroek, F. Calenge, A. Patocchi, and F. Laurens. 2004. Delineation of a scab resistance gene cluster on linkage group 2 of apple. *Acta Horticulturae* **663**: 57-62.
- Bus, V.G.M., E.H.A. Rikkerink, W.E.v.d. Weg, R.L. Rusholme, S.E. Gardiner, H.C.M. Bassett, L.P. Kodde, L. Parisi, F.N.D. Laurens, E.J. Meulenbroek, and K.M. Plummer. 2005a. The *Vh2* and *Vh4* scab resistance genes in two differential hosts derived from Russian apple R12740-7A map to the same linkage group of apple. *Molecular Breeding* **15**: 103-116.
- Bus, V.G.M., F. Laurens, W.E.v.d. Weg, R.L. Rusholme, E.H.A. Rikkerink, S.E. Gardiner, H.C.M. Bassett, L.P. Kodde, and K.M. Plummer. 2005b. The *Vh8* locus of a new gene-for-gene interaction between *Venturia inaequalis* and the wild apple *Malus*

- sieversii* is closely linked to the *Vh2* locus in *Malus pumila* R12740-7A. *New Phytologist* **166**: 1035-1049.
- Bus, V.G.M., E.H.A. Rikkerink, H.S. Aldwinckle, V. Caffier, C.E. Durel, S. Gardiner, C. Gessler, R. Groenwold, F. Laurens, B. Le Cam, J. Luby, B. Meulenbroek, M. Kellerhals, L. Parisi, A. Patocchi, K. Plummer, H.J. Schouten, S. Tartarini, and W.E.v.d. Weg. 2008. A proposal for the nomenclature of *Venturia inaequalis* races. *Acta Horticulturae* (in press).
- Calenge F. and C.E. Durel. 2006. Both stable and unstable QTLs for resistance to powdery mildew are detected in apple after four years of field assessments. *Molecular Breeding* **17**: 329-339.
- Calenge, F., A. Faure, M. Goerre, C. Gebhardt, W.E.v.d. Weg, L. Parisi, and C.E. Durel. 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., C.G. Van der Linden, E. Van de Weg, H.J. Schouten, G. Van Arkel, C. Denancé, and C.E. Durel. 2005. Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. *Theoretical and Applied Genetics* **110**: 660-668.
- Calenge F., D. Drouet, C. Denancé, W.E. Van de Weg, M.N. Brisset, J.P. Paulin, and C.E. Durel. 2005. Identification of a major QTL together with several minor additive or epistatic QTLs for resistance to fire blight in apple in two related progenies. *Theoretical and Applied Genetics* **111**: 128-135.
- Camargo, L.E.A., P.H. Williams, and T.C. Osborn. 1995. Mapping of quantitative trait loci controlling resistance of *Brassica oleracea* to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the field and greenhouse. *Phytopathology* **85**: 1296-1300.
- Campbell, C.S., C.W. Greene, and T.A. Dickinson. 1991. Reproductive biology in subfamily *Maloideae* (*Rosaceae*). *Systematic Botany* **16**: 333-349.
- Caranta, C., V. Lefebvre, and A. Palloix. 1997. Polygenic resistance of pepper to potyviruses consists of a combination of isolate-specific and broad-spectrum quantitative trait loci. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**: 872-878.
- Carisse, O. and M. Dewdney. 2002. A review of non-fungicidal approaches for the control of apple scab. *Phytoprotection* **83**: 1-29.
- Castro, A.J., X. Chen, A. Corey, T. Filichkina, P.M. Hayes, C. Mundt, K. Richardson, S. Sandoval-Islas, and H. Vivar. 2003. Pyramiding and validation of quantitative trait locus (QTL) alleles determining resistance to barley stripe rust: effects on adult plant resistance. *Crop Science* **43**: 2234-2239.
- Challice, J.S. 1981. Chemotaxonomic studies in the *Rosaceae* and the evolutionary origins of the subfamily *Maloideae*. *Preslia* **53**: 289-304.
- Chantret, N., M.T. Pavoine, and G. Doussinault. 1999. The race-specific resistance gene to powdery mildew, *MIRE*, has a residual effect on adult plant resistance of winter wheat line RE714. *Phytopathology* **89**: 533-539.
- Chardon, F., B. Virlon, L. Moreau, M. Falque, J. Joets, L. Decousset, A. Murigneux, and A. Charcosset. 2004. Genetic architecture of flowering time in maize as inferred from quantitative trait loci meta-analysis and synteny conservation with the rice genome. *Genetics* **168**: 2169-2185.
- Chen, H., S. Wang, Y. Xing, C. Xu, P.M. Hayes, and Q. Zhang. 2003. Comparative analyses of genomic locations and race specificities of loci for quantitative resistance to *Pyricularia grisea* in rice and barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 2544-2549.

- Chevalier, M., Y. Lespinasse, and S. Renaudin. 1991.** A microscopic study of the different classes of symptoms coded by the *Vf* gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*). *Plant Pathology* **40**: 249-256.
- Chevreau, E. and F. Laurens. 1987.** The pattern of inheritance in apple (*Malus x domestica* Borkh.): further results from leaf isozyme analysis. *Theoretical and Applied Genetics* **75**: 90-95.
- Chevreau, E., Y. Lespinasse, and M. Gallet. 1985.** Inheritance of pollen enzymes and polyploid origin of apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Theoretical and Applied Genetics* **71**: 268-277.
- Cho, B.H. and V. Smedegaard-Petersen. 1985.** Induction of resistance to *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in near-isogenic barley lines. *The American Phytopathological Society* **76**: 301-305.
- Churchill, G.A. and R.W. Doerge. 1994.** Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* **138**(3): 963-971.
- Coart, E., X. Vekemans, M.J.M. Smulders, I. Wagner, J. Van Huylenbroeck, E. Van Bockstaele, and I. Roldan-Ruiz. 2003.** Genetic variation in the endangered wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) in Belgium as revealed by amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers. *Molecular Ecology* **12**: 845-857.
- Coart, E., S. Van Glabeke, M. De Loose, A.S. Larsen, and I. Roldan-Ruiz. 2006.** Chloroplast diversity in the genus *Malus*: new insights into the relationship between the European wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) and the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.). *Molecular Ecology* **15**: 2171-2182.
- Collard, B.C.Y., M.Z.Z. Jahufer, J.B. Brouwer, and E.C.K. Pang. 2005.** An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica* **142**: 169-196.
- Conner, P.J., S.K. Brown, and N.J. Weeden. 1997.** Randomly amplified polymorphic DNA-based genetic linkage maps of three apple cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **122**: 350-359.
- Crépieux, S., C. Lebreton, B. Servin, and G. Charmet. 2004.** Quantitative trait loci (QTL) detection in multicross inbred designs: recovering QTL identical-by-descent status information from marker data. *Genetics* **168**: 1737-1749.
- Crépieux, S., C. Lebreton, P. Flament, and G. Charmet. 2005.** Application of a new IBD-based QTL mapping method to common wheat breeding population: analysis of kernel hardness and dough strength. *Theoretical and Applied Genetics* **111**: 1409-1419.
- Creste, S., A. Tulmann Neto, and A. Figueira. 2001.** Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* **19**(4): 299-306.
- Crosby, J.A., J. Janick, P.C. Pecknold, S.S. Korban, P.A. O'Connor, S.M. Ries, J. Goffreda, and A. Voordeckers. 1992.** Breeding apples for scab resistance - 1945-1990. *Fruit Varieties Journal* **46**: 145-166.
- Croxall, H.E., D.C. Gwynne, and J.E.E. Jenkins. 1952.** The rapid assessment of apple scab on leaves. *Plant Pathology* **1**: 39-41.
- Crute, I.R. and D.A.C. Pink. 1996.** Genetics and utilization of pathogen resistance in plants. *Plant Cell* **8**: 1747-1755.
- Dangl, J.L. and J.D.G. Jones. 2001.** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826-833.
- Dangl, J.L. and J.M. McDowell. 2006.** Two modes of pathogen recognition by plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 8575-8576.
- Darlington, C.D., and A.A. Moffett. 1930.** Primary and secondary chromosome balance in *Pyrus*. *Journal of genetics* **22**: 129-151.

- Darvasi, A., A. Weinreb, V. Minke, J.I. Weller, and M. Soller. 1993. Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. *Genetics* **134**: 943-951.
- Dayton, D.F. and E.B. Williams. 1968. Independent genes in *Malus* for resistance to *Venturia inaequalis*. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* **92**: 89-94.
- Dayton, D.F. and E.B. Williams. 1970. Additional allelic genes in *Malus* for scab resistance of two reaction types. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **95**: 735-736.
- Degenhardt, J., A. Poppe, J. Montag, and I. Szankowski. 2006. The use of the phosphomannose-isomerase/mannose selection system to recover transgenic apple plants. *Plant Cell Reports* **25**: 1149-1156.
- Dekkers, J.C.M. and F. Hospital. 2002. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Review Genetics* **3**: 22-32.
- Delourme, R., M.L. Pilet-Nayel, M. Archipiano, R. Horvais, X. Tanguy, T. Rouxel, H. Brun, M. Renard, and M.H. Balesdent. 2004. A cluster of major specific resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Phytopathology* **94**: 578-583.
- Delourme, R., A.M. Chèvre, H. Brun, T. Rouxel, M.H. Balesdent, J.S. Dias, P. Salisbury, M. Renard, and S.R. Rimmer. 2006. Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**: 41-52.
- Deslandes, L., J. Olivier, N. Peeters, D.X. Feng, M. Khounlotham, C. Boucher, I. Somssich, S. Genin, and Y. Marco. 2003. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 8024-8029.
- Dickson, E.E. and P.L. Forsline. 1994. Collection of wild apple in middle Asia. *Malus* **8**: 11-14.
- Didelot, F., L. Brun, and L. Parisi. 2007. Effects of cultivar mixtures on scab control in apple orchards. *Plant Pathology* **56**: 1014-1022.
- Do Vale, F.X.R., J.E. Parlevliet, and L. Zambolim. 2001. Concepts in plant disease resistance. *Fitopatologia Brasileira* **26**: 577-589.
- Dodds, P.N., G.J. Lawrence, A.M. Catanzariti, T. The, C.I.A. Wang, M.A. Ayliffe, B. Kobe, and J.G. Ellis. 2006. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 8888-8893.
- Dowkiw, A. and C. Bastien. 2007. Presence of defeated qualitative resistance genes frequently has major impact on quantitative resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust in *P. x interamericana* hybrid poplars. *Tree Genetics and Genomes* **3**: 261-274.
- Durel, C.-E., F. Laurens, A. Fouillet, and Y. Lespinasse. 1998. Utilization of pedigree information to estimate genetic parameters from large unbalanced data sets in apple. *Theoretical and Applied Genetics* **96**: 1077-1085.
- Durel, C.-E., L. Parisi, F. Laurens, J.S. Venisse, and M.F. Jourjon. 2000a. Does the *Vf* gene maintain a residual resistance to apple scab despite its breakdown by *Venturia inaequalis* race 6 strains? *Acta Horticulturae* **538**: 575-580.
- Durel, C.-E., W.E. Van de Weg, J.S. Venisse, and L. Parisi. 2000b. Localisation of a major gene scab resistance on the European genetic map of the Prima x Fiesta cross. *IOBC-WPRS Bulletin* **23**: 245-248.
- Durel, C.E., L. Parisi, F. Laurens, W.E.v.d. Weg, R. Liebhard, and M.F. Jourjon. 2003. Genetic dissection of partial resistance to race 6 of *Venturia inaequalis* in apple. *Genome* **46**: 224-234.
- Durel, C.-E., F. Calenge, L. Parisi, W.E. Van de Weg, L.P. Kodde, R. Liebhard, C. Gessler, M. Thiermann, F. Dunemann, F. Gennari, S. Tartarini, and Y. Lespinasse. 2004. An

- overview of the position and robustness of scab resistance QTLs and major genes by aligning genetic maps of five apple progenies. *Acta Horticulturae* **663**: 135-140.
- Durel, C.E., X. Titeca-Beauport, F. Mathis, C. Denancé, B. Petit, F. Lebreton, and F. Laurens. 2005.** Marker-assisted selection for major gene and QTL pyramiding: a practical case study on scab resistance in apple. Plant & Animal Genomes XIII Conference, San Diego, CA, USA, 15-19 January 2005. Available from http://www.intl-pag.org/13/abstracts/PAG13_W132.html [Abstract].
- Evans, R.C. and C.S. Campbell. 2002.** The origin of the apple subfamily (Maloideae; Rosaceae) is clarified by DNA sequence data from duplicated GBSSI genes. *American Journal of Botany* **89**: 1478-1484.
- Faize, M., S. Sourice, F. Dupuis, L. Parisi, M.F. Gautier and E. Chevreau. 2004.** Expression of wheat puroindoline-b reduces scab susceptibility in transgenic apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Science* **167**: 347-354.
- Ferron, P. 1999.** Protection intégrée des cultures : évolution du concept et de son application. *Dossiers de l'Environnement de l'INRA* **19**: 19-28.
- Fillingham, A.J., J. Wood, J.R. Bevan, I.R. Crute, J.W. Mansfield, J.D. Taylor, and A. Vivian. 1992.** Avirulence genes from *Pseudomonas syringae* pathovars *phaseolicola* and *pisi* confer specificity towards both host and non-host species. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **40**: 1-15.
- Fischer, C. 2000.** Search for polygenic scab and mildew resistance in apple varieties cultivated at the fruit genebank Dresden-Pillnitz. *Acta Horticulturae* **538**: 71-77.
- Flachowsky, H., A. Peil, T. Sopanen, A. Elo, and V. Hanke. 2007.** Overexpression of *BpMADS4* from silver birch (*Betula pendula* Roth.) induces early-flowering in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Breeding* **126**: 137-145.
- Flor, H.H. 1965.** Test for allelism of rust resistance genes in flax. *Theoretical and Applied Genetics* **5**: 415-418.
- Flor, H.H. 1971.** Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**: 275-296.
- Forstline, P.L. 1995.** Adding diversity to the national apple germplasm collection: Collecting wild apple in Kazakhstan. *New York Fruit Quarterly* **3**: 3-6.
- Forsline, P.L., E.E. Dickson, and A.D. Dzhangaliev. 1994.** Collection of wild *Malus*, *Vitis* and other fruit species genetic resources in Kazakhstan and neighboring republics. *Hortscience* **29**: 433.
- Forsline, P.L., H.S. Aldwinckle, E.E. Dickson, J. Luby, and S.C. Hokanson. 2003.** Collection, maintenance, characterization, and utilization of wild apple of Central Asia. In *Wild Apple And Fruit Trees of Central Asia*. J.Wiley and Sons (eds.). pp. 1-61.
- Freslon, V., V.G.M. Bus, L. Gianfranceschi, A. Patocchi, and C.E. Durel. 2006.** Identification and genetic characterisation of *Vdr1*, a new major scab resistance gene from the apple cultivar 'Dülmener Rosenapfel'. 3rd International Rosaceae Genomics Conference, Napier, New Zealand, 19-22 March 2006. Available from http://www.bioinfo.wsu.edu/gdr/community/conferences/RG3_abstracts.pdf [Abstract].
- Frey, J.E., B. Frey, C. Sauer, and M. Kellerhals. 2004.** Efficient low-cost DNA extraction and multiplex fluorescent PCR method for marker-assisted selection in breeding. *Plant Breeding* **123**: 554-557.
- Gallais, A. 1989.** Les plans de croisements. In *Théorie de la sélection en amélioration des plantes*. A. Gallais (ed.). Masson, Paris. p. 193.
- Gardiner, S.E., H.C.M. Bassett, D.A.M. Noiton, V.G. Bus, M.E. Hofstee, A.G. White, R.D. Ball, R.L.S. Forster, and E.H.A. Rikkerrink. 1996.** A detailed linkage map around an apple scab resistance gene demonstrates that two disease resistance classes both carry the *Vf* gene. *Theoretical and Applied Genetics* **93**: 485-493.

- Gebhardt, C. and J.P.T. Valkonen. 2001. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annual Review of Phytopathology* **39**: 79-102.
- Geffroy, V., M. Sevig nac, J.C.F. De Oliveira, G. Fouilloux, P. Skroch, P. Thoquet, P. Gepts, T. Langin, and M. Dron. 2000. Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris* and co-localization of quantitative trait loci with genes involved in specific resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 287-296.
- Gessler, C. 1989. Genetics of the interaction *Venturia inaequalis* - *Malus*: the conflict between theory and reality. *IOBC-WPRS Bulletin* **2**: 168-190.
- Gessler, C. and P. Blaise. 1994. Differential resistance in apple against scab and its use in breeding and in orchard planting strategies to control the disease. In *Progress in temperate fruit breeding. Proceedings of the Eucarpia Fruit Breeding Section Meeting, Wadenswil/Einsiedeln, Switzerland, 30 August to 3 September 1993*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Netherlands. pp. 99-104.
- Gessler, C., A. Patocchi, M. Kellerhals, and L. Gianfranceschi. 1997. Molecular marker applied to apple breeding and map-based cloning of resistance genes. *IOBC-WPRS Bulletin* **20**: 105-109.
- Gessler, C., A. Patocchi, S. Sansavini, S. Tartarini, and L. Gianfranceschi. 2006. *Venturia inaequalis* resistance in apple. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**: 473-503.
- Gianfranceschi, L. and V. Soglio. 2004. The European project HiDRAS: innovative multidisciplinary approaches to breeding high quality disease resistant apples. *Acta Horticulturae* **663**: 327-330.
- Gianfranceschi, L., N. Seglias, R. Tarchini, M. Komjanc, C. and Gessler. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theoretical and Applied Genetics* **96**(8): 1069-1076.
- Gupta P.K., S. Rustgi, and P.L. Kulwal. 2005. LD and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology* **57**: 461-485.
- Gygax, M., L. Gianfranceschi, R. Liebhart, M. Kellerhals, C. Gessler, and A. Patocchi. 2004. Molecular markers linked to the apple scab resistance gene *Vbj* derived from *Malus baccata jackii*. *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 1702-1709.
- Hammond-Kosack, K.E. and J.E. Parker. 2003. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* **14**: 177-193.
- Hanocq, E., A. Laperche, O. Jaminon, A.L. Lainé, and J. Le Gouis. 2007. Most significant genome regions involved in the control of earliness traits in bread wheat, as revealed by QTL meta-analysis. *Theoretical and Applied Genetics* **114**: 569-584.
- Harris, S.A., J.P. Robinson, and B.E. Juniper. 2002. Genetic clues to the origin of the apple. *Trends in Genetics* **18**: 426-430.
- Hartl, D.L. and C.H. Taubes. 1996. Compensatory nearly neutral mutations: selection without adaptation. *Journal of Theoretical Biology* **182**: 303-309.
- Heath, M.C. 2000. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 315-319.
- Hemmat, M., N.J. Weeden, A.G. Manganaris, and D.M. Lawson. 1994. Molecular marker linkage map for apple. *Journal of Heredity* **85**: 4-11.
- Hemmat, M., S.K. Brown, and N.F. Weeden. 2002. Tagging and mapping scab resistance genes from R12740-7A apple. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **127**: 365-370.
- Hemmat, M., S.K. Brown, H.S. Aldwinckle, N.F. Weeden, and S.A. Mehlenbacher. 2003. Identification and mapping of markers of resistance to apple scab from 'Antonovka' and 'Hansen's baccata #2'. *Acta Horticulturae* **622**: 153-161.
- Hirst, J.M. and O.J. Stedman. 1962. The epidemiology of apple scab (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.). III. The supply of ascospores. *Annals of Applied Biology* **50**: 551-567.

- Holb, I.J. 2006.** Effect of six sanitation treatments on leaf litter density, ascospore production of *Venturia inaequalis* and scab incidence in integrated and organic apple orchards. *European Journal of Plant Pathology* **115**: 293-307.
- Holb, I.J. 2007.** Effect of four non-chemical sanitation treatments on leaf infection by *Venturia inaequalis* in organic apple orchards. *European Journal of Horticultural Science* **72**: 60-65.
- Holb, I.J., B. Heijne, J.C.M. Withagen, and M.J. Jeger. 2004.** Dispersal of *Venturia inaequalis* ascospores and disease gradients from a defined inoculum source. *Journal of Phytopathology* **152**: 639-646.
- Holb, I.J., B. Heijne, and M.J. Jeger. 2005.** The widespread occurrence of overwintered conidial inoculum of *Venturia inaequalis* on shoots and buds in organic and integrated apple orchards across the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* **111**: 157-168.
- Huang, Y., Z. Li, N. Evans, T. Rouxel, B. Fitt, and M. Balesdent. 2006.** Fitness cost associated with loss of the *AvrLm4* avirulence function in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). *European Journal of Plant Pathology* **114**: 77-89.
- Hulbert, S.H., C.A. Webb, S.M. Smith, and Q. Sun. 2001.** Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Annual Review of Phytopathology* **39**(1): 285-312.
- Hutcheson, S.W. 1998.** Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* **36**: 59-90.
- Jacobsen, E. and H.J. Schouten. 2007.** Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. *Trends in Biotechnology* **25**: 219-223.
- James, D.J., A.J. Passey, D.J. Barbara, and M. Bevan. 1989.** Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Reports* **7**: 658-661.
- James, D.J., A.J. Passey, A.D. Webster, D.J. Barbara, P. Viss, A.M. Dandakar, and S. Uratsu. 1993.** Transgenic apple and strawberries: advance in transformation, introduction of genes for insect resistance and field studies of tissues cultured plants. *Acta Horticulturae* **336**: 179-184.
- James, T.Y., F. Kauff, C.L. Schoch, P.B. Matheny, V. Hofstetter, C.J. Cox, G. Celio, C. Gueidan, E. Fraker, J. Miadlikowska, H.T. Lumbsch, A. Rauhut, V. Reeb, A.E. Arnold, A. Amtoft, J.E. Stajich, K. Hosaka, G.-H. Sung, D. Johnson, B. O'Rourke, M. Crockett, M. Binder, J.M. Curtis, J.C. Slot, Z. Wang, A.W. Wilson, A. Schuszler, J.E. Longcore, K. O'Donnell, S. Mozley-Standridge, D. Porter, P.M. Letcher, M.J. Powell, J.W. Taylor, M.M. White, G.W. Griffith, D.R. Davies, R.A. Humber, J.B. Morton, J. Sugiyama, A.Y. Rossman, J.D. Rogers, D.H. Pfister, D. Hewitt, K. Hansen, S. Hambleton, R.A. Shoemaker, J. Koblmeier, B. Volkmann-Koblmeier, R.A. Spotts, M. Serdani, P.W. Crous, K.W. Hughes, K. Matsuura, E. Langer, G. Langer, W.A. Untereiner, R. Lucking, B. Budel, D.M. Geiser, A. Aptroot, P. Diederich, I. Schmitt, M. Schultz, R. Yahr, D.S. Hibbett, F. Lutzoni, D.J. McLaughlin, J.W. Spatafora, and R. Vilgalys. 2006.** Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443**: 818-822.
- Janick, J. 2006.** The PRI apple breeding program. *Hortscience* **41**: 8-10.
- Janick, J., J.N. Cummins, S.K. Brown, and M. Hemmat. 1996.** Apples. In *Fruit Breeding: Tree and Tropical Fruits*. J. Janick and J.N. Moore (eds.). J. Wiley and Sons, Inc, New York. pp. 1-78.
- Jannink, J.L. and X.L. Wu. 2003.** Estimating allelic number and identity in state of QTLs in interconnected families. *Genetical Research* **81**: 133-144.
- Jannink, J.L., M.C.A.M. Bink, and R.C. Jansen. 2001.** Using complex plant pedigrees to map valuable genes. *Trends in Plant Science* **6**: 337-342.
- Jia, Y., S.A. McAdams, G.T. Bryan, H.P. Hershey, and B. Valent. 2000.** Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO Journal* **19**: 4004-4014.

- Johnson, R. 1981.** Durable resistance: definition of, genetic control and attainment in plant breeding. *Phytopathology* **71**: 567-568.
- Johnson, R. 1984.** A critical analysis of durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **22**: 309-330.
- Jones, J.D.G. and J.L. Dangl. 2006.** The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329.
- Jones, D.A. and D. Takemoto. 2004.** Plant innate immunity - direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Current Opinion in Immunology* **16**: 48-62.
- Jorge, V., A. Dowkiw, P. Faivre-Rampant, and C. Bastien. 2005.** Genetic architecture of qualitative and quantitative *Melampsora larici-populina* leaf rust resistance in hybrid poplar: genetic mapping and QTL detection. *New Phytologist* **167**: 113-127.
- Jørgensen, I.H. 1992.** Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* **63**: 141-152.
- Jourjon, M.F., S. Jasson, J. Marcel, B. Ngom, and B. Mangin. 2005.** MCQTL: multi-allelic QTL mapping in multi-cross design. *Bioinformatics* **21**: 128-130.
- Juniper, B.E. and D.J. Mabberley. 2006.** *The story of the apple*. Timber Press Publishers, Portland. 219p.
- Juniper, B.E., R. Watkins, and S.A. Harris. 1999.** The origin of the apple. *Acta Horticulturae* **484**: 27-33.
- Kellerhals, M., A. Viviani, M. Goerre, and C. Gessler. 1999.** New challenges for apple breeding. *Acta Horticulturae* **484**: 131-134.
- Kelly, J.D. and V.A. Vallejo. 2004.** A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. *Hortscience* **39**: 1196-1207.
- Koch, M. and J.E. Parlevliet. 1991.** Residual effects of the *Xa-4* resistance gene in three rice cultivars when exposed to a virulent isolate of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Euphytica* **55**: 187-193.
- Kolbehdari, D., Z. Wang, J. R. Grant, B. Murdoch, A. Prasad, Z. Xiu, E. Marques, P. Stothard, and S. S. Moore. 2008.** A whole-genome scan to map quantitative trait loci for conformation and functional traits in Canadian Holstein bulls. *Journal of Dairy Science* **91**: 2844-2856.
- Kolmer, J.A. and J.Q. Liu. 2001.** Simple inheritance of partial resistance to leaf rust in two wheat cultivars. *Plant Pathology* **50**: 546-551.
- Korban, S.S. and R.M. Skirvin. 1984.** Nomenclature of the cultivated apple. *Hortscience* **19**: 177-180.
- Kosambi, D.D. 1944.** The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics* **12**: 172-175.
- Lagarrigue, S., F. Pitel, W. Carré, B. Abasht, P. Le Roy, A. Neau, A. Amigues, M. Sourdioux, J. Simon, L. Cogburn, S. Aggrey, B. Leclercq, A. Vignal, and M. Douaire. 2006.** Mapping quantitative trait loci affecting fatness and breast muscle weight in meat-type chicken lines divergently selected on abdominal fatness. *Genetics Selection Evolution* **38**: 85-97.
- Lander, E.S. and D. Botstein. 1989.** Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* **121**: 185-199.
- Lateur, M., B. Lefrancq, and C. Wagemans. 2000.** Influence of scab inoculum concentration in an apple breeding program focused on quantitative resistance. *Acta Horticulturae* **538**: 249-255.
- Laurens, F. 1999.** Review of the current apple breeding programmes in the world: objectives for scion cultivar improvement. *Acta Horticulturae* **484**: 163-170.
- Laurens, F., M. Chevalier, E. Dolega, F. Genneri, M. Goerre, C. Fischer, M. Kellerhals, M. Lateur, B. Lefrancq, L. Parisi, H. Shouten, and S. Tartarini. 2003.** Local European

- cultivars as sources of durable scab resistance in apple. *Acta Horticulturae* **663**: 115-121.
- Le Guen, V., D. Garcia, C.R.R. Mattos, F. Doaré, D. Lespinasse, and M. Seguin. 2007.** Bypassing of a polygenic *Microcyclus ulei* resistance in rubber tree, analyzed by QTL detection. *New Phytologist* **173**: 335-345.
- Leach, J.E., C.M. Vera Cruz, J. Bai, and H. Leung. 2001.** Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology* **39**: 187-224.
- Lebeda, A. 1992.** The level of field resistance to *Bremia lactucae* in lettuce (*Lactuca sativa*) cultivars carrying the resistance gene *Dm11*. *Plant Breeding* **108**(2): 126-131.
- Lecoq, H., B. Moury, C. Desbiez, A. Palloix, and M. Pitrat. 2004.** Durable virus resistance in plant through conventional approaches: a challenge. *Virus Research* **100**: 31-39.
- Lefebvre, V. and A. Palloix. 1996.** Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease: a case study, the interaction pepper-*Phytophthora capsici* Leonian. *Theoretical and Applied Genetics* **93**: 503-511.
- Lespinasse, Y. 1989.** Breeding pome fruits with stable resistance to disease: genes, resistance mechanisms, present work and prospects. *IOBC-WPRS Bulletin* **12**: 100-115.
- Lespinasse, Y. 1990.** Le pommier. In *Amélioration des espèces végétales cultivées*. A. Gallais et H. Bannerot (eds.). INRA Editions. pp. 580-592.
- Lespinasse, Y., C.E. Durel, L. Parisi, F. Laurens, M. Chevalier, and C. Pinet. 2000.** A European project: D.A.R.E. - durable apple resistance in Europe (FAIR5 CT97-3898) durable resistance of apple to scab and powdery-mildew: one step more towards an environmental friendly orchard. *Acta Horticulturae* **538**: 197-200.
- Lespinasse, Y., C. Pinet, F. Laurens, C.-E. Durel, and L. Parisi. 2002.** European research for durable resistance to scab on apple: the DARE project. *Acta Horticulturae* **595**: 17-22.
- Liebhart, R., L. Gianfranceschi, B. Koller, C.D. Ryder, R. Tarchini, W.E.v.d. Weg, and C. Gessler. 2002.** Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Molecular Breeding* **10**: 217-241.
- Liebhart, R., B. Koller, L. Gianfranceschi, and C. Gessler. 2003a.** Creating a saturated reference map for the apple (*Malus pumila* Mill.) genome. *Theoretical and Applied Genetics* **106**: 1497-1508.
- Liebhart, R., B. Koller, A. Patocchi, M. Kellerhals, W. Pfammatter, M. Jermini, and C. Gessler. 2003b.** Mapping quantitative field resistance against apple scab in a 'Fiesta' x 'Discovery' progeny. *Phytopathology* **93**: 493-501.
- Lindhout, P. 2002.** The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica* **124**(2): 217-226.
- Liu, Y. and Z.B. Zeng. 2000.** A general mixture model approach for mapping quantitative trait loci from diverse cross designs involving multiple inbred lines. *Genetics Research* **75**: 345-355.
- Lorang, J.M., T.A. Sweat, and T.J. Wolpert. 2007.** Plant disease susceptibility conferred by a "resistance" gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 14861-14866.
- Lucas, P. 2007.** Le concept de la protection intégrée des cultures. *Innovations Agronomiques* **1**: 15-21.
- MacHardy, W.E. 1996.** *Apple Scab. Biology, Epidemiology, and Management*. APS Press, St Paul, Minnesota. 545p.
- MacHardy, W.E., D.M. Gadoury, and C. Gessler. 2001.** Parasitic and biological fitness of *Venturia inaequalis*: relationship to disease management strategies. *Plant Disease* **85**: 1036-1051.
- Maliepaard, C., F. Alston, G. Van Arkel, L. Brown, E. Chevreau, F. Dunemann, K.M. Evans, S. Gardiner, P. Guilford, A.W. van Heusden, J. Janse, F. Laurens, J.R. Lynn, A.G. Manganaris, A.P.M. den Nijs, N. Periam, E. Rikkerink, P. Roche, C. Ryder, S.**

- Sansavini, H. Schmidt, S. Tartarini, J.J. Verhaegh, M. Vrielink-van Ginkel, and G.J. King. 1998. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. *Theoretical and Applied Genetics* **97**: 60-73.
- Mallard, S., D. Gaudet, A. Aldeia, C. Abelard, A.L. Besnard, P. Sourdille, and F. Dedryver. 2005. Genetic analysis of durable resistance to yellow rust in bred wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **110**: 1401-1409.
- Malnoy, M., Q. Jin, E.E. Borejsza-Wysocka, S.Y. He, and H.S. Aldwinckle. 2007. Overexpression of the apple *MpNPR1* gene confers increased disease resistance in *Malus x domestica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 1568-1580.
- Malnoy, M., M. Xu, E. Borejsza-Wysocka, S.S. Korban, and H.S. Aldwinckle. 2008. Two receptor-like genes, *Vfa1* and *Vfa2*, confer resistance to the fungal pathogen *Venturia inaequalis* inciting apple scab disease. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 448-458.
- Manzanares-Dauleux, M.J., R. Delourme, F. Baron, and G. Thomas. 2000. Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to clubroot in *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics* **101**: 885-891.
- Marcel, T.C., B. Gorguet, M.T. Ta, Z. Kohutova, A. Vels, and R. Niks. 2008. Isolate specificity of quantitative trait loci for partial resistance of barley to *Puccinia hordei* confirmed in mapping populations and near-isogenic lines. *New Phytologist* **177**: 743-755.
- Martin, G.B., A.J. Bogdanove, and G. Sessa. 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 23-61.
- McDonald, B.A. and C. Linde. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 349-379.
- Métraux, J.-P., C. Nawrath, and T. Genoud. 2002. Systemic acquired resistance. *Euphytica* **124**: 237-243.
- Michelmore, R. 1995. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology* **15**: 393-427.
- Michelmore, R.W. and B.C. Meyers. 1998. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Research* **8**: 1113-1130.
- Mills, W.D. and A.A. Laplante. 1951. Control of diseases and insects in the orchard. *Cornell Extension Bulletin* **711**: 21-27.
- Morgan, J. and A. Richards. 1993. *The Book of Apples*. Ebury Press Publishers, London. 304p.
- Mundt, C.C. 2002. Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 381-410.
- Muranty, H. and B. Goffinet. 1997. Selective genotyping for location and estimation of the effect of quantitative trait locus. *Biometrics* **53**: 629-643.
- Mysore, K.S. and C.-M. Ryu. 2004. Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science* **9**: 97-104.
- Nomura, K., M. Melotto, and S.-Y. He. 2005. Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 361-368.
- Nurnberger, T. and V. Lipka. 2005. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology* **6**: 335-345.
- O'Hara, R.B. and J.K.M. Brown. 1996. Frequency- and density-dependent selection in wheat powdery mildew. *Heredity* **77**: 439-447.
- Ohtsuki, A. and A. Sasaki. 2006. Epidemiology and disease-control under gene-for-gene plant-pathogen interaction. *Journal of Theoretical Biology* **238**: 780-794.
- Ori, N., Y. Eshed, I. Paran, G. Presting, D. Aviv, S. Tanksley, D. Zamir, and R. Fluhr. 1997. The *I2C* family from the wilt disease resistance locus *I2* belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *Plant Cell* **9**: 521-532.

- Osborn, A.E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* **8**: 1821-1831.
- Paillard, S., T. Schnurbusch, R. Tiwari, M. Messmer, M. Winzeler, B. Keller, and G. Schachermayr. 2004. QTL analysis of resistance to fusarium head blight in Swiss winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 323-332.
- Parisi, L. and Y. Lespinasse. 1996. Pathogenicity of *Venturia inaequalis* strains of race 6 on apple clones (*Malus sp.*). *Plant Disease* **80**: 1179-1183.
- Parisi, L., Y. Lespinasse, J. Guillaumes, and J. Kruger. 1993. A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the *Vf* gene. *Phytopathology* **83**: 533-537.
- Parisi, L., V. Fouillet, H.J. Schouten, R. Groenwold, F. Laurens, F. Didelot, K. Evans, C. Fischer, F. Gennari, H. Kemp, M. Lateur, A. Patocchi, J. Thissen, and C. Tsipouridis. 2004. Variability of the pathogenicity of *Venturia inaequalis* in Europe. *Acta Horticulturae* **663**: 107-113.
- Parlevliet, J.E. 1993. What is durable resistance, a general outline. In *Durability of disease resistance*. T. Jacobs and J.E. Parlevliet (eds.). Kluwer Academic Publishers. pp. 23-39.
- Parlevliet, J.E. 2002. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica* **124**: 147-156.
- Parlevliet, J.E. and J.C. Zadocks. 1977. The integrated concept of disease resistance: a new view including horizontal and vertical resistance in plants. *Euphytica* **26**: 5-21.
- Patocchi, A., B. Bigler, B. Koller, M. Kellerhals, and C. Gessler. 2004. *Vr2*: a new apple scab resistance gene. *Theoretical and Applied Genetics* **109**: 1087-1092.
- Patocchi, A., M. Walser, S. Tartarini, G.A.L. Broggin, F. Gennari, S. Sansavini, and C. Gessler. 2005. Identification by genome scanning approach (GSA) of a microsatellite tightly associated with the apple scab resistance gene *Vm*. *Genome* **48**: 630-636.
- Patocchi, A., F. Fernández-Fernández, K. Evans, D. Gobbin, F. Rezzonico, A. Boudichevskaia, F. Dunemann, M. Stankiewicz-Kosyl, F. Mathis-Jeanneteau, C.E. Durel, L. Gianfranceschi, F. Costa, C. Toller, V. Cova, D. Mott, M. Komjanc, E. Barbaro, L. Kodde, E. Rikkerink, C. Gessler, W. E. Van de Weg. 2008. Development and test of 21 multiplex PCRs composed of SSRs spanning most of the apple genome. *Tree Genetics and Genome* (in press).
- Pedersen, W.L. and S. Leath. 1988. Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects. *Annual Review of Phytopathology* **26**: 369-378.
- Pflieger, S., A. Palloix, C. Caranta, A. Blattes, and V. Lefebvre. 2001. Defense response genes co-localize with quantitative disease resistance loci in pepper. *Theoretical and Applied Genetics* **103**: 920-929.
- Phipps, J.B., K.R. Robertson, P.G. Smith, and J.R. Rohrer. 1990. A checklist of the subfamily *Maloideae* (*Rosaceae*). *Canadian Journal of Botany* **68**: 2209-2269.
- Pilet, M.L., R. Delourme, N. Foisset and M. Renard. 1998. Identification of loci contributing to quantitative field resistance to blackleg disease, causal agent *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. in winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **96**: 23-30.
- Pink, D. 2002. Strategies using genes for non-durable disease resistance. *Euphytica* **124**: 227-236.
- Qi, X, R.E. Niks, P. Stam, and P. Lindhout. 1998. Identification of QTLs for partial resistance to leaf rust (*Puccinia hordei*) in barley. *Theoretical and Applied Genetics* **96**: 1205-1215.
- Qi, X., F. Fufa, D. Sijtsma, R. Niks, P. Lindhout and P. Stam. 2000. The evidence for abundance of QTL for partial resistance to *Puccinia hordei* on the barley genome. *Molecular Breeding* **6**: 1-9.
- Rafalski, A. 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 94-100.

- Rebaï, A. and B. Goffinet. 2000. More about quantitative trait locus mapping with diallel designs. *Genetics Research* 75: 243-247.
- Rebaï, A., P. Blanchard, D. Perret, and P. Vincourt. 1997. Mapping quantitative trait loci controlling silking date in a diallel cross among four lines in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 451-459.
- Richter, T.E. and P.C. Ronald. 2000. The evolution of disease resistance genes. *Plant Molecular Biology* 42: 195-204.
- Roberts, A.L. and I.R. Crute. 1994. Apple scab resistance from *Malus floribunda* 821 (Vf) is rendered ineffective by isolates of *Venturia inaequalis* from *M. floribunda*. *Norwegian Journal of Agricultural Science* 17: 403-406.
- Robertson, D. 1985. A possible technique for isolating genic DNA for quantitative traits in plants. *Journal of Theoretical Biology* 17: 1-10.
- Rooney, H.C., J.W. Van't Klooster, R.A. Van der Hoorn, M.H. Joosten, J.D. Jones, and P.J. de Wit. 2005. *Cladosporium* Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* 308: 1783-1786.
- Ruffel, S., M.H. Dussault, A. Palloix, B. Moury, M. Bendahmane, C. Robaglia, and C. Caranta. 2002. A natural recessive resistance gene against *Potato virus Y* in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant Journal* 32: 1067-1075.
- Sallaud, C., M. Lorieux, E. Roumen, D. Tharreau, R. Berruyer, P. Svestasrani, O. Garsmeur, A. Ghesquiere, and J.L. Notteghem. 2003. Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 794-803.
- Sapoukhina, N., C.-E. Durel, and B. Le Cam. in prep. Spatial deployment of gene-for-gene resistance reshapes pathogen invasion induced by evolution.
- SAS, I.I. 2000. SAS user's guide: statistics. SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- Sax, K. 1933. The origin of the *Pomoïdeae*. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* 30: 147-150.
- Schafer, J.L. 1999. NORM: Multiple imputation of incomplete multivariate data under a normal model, version 2. Software for Windows 95/98/NT.
- Scherrer, B. 1984. Corrélations et régressions multiples. In *Biostatistique*. Gaëtan Morin, Chicoutimi, Québec, Canada. pp. 690-700.
- Schmidt, H. 2000. Scab attack in an apple seedling field and the relations between fruit and leaf scab. *Acta Horticulturae* 538: 235-237.
- Schön, C.C., M. Lee, A.M. Melchinger, W.D. Guthrie, and W.L. Woodman. 1993. Mapping and characterization of quantitative trait loci affecting resistance against second-generation European corn borer in maize with the aid of RFLPs. *Heredity* 70: 648-659.
- Shay, J.R. and L.F. Hough. 1952. Evaluation of apple scab resistance in selections of *Malus*. *American Journal of Botany* 39: 288-297.
- Shay, J.R. and E.B. Williams. 1953. Physiologic specialization in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 43: 483-484.
- Shoemaker, J.S., I.S. Pter, and B.S. Weir. 1999. Bayesian statistics in genetics: a guide for the uninitiated. *Trends in Genetics* 15: 354-358.
- Sierotzki, H. and C. Gessler. 1998. Genetic analysis of a cross of two *Venturia inaequalis* strains that differ in virulence. *Journal of Phytopathology* 146: 515-519.
- Silfverberg-Dilworth, E., A. Patocchi, E. Belfanti, S. Tartarini, S. Sansavini, and C. Gessler. 2005. *HcrVf2* introduced into Gala confers race-specific scab resistance. Plant and Animal Genomes XIII Conference, San Diego, CA, USA. Available from http://www.intl-pag.org/13/abstracts/PAG13_P501.html [Abstract].
- Silfverberg-Dilworth, E., C.L. Matasci, W.E.v.d. Weg, M.P.W.v. Kaauwen, M. Walser, L.P. Kodde, V. Soglio, L. Gianfranceschi, C.E. Durel, F. Costa, T. Yamamoto, B. Koller,

- C. Gessler, and A. Patocchi. 2006. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *Tree Genetics and Genomes* **2**: 202-224.
- Singh, R.P. and A.K. Gupta. 1992. Expression of wheat leaf rust resistance gene *Lr34* in seedlings and adult plants. *Plant disease* **76**: 489-491.
- Smith, M.W.G. 1971. *National apple register of the United Kingdom*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London. 652p.
- Soriano, J.M., S. Joshi, R. Groenwold, Y. Noordijk, B. Henken, M. Van Kaauwen, and H.J. Schouten. 2008. Identification and mapping of a new apple scab resistance gene. First International Symposium on Biotechnology of Fruit Species, Dresden, Germany, 1-5 September 2008.
- Soufflet-Freslon V., A.B. Kouassi, L. Laurens, F. Mathis, D. Gobbin, A. Patocchi, F. Rezzonico, K. Evans, F. Fernandez, A. Boudichevskaja, F. Dunemann, M. Stankiewicz-Kosyl, M. Komjanc, D. Mott, L. Gianfranceschi, W.E. Van de Weg, M. Bink, and C.E. Durel. 2007. Pedigree-based mapping of scab resistance QTL in apple. XIIth Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics, 16-20 September 2007, Zaragoza, Spain.
- Stahl, E.A. and J.G. Bishop. 2000. Plant-pathogen arms races at the molecular level. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 299-304.
- Stahl, E.A., G. Dwyer, R. Mauricio, M. Kreitman, and J. Bergelson. 1999. Dynamics of disease resistance polymorphism at the *Rpm1* locus of *Arabidopsis*. *Nature* **400**: 667-671.
- Staskawicz, B.J., D. Dahlbeck, and N.T. Keen. 1984. Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on glycine max (L.) Merr. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**: 6024-6028.
- Staskawicz, B.J., F.M. Ausubel, B.J. Baker, J.G. Ellis, and J.D. Jones. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268**: 661-667.
- Stebbins, G.L. 1950. Polyploidy and the origin of higher categories. In *Variation and Evolution in Plants*. Columbia University Press, New York. pp. 359-362.
- Swords, K.M., D. Dahlbeck, B. Kearney, M. Roy, and B.J. Staskawicz. 1996. Spontaneous and induced mutations in a single open reading frame alter both virulence and avirulence in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* avrBs2. *J. Bacteriol.* **178**: 4661-4669.
- Tartarini, S., S. Sansavini, B.A. Vinatzer, F. Gennari, and C. Domizi. 2000. Efficiency of marker assisted selection (MAS) for the *Vf* scab resistance gene. *Acta Horticulturae* **538**: 549-552.
- Tartarini, S., F. Gennari, D. Pratesi, C. Palazzetti, S. Sansavini, L. Parisi, A. Fouillet, V. Fouillet, and C.E. Durel. 2004. Characterisation and genetic mapping of a major scab resistance gene from the old Italian apple cultivar 'Durello Di Forlì'. *Acta Horticulturae* **663**: 129-133.
- Tiffin, P. and D.A. Moeller. 2006. Molecular evolution of plant immune system genes. *Trends in Genetics* **22**: 662-670.
- Uleberg, E. and T. Meuwissen. 2007. Fine mapping of multiple QTL using combined linkage and linkage disequilibrium mapping - A comparison of single QTL and multi QTL methods. *Genetics Selection and Evolution* **39**: 285-299.
- Vallad, G.E. and R.M. Goodman. 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science* **44**: 1920-1934.
- Van't Slot, K.A.E. and W. Knogge. 2002. A dual role for microbial pathogen-derived effector proteins in plant disease and resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences* **21**: 229-271.
- Van de Weg, W.E., H. Jansen, M.C.A.M. Bink, and R. Voorrips. 2003. Pedigree genotyping identifies all favourable alleles. *Prophyta Annual* **2003**: 48-51.

- Van den Bosch, F. and C.A. Gilligan. 2003. Measures of Durability of Resistance. *Phytopathology* **93**: 616-625.
- Van der Plank, J.E. 1968. *Disease resistance in plants*. Academic Press, New York and London. 206p.
- Van Kan, J.A.L., G.F.J.M. Van den Ackerveken, and P.J.G.M. de Wit. 1991. Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene *avr9* of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **4**: 52-59.
- Van Ooijen, J.W. 1992. Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *Theoretical and Applied Genetics* **84**(7-8): 803-811.
- Van Ooijen, J.W. and R.E. Voorrips. 2001. JoinMap 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. *Plant Research International, Wageningen, the Netherlands*.
- Van Ooijen, J.W., M.P. Boer, R.C. Jansen, and C. Maliepaard. 2002. MapQTL 4.0, Software for the calculation of QTL positions on genetic maps. *Plant Research International, Wageningen, the Netherlands*.
- Vavilov, N.I. 1926. Studies on the origin of cultivated plants. *Bulletin of Applied Botany and Plant Breeding* **16**: 139-245.
- Velasco, R.R., A. Zharkikh, M. Troggio, D. Pruss, F. Costa, S. Bhatnagar, M.M. Pindo, J. Lanchbury, D. Micheletti, G. Coppola, A. Mraz, K. Stormo, Q. Tao, R. Bogden, P. Magnago, M. Komjanc, T. Harkins, M. Malnoy, A. Cestaro, P. Baldi, S.S. Salvi, P. Fontana, Gutin, J. Affourtit, F. Salamini, M. Egholm, M. Skolnick, and R. Viola. 2008. The Golden Delicious apple genome sequencing project: progress and perspectives. 4th International Rosaceae Genomics Conference, Pucon, Chile, 16-19 March 2008. Available from <http://www.genomavegetal.cl/rgc4/2007/RGC4-abstract-book.pdf> [Abstract].
- Vera Cruz, C.M., J. Bai, I. Ona, H. Leung, R.J. Nelson, T.W. Mew, and J.E. Leach. 2000. Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 13500-13505.
- Vergne, E., E. Ballini, G. Droc, D. Tharreau, J.L. Nottéghem, and J.B. Morel. 2008. ARCHIPELAGO: a dedicated resource for exploiting past, present, and future genomic data on disease resistance regulation in rice. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **21**: 869-878.
- Verhoeven, K.J.F., J.L. Jannink, and L.M. McIntyre. 2005. Using mating designs to uncover QTL and the genetic architecture of complex traits. *Heredity* **96**: 139-149.
- Vinatzer, B.A., A. Patocchi, L. Gianfranceschi, S. Tartarini, H. Zhang, C. Gessler, and S. Sansavini. 2001. Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with *Vf* apple scab resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 508-515.
- Vinatzer, B.A., A. Patocchi, S. Tartarini, L. Gianfranceschi, S. Sansavini, and C. Gessler. 2004. Isolation of two microsatellite markers from BAC clones of the *Vf* scab resistance region and molecular characterization of scab-resistant accessions in *Malus* germplasm. *Plant Breeding* **123**: 321-326.
- Visker, M.H., L.C. Keizer, H.J. Van Eck, E. Jacobsen, L.T. Colon, and P.C. Struik. 2003. Can the QTL for late blight resistance on potato chromosome 5 be attributed to foliage maturity type. *Theoretical and Applied Genetics* **106**: 317-325.
- Voorrips, R.E. 2007. Pedimap: Software for visualization of genetic and phenotypic data in pedigrees. *Plant Research International, Wageningen, the Netherlands*.
- Wang, Z.L., L.H. Li, Z.H. He, X.Y. Duan, Y.L. Zhou, X.M. Chen, M. Lillemo, R.P. Singh, H. Wang, and X.C. Xia. 2005. Seedling and adult plant resistance to powdery mildew in Chinese bread wheat cultivars and lines. *Plant Disease* **89**: 457-463.

- Watanabe, N. and E. Lam. 2006.** The Hypersensitive Response in Plant Disease Resistance. In *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants*. S. Tuzun and E. Bent (eds.). Birkäuser Publishers. pp. 83-111.
- Williams, E.B. and A.G. Brown. 1968.** A new physiologic race of *Venturia inaequalis*, incitant of apple scab. *Plant Disease Reporter* **52**: 799-801.
- Williams, E.B. and D.F. Dayton. 1968.** Four additional sources of the *Vf* locus for *Malus* scab resistance. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* **92**: 95-98.
- Williams, E.B. and J. Kuc. 1969.** Resistance in *Malus* to *Venturia Inaequalis*. *Annual Review of Phytopathology* **7**: 223-246.
- Williams, E.B. and J.R. Shay. 1957.** The relationship of genes for pathogenicity and certain other characters in *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *Genetics* **42**: 704-711.
- Wu, R. L., C.X. Ma, and G. Casella. 2002.** Joint linkage and linkage disequilibrium mapping of quantitative trait loci in natural populations. *Genetics* **160**: 779-792.
- Xu, M. and S.S. Korban. 2002.** A cluster of four receptor-like genes resides in the *Vf* locus that confers resistance to apple scab disease. *Genetics* **162**: 1995-2006.
- Xu, M. and S.S. Korban. 2004.** Somatic variation plays a key role in the evolution of the *Vf* gene family residing in the *Vf* locus that confers resistance to apple scab disease. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **32**: 57-65.
- Xu, S. and C. Vogl. 2000.** Maximum likelihood analysis of quantitative trait loci under selective genotyping. *Heredity* **84**: 525-537.
- Yang, Y.N., Q.P. Yuan, and D.W. Gabriel. 1996.** Watersoaking function(s) of *XcmH1005* are redundantly encoded by members of the *Xanthomonas avr/pth* gene family. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **9**: 105-113.
- Yi, N. and D. Shriner. 2008.** Advances in Bayesian multiple quantitative trait loci mapping in experimental crosses. *Heredity* **100**: 240-252.
- Young, N.D. 1996.** QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology* **34**: 479-501.
- Zadocks, J.C. 1993.** The partial past. In *Durability of disease resistance*. T. Jacobs and J.E. Parlevliet (eds.). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 11-22.
- Zhang, H. and D.R. Knott. 1993.** Inheritance of adult plant resistance to leaf rust in six durum wheat cultivars. *Crop Science* **33**: 694-697.
- Zhu, L., X. Li, and M. Welander. 2008.** Overexpression of the *Arabidopsis gai* gene in apple significantly reduces plant size. *Plant Cell Reports* **27**: 289-296.
- Zhu, Y., H. Chen, J. Fan, Y. Wang, Y. Li, J. Chen, J. Fan, S. Yang, L. Hu, H. Leung, T.W. Mew, P.S. Teng, Z. Wang, and C.C. Mundt. 2000.** Genetic diversity and disease control in rice. *Nature* **406**: 718-722.
- Zipfel, C. and G. Felix. 2005.** Plants and animals: a different taste for microbes? *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 353-360.
- Zohary, D. and P. Spiegel-Roy. 1975.** Beginnings of fruit growing in the old world. *Science* **187**: 319-327.

Résistance du pommier à la tavelure (*Venturia inaequalis*) : Recherche de nouveaux loci et construction de génotypes "prototypes" en vue d'une gestion durable de la résistance.

Résumé. A l'échelle mondiale, la majorité des variétés de pommier cultivées (*Malus x domestica*) sont sensibles à la tavelure (champignon *Venturia inaequalis*). La lutte génétique est une des voies privilégiées pour réduire drastiquement le nombre d'applications fongicides en verger commercial. Les stratégies actuelles de lutte génétique reposent principalement sur l'utilisation de quelques gènes majeurs. Le contournement du gène majeur *Vf*, introgressé de l'espèce sauvage *M. floribunda*, montre clairement les limites de telles stratégies de sélection. Dans un tel contexte, ce projet de thèse visait à étudier les facteurs de résistance du pommier à la tavelure dans l'optique d'une gestion durable de la résistance face aux capacités d'adaptation de l'agent pathogène. Deux axes ont été abordés : (i) recherche de nouveaux loci de résistance chez la variété résistante 'Dülmener Rosenapfel' et dans un ensemble de descendances du programme d'amélioration INRA connectées par leur pedigree ; (ii) combinaison de différents facteurs de résistance (majeure et partielle) dans un plan de croisement demi-diallele, et comparaison de l'efficacité relative de ces constructions génétiques vis-à-vis de la variabilité de l'agent pathogène. Un nouveau gène majeur, *Rvi14*, a été caractérisé chez la variété 'Dülmener Rosenapfel', ainsi que deux QTL : le premier co-localise avec *Rvi14*, et le second avec un QTL à large spectre d'action déjà identifié dans d'autres fonds génétiques. L'étude de la population en pedigree a confirmé l'occurrence fréquente d'un polymorphisme à ce second QTL et a mis en évidence différents allèles à un troisième QTL co-localisant avec le gène *Vf*. L'analyse des différentes combinaisons génétiques a permis d'initier la modélisation du niveau de résistance des génotypes de pommier en fonction des loci de résistance portés et face aux souches/races du champignon auxquelles ils sont confrontés. Les résultats obtenus au cours de ce travail sont le support d'une réflexion sur l'efficacité des méthodes de détection de loci de résistance et sur l'utilisation de ces loci en vue d'une gestion durable de la résistance.

Mots clés : *Malus x domestica*, *Venturia inaequalis*, résistance génétique, cartographie génétique, gènes majeurs, QTL, modèle génétique, construction de génotypes.

Apple scab: Looking for new resistance loci and construction of "prototype" genotypes for a durable resistance management.

Abstract. Worldwide, most of cultivated apple varieties (*Malus x domestica*) are susceptible to scab (fungus *Venturia inaequalis*). Genetic resistance is a major tool to reduce the amounts of fungicides in commercial orchards. Current strategies of genetic control are mainly based on the use of few major genes. The breakdown of the *Vf* major gene, introgressed from the wild species *M. floribunda*, clearly shows the limits of such breeding strategies. In such a context, the objective of this thesis is to study apple scab resistance factors for a durable management of the resistance in front of pathogen adaptation capacity. Two approaches were applied: (i) searching new resistance loci in the resistant variety 'Dülmener Rosenapfel' and within a pedigreed population of the INRA breeding programme; (ii) recombination of different (major and partial) resistance factors in a half-diallel design, and comparison of the relative efficiency of these genetic combinations towards pathogen variability. A new major gene, *Rvi14*, was characterised in the variety 'Dülmener Rosenapfel', together with two QTL: the first one co-localised with *Rvi14*, and the second one with a broad-spectrum QTL already identified in other genetic backgrounds. The study of the pedigreed population confirmed the frequent polymorphism at this second QTL and revealed different alleles at a third QTL co-localising with the *Vf* gene. The analysis of different genetic combinations allowed us to develop a model assessing the resistance level of apple genotypes according to the resistance factors they carry and the fungal isolates/races they face. The gained results induced a general discussion on the efficiency of resistance loci detection methods and the use of these loci for a durable management of the resistance.

Key words: *Malus x domestica*, *Venturia inaequalis*, genetic resistance, genetic mapping, major genes, QTL, genetic model, construction of genotypes.