



HAL
open science

**Cartographie génétique et étude de QTL conférant la
résistance au nématode à kyste *Globodera pallida*
(Stone) chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum*
ssp. *tuberosum* L.)**

Bernard Caromel

► **To cite this version:**

Bernard Caromel. Cartographie génétique et étude de QTL conférant la résistance au nématode à kyste *Globodera pallida* (Stone) chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L.). Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Sud - Paris 11, 2004. Français. NNT: . tel-02831072

HAL Id: tel-02831072

<https://hal.inrae.fr/tel-02831072>

Submitted on 7 Jun 2020

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.

N° D'ORDRE :



THESE

Présentée

Pour obtenir

Le GRADE de DOCTEUR EN SCIENCES

DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY

PAR

Bernard CAROMEL

Sujet : Cartographie génétique et étude de QTL conférant la résistance au nématode à kyste *Globodera pallida* (Stone) chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L.)

Soutenue le 6 octobre 2004 devant la commission d'examen composée de :

Michel Dron	Président
Pierre Abad	Rapporteur
Philippe Lashermes	Rapporteur
Dominique de Vienne	Examineur
Bernard Mignotte	Examineur
Véronique Lefebvre	Directrice de thèse

Remerciements

Je dédie cette thèse à Françoise Rousselle-Bourgeois qui nous a quittée il y a presque un an. Tout au long de la rédaction de cette thèse, sa grande connaissance de la pomme de terre et nos discussions tant amicales que scientifiques m'ont constamment manquées. De tout cœur, je la remercie pour tout ce qu'elle m'a apporté pendant les huit années où nous avons travaillé ensemble.

Véronique Lefebvre m'a encadré pendant la réalisation de cette thèse. Son aide a été précieuse depuis la rédaction de mon sujet jusqu'à la préparation de ma soutenance. L'esthétique étant une qualité plutôt féminine, elle est à l'origine d'une grande partie des figures de ce manuscrit. Je ne la remercierai jamais assez pour le temps qu'elle m'a consacré, et en particulier pour avoir passé une partie de ses vacances à corriger mon manuscrit.

Mon jury de thèse est composé de personnalités émérites. Je remercie Pierre Abad et Philippe Lashermes d'avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteurs de ma thèse. Sous la direction de Bernard Mignotte, j'ai réalisé mon mémoire de l'EPHE qui m'a permis de m'inscrire en thèse. Qu'il en soit remercié, ainsi que pour sa participation à ce jury. Merci également à Dominique de Vienne et à Michel Dron d'avoir accepté de participer à ce jury. Nos discussions ont toujours été fructueuses et je suis persuadé qu'elles vont se poursuivre sur ce mode (en particulier pendant ma soutenance...).

Je remercie Alain Palloix pour toutes ses corrections et pour les discussions sans fin que nous avons eu sur la durabilité des résistances et sur les ours de l'Alaska.

Je remercie Patrick Rousselle, directeur de l'unité de Génétique et d'Amélioration des Fruits et Légumes de l'INRA d'Avignon, pour son accueil, les facilités matérielles et le temps dont il m'a laissé disposer pour la réalisation de cette thèse.

Cette thèse a été réalisée en collaboration étroite avec l'UMR BiO3P du Rheu. Je remercie Didier Mugniéry, ainsi que les membres de son équipe technique Didier Fouville et Claudia Rouaux, pour la réalisation des différents tests de résistance. Qu'il soit également remercié pour la connaissance qu'il m'a transmise sur les nématodes et pour son aide dans l'interprétation des résultats.

L'UMR APBV de Ploudaniel a également pris une part très active dans la réalisation de cette thèse. Je remercie Marie-Claire Kerlan, Daniel Ellissèche, Jean-Eric et Laura Chauvin, pour toutes les informations qu'ils m'ont apportées sur la pomme de terre, et pour avoir organisé la création du matériel végétal. Merci également à Jean-Paul Dantec qui a réalisé les croisements et la multiplication du matériel végétal utilisé au cours de cette thèse

Nadia Lama, Sandra Andrzejewski, et Peggy Cavallin ont participé à la construction des cartes génétiques. Qu'elles soient remerciées pour toute l'aide qu'elles m'ont apportée. Je remercie également Cécile Bres pour son aide lors de l'alignement des cartes génétiques avec la carte UHD de la pomme de terre.

Un grand merci également à Benoît Moury et Herman van Eck pour leur relecture critique de l'article sur la résistance originaire de *Solanum sparsipilum* et pour toutes les discussions que nous avons eues.

Je remercie Mathilde Causse et Michel Pitrat pour l'aide qu'ils m'ont apporté en statistique, et particulièrement Mathilde pour la fourniture de certains programmes et les explications les concernant. Je remercie également Carole Caranta et Catherine Dogimont pour les discussions que nous avons eues sur les gènes de résistance. Mireille Faurobert a accepté de jouer les "candides" lors de mes répétitions de soutenance et je l'en remercie vivement.

Les échanges de références bibliographiques avec mes collègues thésards m'ont été très profitables. Un grand merci à Amandine Carmelle, Sandrine Ruffel, Abou Kouassi, Laure Perchepped, Jamila Chaib et Julien Bonnet.

La réalisation d'une thèse est impossible sans disposer d'un outil informatique performant. Je remercie Vincent Masdupuy, René Damidaux, et Jean-Paul Bouchet de m'avoir souvent sorti de mauvaises passes lors de l'utilisation de cet outil.

Je remercie Catherine Bastien et Maria Manzanaras d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse. Leurs suggestions ont été précieuses.

Je remercie Christiane Gebhardt qui m'a fourni la carte des gènes de résistance de la pomme de terre.

Rebecca Stevens et Cindy Morris m'ont donné des coups de main en anglais, et Anne Blattes, Philippe Duffé, Patrick Signoret, Marie-Laure Lessage, Bruno Jouau, Patrick Lambert, Cécile Garchery et Stéphane Muñoz en biologie moléculaire. Qu'ils en soient remerciés.

Je ne remercie pas Denise Tancelin de la DGSNR, qui m'a fait perdre des semaines précieuses à refaire un dossier d'habilitation à manipuler des radioéléments, en me donnant pour seule base de calcul des numéros de circulaires ou des références du journal officiel.

La vie de thésard en fin de rédaction est souvent difficilement compatible avec la vie de famille. Merci à Pascale et Ulysse d'avoir vaillamment supporté mes périodes de stress et l'absence de vacances même en période de canicule avignonnaise. Ayant tendance à randomiser l'usage du "s" pour les singuliers et les pluriels, Pascale a eu la lourde tâche de les remettre tous à leur place. Pour cela et pour bien d'autres choses encore je les en remercie.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	13
1 INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	15
1.1 LA POMME DE TERRE	15
1.1.1 <i>La pomme de terre : généralités</i>	15
1.1.2 <i>La sélection au niveau diploïde</i>	16
1.1.3 <i>Génétique et génomique de la pomme de terre</i>	20
1.1.4 <i>Principaux bioagresseurs</i>	27
1.2 LES NEMATODES	30
1.2.1 <i>Généralités</i>	30
1.2.2 <i>Taxinomie</i>	30
1.2.3 <i>Différences entre nématodes à galles et nématodes à kyste</i>	31
1.3 GENES IMPLIQUES DANS L'INTERACTION PLANTE-NEMATODE, ET RESISTANCE AUX NEMATODES ENDOPARASITES CHEZ LES SOLANACEES.....	35
1.4 LA RESISTANCE AUX NEMATODES ENDOPARASITES CHEZ LES SOLANACEES	37
1.4.1 <i>Etapas du cycle du nématode sur lesquelles peuvent agir les gènes de résistance</i> ...	37
1.4.2 <i>Les sources de résistance aux nématodes chez les Solanacées</i>	39
1.4.3 <i>Hérédité et cartographie des facteurs génétiques de résistance aux nématodes chez la tomate et le piment</i>	42
1.4.4 <i>Hérédité et cartographie des facteurs génétiques de résistance aux nématodes chez la pomme de terre</i>	42
1.5 REPARTITION DES FACTEURS DE RESISTANCE SUR LE GENOME DES SOLANACEES	45
1.6 STRUCTURE DES GENES DE RESISTANCE AUX NEMATODES CLONES A CE JOUR	46
2 MATERIEL ET METHODES	48
2.1 MATERIEL VEGETAL.....	48
2.2 POPULATIONS DE <i>G. PALLIDA</i>	49
2.3 TESTS DE RESISTANCE A <i>GLOBODERA PALLIDA</i>	49
2.3.1 <i>Pour la cartographie de QTL et la mesure du niveau d'agressivité des huit populations de G. pallida</i>	49
2.3.2 <i>Pour l'analyse de l'effet des QTL sur le développement de G. pallida</i>	50
2.4 MESURE DU POIDS SEC DE RACINES	50
2.5 EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE	50
2.6 MARQUEURS MOLECULAIRES	51
2.7 METHODES D'ANALYSES STATISTIQUES.....	52
2.7.1 <i>Analyses descriptives des tests de résistances à G. pallida</i>	52
2.7.2 <i>Construction des cartes génétiques</i>	53
2.7.3 <i>Détection des QTL</i>	54
2.7.4 <i>Analyse de l'effet des QTL de résistance sur le cycle de développement de G. pallida et sur le niveau d'agressivité de huit populations</i>	55

3	LES CARTES GENETIQUES	57
3.1	INTRODUCTION.....	57
3.2	RESULTATS	57
3.2.1	<i>Cartes génétiques de Rosa H1 et spg334.19.....</i>	<i>57</i>
3.2.2	<i>Cartes génétiques de Caspar H3 et de spl329.18.....</i>	<i>59</i>
3.3	DISCUSSION.....	60
3.3.1	<i>Comparaison et utilisation des cartes génétiques comportant des marqueurs RFLP communs à plusieurs espèces</i>	<i>60</i>
3.3.2	<i>Analyse des biais de ségrégation</i>	<i>62</i>
3.3.3	<i>Taille des cartes génétiques</i>	<i>66</i>
4	ETUDE DE LA RESISTANCE A G. PALLIDA ORIGINAIRE DE S. SPARSIPILUM...68	
4.1	INTRODUCTION.....	68
4.2	RESISTANCE QTLs ORIGINATING FROM <i>SOLANUM SPARSIPILUM</i> ACT INDEPENDENTLY ON THE SEX-RATIO OF <i>GLOBODERA PALLIDA</i> AND TOGETHER FOR DEVELOPING A NECROTIC REACTION 69	
4.3	COMPLEMENT A L'ARTICLE.....	81
4.3.1	<i>Détection des QTL de résistance</i>	<i>81</i>
4.3.2	<i>Etude de l'effet des QTL sur le développement de G. pallida.....</i>	<i>81</i>
5	ETUDE DE LA RESISTANCE A G. PALLIDA ORIGINAIRE DE S. SPEGAZZINII83	
5.1	INTRODUCTION.....	83
5.2	MAPPING QTLs FOR RESISTANCE AGAINST <i>GLOBODERA PALLIDA</i> (STONE) PA2/3 IN A DIPLOID POTATO PROGENY ORIGINATING FROM <i>S. SPEGAZZINII</i>	83
5.3	COMPLEMENTS A L'ARTICLE.....	91
5.3.1	<i>Résultats.....</i>	<i>91</i>
5.3.2	<i>Discussion.....</i>	<i>94</i>
6	NIVEAU D'AGRESSIVITE DE POPULATIONS DE G. PALLIDA SUR DES CLONES PORTANT LES QTL DETECTES CHEZ S. SPARSIPILUM, S. SPEGAZZINII, ET S. TUBEROSUM	97
6.1	RESULTATS	97
6.1.1	<i>Niveau de résistance conféré par les QTL originaires de S. sparsipilum.....</i>	<i>97</i>
6.1.2	<i>Niveau de résistance conféré par les QTL originaires de S. spegazzinii et S. tuberosum</i>	<i>99</i>
6.2	DISCUSSION.....	100
7	GENES CANDIDATS	104
7.1	INTRODUCTION.....	104
7.2	LES GENES <i>GPA2/RX/RX2</i> DE LA POMME DE TERRE	104

8	CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	107
8.1	IMPLICATION DES RESULTATS DE LA THESE POUR LA SELECTION POUR LA RESISTANCE A <i>G. PALLIDA</i> CHEZ LA POMME DE TERRE	107
8.2	CARACTERISATION MOLECULAIRE DE $GPAV^{\delta}_{SPL}$ ET $GPAV^{\delta}_{SPG}$	110
8.3	DEUX QTL DE RESISTANCE SONT NECESSAIRES AU DECLENCHEMENT D'UNE REACTION NECROTIQUE.....	111
8.4	PERSPECTIVES A COURT TERME	113
9	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	114

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1 : Carte génétique de la pomme de terre réalisée par Tanksley et al. (1992) avec des sondes RFLP de tomate.

Figure 1.2 : Extrait de la carte génétique comparative de *S. tuberosum* avec *A. thaliana*.

Figure 1.3 : Arbre phylogénétique du phylum *Nematoda*.

Figure 1.4 : Cycle de développement des nématodes à kyste.

Figure 1.5 : Carte fonctionnelle de la pomme de terre pour la résistance aux bioagresseurs.

Chapitre 2

Figure 2.1 : Matériel végétal utilisé pour la recherche de QTL.

Chapitre 3

Figure 3.1 : Cartes génétiques de Rosa H1 et spg334.19 alignées avec la carte génétique de la tomate.

Figure 3.2 : Pourcentage du génome de la tomate couvert par les cartes génétiques de Rosa H1 et spg334.19

Figure 3.3 : Carte génétique de Caspar H3.

Figure 3.4 : Carte génétique de spl329.18.

Figure 3.5 : Alignement des cartes génétiques de RH et SH (cartes UHD) avec la carte de la tomate en utilisant la carte génétique de Rosa H1 comme carte pont.

Chapitre 4

Figure 4.1 : Frequency distribution of *G. pallida* Pa2/3 resistance scores.

Figure 4.2 : QTL for the *G. pallida* Pa2/3 resistance.

Figure 4.3 : Frequency distribution of *G. pallida* Pa2/3 adjusted mean cyst number for clones possessing different allele combinations at the *GpaV^{spl}* and *GpaXI^{spl}*.

Figure 4.4 : Percentage of *G. pallida* reaching the J2/J3, male, or female developmental stage in 20 roots of four chosen clones carrying different allele combinations at the *GpaV^{spl}* and *GpaXI^{spl}* QTLs.

Figure 4.5 : Distribution des clones des deux séries 00D53 et 96D31 pour la résistance à *G. pallida*.

Figure 4.6 : Courbes de LOD des QTL *GpaV^{spl}* et *GpaXI^{spl}* détectés par CIM dans les deux séries de clones issus de croisements entre Caspar H3 et spl329.18.

Chapitre 5

Figure 5.1 : QTL de résistance à *G. pallida* détectés par CIM dans la descendance 96D32.

Figure 5.2 : Représentation du critère de résistance en fonction du développement racinaire.

Figure 5.3 : QTL de poids du système racinaire, détectés par CIM dans la descendance 96D32 (Rosa H1 x spg334.19).

Figure 5.4 : Pourcentage de nématodes retrouvés aux différents stades dans 20 racines de clones possédant différentes combinaisons d'allèles aux QTL $GpaV^{spg}$, $GpaVI^{spg}$, $GpaXII^{spg}$, $GpaVIII^{tbr}$, et $GpaXI^{tbr}$.

Chapitre 6

Figure 6.1 : Niveau d'agressivité de 8 populations de *G. pallida* sur des clones de pomme de terre possédant différentes combinaisons alléliques aux QTL de résistance détectés dans les descendance Rosa H1 x spg334.9 et Caspar H3 x spl329.18.

Figure 6.2 : Comparaison du niveau d'agressivité de huit populations de *G. pallida* sur trois clones possédant les allèles de résistance au QTL à effet fort $GpaV^{spi}$ et sur le clone 96D32.17 qui possède les allèles de résistance aux QTL originaires de Rosa H1 et spg334.19.

Figure 6.3 : Comparaison du niveau d'agressivité de huit populations de *G. pallida* sur des clones de pomme de terre résistants, originaires de trois espèces différentes apparentées à *Solanum tuberosum*.

Chapitre 7

Figure 7.1 : Position des gènes *Gpa2*, *Rx* et *Rx2* sur les chromosomes de la tomate ou de la pomme de terre.

Figure 7.3 : Localisation des homologues des gènes *Gpa2*, *Rx*, et *Rx2* sur les cartes génétiques de Caspar H3, Rosa H1, spl329.18, et spg334.19.

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1.1 : Gènes et QTL de résistance aux nématodes, cartographiés chez les Solanacées

Tableau 1.2 : Distinction des pathotypes de *G. pallida* et *G. rostochiensis*.

Chapitre 2

Tableau 2.1 : Combinaisons AFLP analysées dans les différentes descendance de pomme de terre.

Tableau 2.2 : Marqueurs microsatellites analysées dans les différentes descendance de pomme de terre.

Tableau 2.3 : Amorces et adaptateurs utilisés pour cartographier les homologues des gènes *Gpa2*, *Rx*, et *Rx2*.

Chapitre 3

Tableau 3.1 : Caractéristiques des cartes génétiques des parents des deux descendance (Rosa H1 x spg334.19) et (Caspar H3 x spl329.18)

Chapitre 4

Tableau 4.1 : PCR primers designed for markers of the potato chromosome V.

Chapitre 5

Tableau 5.1 : Caractéristiques des QTL de résistance détectés dans la descendance 96D32, issue du croisement Rosa H1 x spg334.19.

Tableau 5.2 : Epistasies affectant le Log(nombre de kyste + 1), détectées entre des zones génomiques de Rosa H1.

Tableau 5.3 : Caractéristique des QTL de poids du système racinaire détectés dans la descendance 96D32, issue du croisement Rosa H1 x spg334.19.

Chapitre 6

Tableau 6.1 : Niveau d'agressivité de 8 populations de *G. pallida* sur des clones possédant les différentes combinaisons alléliques aux QTL détectés sur le génome de spl329.18.

Tableau 6.2 : Combinaisons alléliques aux QTL de résistance à *G. pallida* chez 5 clones de pomme de terre utilisés pour étudier le niveau d'agressivité de huit populations de *G. pallida*.

Tableau 6.3 : Niveau d'agressivité de 8 populations de *G. pallida* sur des clones possédant des combinaisons alléliques différentes aux QTL détectés sur les génomes de Rosa H1 et spg334.19.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine Tri Phosphate
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
bp	paire de bases
CC	coiled coil
CIM	Composite Interval Mapping
cM	centimorgan
CPC	Commonwealth Potato Collection
IM	Interval Mapping
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
kb	kilo paire de bases
LOD	Logarithm of the Odds ratio
LRR	Leucine Rich Repeat
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolaire
NBS	Nucleotide Binding Site
p	probabilité
PCR	Polymerase Chain Reaction
QTL	Quantitative Trait Loci
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNase	Ribonucléase
SGN	Solanaceae Genomic Network
<i>sp.</i>	<i>species</i> (toutes espèces)
<i>ssp.</i>	<i>sub species</i> (sous espèce)
TIR	Toll Interleukin Receptor
U	Unité enzymatique
UHD	Ultra Haute Densité
UV	Ultra-violet
°C	degré Celcius
µl	microlitre
µM	micromolaire
YAC	Yeast Artificial Chromosome

Liste des sites WEB

APOPHYS : <http://www.dpw.wau.nl/pv/projects/apophys/>
Bejin Genomic Institut : <http://btn.genomics.org.cn:8080/rice/>
FAOSTAT : <http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>
GeneBank : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>
IRGSP (International Rice Genome Sequencing Project) :
<http://rgp.dna.affrc.go.jp/IRGSP/index.html>
International Solanaceae Genome Project : <http://www.sgn.cornell.edu/solanaceae-project/>
Medicago truncatula Genome : <http://medicago.org/genome/>
NCBI Taxonomy : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>
NEMAPLEX : <http://plpnemweb.ucdavis.edu/nemaplex/>
PoMaMo : <http://gabi.rzpd.de/PoMaMo.html>
SGN (Solanaceae Genomic Network) : <http://www.sgn.cornell.edu/>
SGN COS markers : http://www.sgn.cornell.edu/markers/cos_markers.html
SGN Tomato SSR : http://www.sgn.cornell.edu/cgi-bin/legacy/microsats_top.pl
TAIR (The Arabidopsis Information Ressource) : <http://www.Arabidopsis.org>
TIGR (The Institut For Genomic Research) Potato EST : <http://www.tigr.org/tdb/potato/>
TIGR Potato Gene Index : http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=potato
TIGR Potato SSR : <http://www.tigr.org/tdb/potato/SSR.shtml>
TIGR Tomato EST : <http://www.tigr.org/tdb/tgi/lgi/>
TIGR Tomato Gene Index : http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=tomato
TIMRI (Torrey Mesa Research Institute) : www.tmri.org
UHD Potato Map : <http://potatodbase.dpw.wau.nl/UHDdata.html>

Introduction générale

Introduction générale

Les nématodes à kyste (*Globodera pallida* et *G. rostochiensis*) sont, avec l'agent du mildiou *Phytophthora infestans*, les bioagresseurs les plus dommageables pour la pomme de terre (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) dans les zones de culture à climat tempéré. Ils sont inscrits sur la liste des parasites de quarantaine dans les pays de l'Union Européenne et en Amérique du Nord. La lutte chimique contre les nématodes à kyste est particulièrement polluante et les produits de désinfection des sols les plus efficaces vont être prochainement interdits dans les pays de l'Union Européenne. Les techniques culturales, telles que les plantations précoces ou les rotations longues, sont difficiles à mettre en œuvre d'un point de vue technique ou économique. C'est pourquoi la création de variétés résistantes devient une priorité dans les programmes de sélection.

Aucune résistance de haut niveau à *G. pallida* n'est présente dans le fonds génétique de la *S. tuberosum*. La station d'amélioration de la pomme de terre de l'INRA de Ploudaniel a donc initié, dans les années 1980, des programmes de d'introgression de résistance à *G. pallida* à partir d'espèces sauvages, apparentées à la pomme de terre. Les nématodes étant des parasites de quarantaine, seul le laboratoire de nématologie de l'UMR BiO3P du centre de Rennes est habilité à manipuler ces parasites à l'INRA et a en charge la réalisation des tests de résistance et les études phénotypiques concernant l'interaction pomme de terre-*G. pallida*.

Les résistances originaires des espèces apparentées à la pomme de terre ont un déterminisme génétique polygénique. Bien que des variétés féculières de pomme de terre aient été inscrites au catalogue, la sélection phénotypique n'a pas permis, jusqu'à aujourd'hui, la création de variétés de pomme de terre de consommation ayant un haut niveau de résistance à *G. pallida*.

Les marqueurs moléculaires facilitent la décomposition de résistances complexes en facteurs génétiques simples (QTL) cartographiés sur le génome. L'INRA d'Avignon a développé des programmes de cartographie du génome de Solanacées depuis la fin des années 1980. Les programmes de cartographie du génome de la pomme de terre y ont démarré en 1996. Ils ont bénéficié des travaux plus avancés sur d'autres espèces de Solanacées et ont pu tirer partie de la synténie existant entre les génomes de ces espèces.

L'objectif de cette thèse est d'analyser le déterminisme génétique de deux sources de résistance à *G. pallida*, originaires des espèces sauvages diploïdes *S. sparsipilum* et *S. spegazzinii*, d'étudier l'effet des QTL détectés sur le cycle de développement de *G. pallida*, et d'analyser le niveau de résistance conféré par les différentes combinaisons alléliques aux QTL détectés sur différentes populations de *G. pallida*.

Ce manuscrit est organisé en huit chapitres. L'introduction bibliographique (Chapitre 1) présente d'abord les deux membres de l'interaction étudiée, la pomme de terre et les nématodes, avec en particulier une description des spécificités de la sélection au niveau diploïde chez une espèce tétraploïde comme la pomme de terre et un inventaire des ressources génomiques disponibles chez cette espèce. Ensuite, les gènes impliqués dans l'interaction plante-nématode, la résistance aux nématodes chez les Solanacées et l'organisation des gènes de résistance aux bioagresseurs sur le génome des Solanacées, sont décrits.

Après avoir présenté le matériel et les méthodes utilisés au cours de ce travail (Chapitre 2), les résultats obtenus sont présentés dans les quatre chapitres suivants. Une description des cartes génétiques est donnée dans le chapitre 3. L'analyse du déterminisme génétique de la résistance originaire de deux espèces sauvages de pomme de terre, et de l'effet des QTL détectés sur le cycle de développement de *G. pallida* ont fait l'objet d'articles dont un est soumis à *Molecular Plant-Microbe Interaction* (Chapitre 4) et l'autre publié dans *Theoretical and Applied Genetics* (Chapitre 5). Une étude de la résistance conférée par les QTL détectés face à une gamme de populations de *G. pallida*, connues pour avoir une agressivité différente sur d'autres sources de résistance que celles étudiées, est rapportée au chapitre 6. Des gènes candidats pour la caractérisation moléculaire des QTL à effet fort, décrits dans les chapitres 4 et 5, sont proposés dans le Chapitre 7. Dans le chapitre 8, l'implication des résultats obtenus au cours de cette thèse pour la sélection pour la résistance à *G. pallida* chez la pomme de terre est discutée et des perspectives pour la poursuite de ce travail sont présentées.

Chapitre 1

Introduction bibliographique

1 Introduction bibliographique

1.1 La pomme de terre

1.1.1 La pomme de terre : généralités

1.1.1.1 Répartition géographique et production

Avec 311 millions de tonnes (MT) produites en 2003, la pomme de terre est la quatrième culture alimentaire mondiale après le blé, le maïs, et le riz (FAOSTAT, 2004 : <http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>). L'Union Européenne (46,5 MT) occupe la 2^{ème} place des régions productrices, derrière la chine (66 MT) et devant la Russie (36 MT), l'Inde (24 MT), et les Etats-Unis (22 MT). Au sein de l'UE, la France, avec 6,4 MT, arrive au 4^{ème} rang des pays producteurs, derrière l'Allemagne (10,1 MT), les Pays-Bas (7,4 MT), et le Royaume Uni (6,9 MT).

1.1.1.2 Taxinomie, origine

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) appartient à la famille des Solanacées. Cette famille comprend également d'autres espèces légumières largement cultivées comme la tomate (*Lycopersicon esculentum*), le piment (*Capsicum* sp.) et l'aubergine (*Solanum melongena*). Le genre *Solanum* comprend plus de 1000 espèces parmi lesquelles 235 sont tubéreuses et considérées comme apparentées à la pomme de terre. Les zones d'origine et de diversification des espèces tubéreuses s'étendent du nord du Chili au nord du Mexique (Rousselle-Bourgeois 1996). Le centre des Andes (Pérou, Bolivie, Equateur) et le centre du Mexique sont les régions les plus riches en espèces.

Le nombre chromosomique de base de l'ensemble des espèces de *Solanum* tubéreuses est 12. Leur niveau de ploïdie varie de diploïde à hexaploïde. Soixante quatorze pour cent de ces espèces sont diploïdes (Hawkes 1978).

Toutes les espèces tubéreuses du genre *Solanum* sont classées dans la super série *Rotata*. (Hawkes 1990). Au sein de cette super série, l'ensemble des espèces cultivées de pomme de terre est classé dans la série *Tuberosa*. La sous-espèce cultivée en Europe et aux Etats-Unis, *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*, est tétraploïde. Elle est issue de l'adaptation à la tubérisation en jours longs de la sous-espèce andine *S. tuberosum* ssp. *andigena*. Beaucoup

d'espèces sauvages sont également classées dans la série *Tuberosa*, et en particulier *S. spegazzinii* et *S. sparsipilum* qui seront étudiées dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

La variabilité génétique de *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* est relativement restreinte. Les clones de la sous-espèce *S. tuberosum* ssp. *andigena* tubérisent en jours courts dans leurs zones d'implantation d'origine (zone intertropicale), et seuls les clones sélectionnés initialement pour leur aptitude à tubériser en jours longs forment aujourd'hui la base génétique des variétés commerciales européennes et nord-américaines de pomme de terre (Spire and Rousselle 1996). Cette base génétique restreinte ne couvre donc pas tous les besoins des sélectionneurs, particulièrement en ce qui concerne les gènes de résistance aux ravageurs et aux maladies. En revanche, des sources de résistance aux ravageurs et aux maladies sont présentes dans les nombreuses espèces apparentées à *S. tuberosum* (Hawkes 1990, Ross 1986).

1.1.2 La sélection au niveau diploïde

1.1.2.1 Intérêts

1.1.2.1.1 Utilisation de la variabilité génétique des espèces apparentées à *S. tuberosum*

La sélection au niveau diploïde permet d'exploiter par croisement sexué la variabilité génétique présente chez les espèces diploïdes apparentées à la pomme de terre. Cette variabilité est particulièrement importante pour la résistance à des stress abiotiques et pour la résistance aux bioagresseurs. Des caractères de résistance aux nématodes à kyste (Barone et al. 1990, Castelli et al. 2003, Jacobs et al. 1996, Kreike et al. 1993, Kreike et al. 1994, Kreike et al. 1996, Rousselle-Bourgeois and Mugniéry 1995) et à galles (Berthou et al. 2003a, Brown et al. 1995, Janssen et al. 1997), à des insectes (Bonierbale et al. 1994, Ortiz et al. 1990), à des champignons (Hehl et al. 1999, Pavek and Corsini 1994), à des Oomycètes (Ewing et al. 2000, Leonards-Schippers et al. 1994, Li et al. 1998, Meyer et al. 1998, Naess et al. 2000), à des virus (Barker and Solomon 1990, Solomon-Blackburn and Barker 2001, Swiezynski 1994) et à des bactéries (Elphinstone 1994, Zimnoch-Guzowska et al. 2000) ont été ainsi introduits dans le génome de *S. tuberosum*.

1.1.2.1.2 *Simplification des études génétiques*

Les études génétiques effectuées au niveau diploïde sont plus simples que celles effectuées au niveau tétraploïde. En effet, il y a 9 fois moins de classes génotypiques (4 vs 36) à chaque locus dans une descendance diploïde entre parents hétérozygotes que dans une descendance tétraploïde (Allard 1960).

Les premières cartes de marqueurs moléculaires de la pomme de terre ont donc été réalisées au niveau diploïde (Bonierbale et al. 1988, Gebhardt et al. 1989). Il aura fallu dix ans de plus et le développement de nouvelles techniques de marquage pour que soit publiée la première carte génétique partielle de la pomme de terre construite au niveau tétraploïde (Li et al. 1998). Depuis, des études théoriques ont été publiées sur le sujet (Hackett et al. 1998, Hackett et al. 2003, Xie and Xu 2000). Deux applications pratiques s'appuyant sur l'étude de Hackett et al. (1998) ont été réalisés pour localiser des facteurs de résistance à *G. pallida* (Bradshaw et al. 1998) et à *Phytophthora infestans* (Meyer et al. 1998) dans des populations tétraploïdes. Ces deux études concluent à la faisabilité des travaux de cartographie et de marquage de caractères de résistance dans des populations tétraploïdes de pomme de terre. Toutefois, elles soulignent la nécessité de disposer de marqueurs codominants et multialléliques de type microsatellites, et de populations en ségrégation de plus de trois cents individus.

1.1.2.2 **Méthodes utilisées pour changer de niveau de ploïdie**

1.1.2.2.1 *Réduction du niveau de ploïdie du clone de S. tuberosum : Obtention de dihaploïdes*

Deux méthodes sont utilisées pour passer du niveau tétraploïde au niveau diploïde : l'induction *in vivo* d'un développement parthénocarpique de l'embryon par pollinisation avec le pollen d'un clone "inducteur" de *Solanum phureja* (Hougas et al. 1958), et l'haploïdisation par culture *in vitro* d'ovules ou d'anthères (Wenzel and Uhrig 1981).

Plus de trois mille clones dihaploïdes ont été obtenus par parthénogenèse *in situ* à la station d'Amélioration de la Pomme de Terre et des Plantes à Bulbes de l'INRA de Ploudaniel (Rousselle-Bourgeois and Rousselle 1992). Rosa H1 et Caspar H3, les parents sensibles des populations étudiées dans la partie expérimentale de ce manuscrit, ont été choisis parmi eux.

1.1.2.2.2 Retour au niveau tétraploïde

Dans le cas où le niveau de ploïdie du clone de *S. tuberosum* a été réduit, il est nécessaire de retourner au niveau tétraploïde afin de pouvoir utiliser les clones intéressants dans un programme de création variétale. En effet, même les meilleurs des dihaploïdes n'atteignent jamais le rendement d'un clone tétraploïde (Rousselle-Bourgeois 1996).

Trois méthodes sont employées pour doubler le niveau de ploïdie : l'utilisation de diplogamètes, le doublement du nombre de chromosomes par culture *in vitro* et la fusion de protoplastes. La technique choisie va influencer sur le taux d'hétérozygotie des plantes obtenues. Ce taux doit être le plus important possible car la pomme de terre, comme la plupart des plantes à multiplication végétative est sensible à la dépression de consanguinité.

La méthode la plus employée pour passer du niveau diploïde au niveau tétraploïde est basée sur l'aptitude de certains clones diploïdes à produire des diplogamètes, c'est-à-dire des gamètes non réduits (gamètes $2n$ pour une plante $2x$) issus de méioses anormales. La fécondation entre un diplogamète d'une plante diploïde et un gamète normal d'une plante tétraploïde donne naissance à un embryon tétraploïde (Hannemann and Peloquin 1967). L'aptitude à produire des diplogamètes est déterminée génétiquement et plusieurs gènes récessifs seraient impliqués dans ce phénomène (Mok and Peloquin 1975). Le taux de production de diplogamètes peut être très variable selon les clones. Néanmoins, il est possible d'améliorer les taux de production de diplogamètes dans des populations en sélection pour des caractères d'intérêt agronomique en introduisant, parmi les géniteurs de la population, des clones ayant une forte aptitude à produire des diplogamètes (Rousselle-Bourgeois and Rousselle 1992).

Un doublement spontané du nombre de chromosomes est fréquemment observé sur les bourgeons néoformés, obtenus à partir de culture de calcs *in vitro*. Cette propriété est utilisée pour ramener des plantes diploïdes au niveau tétraploïde (Rousselle et al. 1989). Dans ce cas, chaque chromosome est dupliqué de manière parfaitement identique. Tous les locus de la plante obtenue sont alors à l'état duplex (AAaa), voire quadruplex (AAAA). Le doublement du nombre de chromosomes au moyen de traitements à la colchicine n'est plus utilisé, car il induit l'apparition de chimères (De Maine and Fantes 1983).

La fusion de protoplastes (Wenzel et al. 1979) permet d'obtenir un clone tétraploïde en fusionnant deux clones diploïdes. Si les clones sont différents et tous les deux hétérozygotes, le produit de fusion maintiendra, voire maximisera, le niveau d'hétérozygotie.

1.1.2.3 Principales limites de la sélection au niveau diploïde

La sélection au niveau diploïde ne concerne actuellement qu'une faible part des programmes de création variétale. Bien que la création de populations diploïdes ait pour but d'augmenter la variabilité génétique de l'espèce cultivée *S. tuberosum*, l'expression de certains caractères est modifiée par les changements de ploïdie. De plus, un certain nombre de contraintes biologiques viennent réduire la variabilité disponible à chaque étape du processus de sélection des clones intéressants.

1.1.2.3.1 Contraintes au niveau de la production de dihaploïdes

Tous les clones de *S. tuberosum* ne produisent pas de dihaploïdes après pollinisation par un inducteur de parthénogenèse. En outre, l'obtention de dihaploïdes par culture d'anthers ou d'ovules est limitée aux géotypes ayant une bonne aptitude à l'androgenèse ou la gynogenèse et à la régénération *in vitro*. Les dihaploïdes obtenus sont presque toujours mâle-stériles (Rousselle-Bourgeois and Rousselle 1992). Cette stérilité implique qu'ils sont dans la plupart des cas utilisés comme géniteurs femelles et qu'il est difficile de croiser deux dihaploïdes entre eux.

1.1.2.3.2 Contraintes lors du retour au niveau tétraploïde

1.1.2.3.2.1 Par l'utilisation des diplogamètes

Tous les clones diploïdes ne produisent pas de diplogamètes et la majorité de ceux qui en produisent le font à un taux faible (Mok and Peloquin 1975). Si le clone intéressant n'en produit pas, il faut le croiser par un clone producteur de diplogamètes. Les plus efficaces de ces clones producteurs ont été utilisés par de nombreux sélectionneurs, réduisant ainsi la variabilité globale des clones tétraploïdes issus de ce type de sélection.

1.1.2.3.2.2 Par des méthodes de culture *in vitro*

Comme pour l'obtention des dihaploïdes, les méthodes utilisant la culture *in vitro* pour retourner au niveau tétraploïde sont limitées aux géotypes qui régénèrent. Cependant, même dans les cas où la régénération est possible, il existe des problèmes spécifiquement liés aux techniques employées. Le doublement spontané du nombre de chromosomes produit des plantes pour lesquelles tous les locus sont à l'état au moins duplex, voire quadruplex. Un tel taux de consanguinité donne des plantes qui sont souvent peu vigoureuses et ont des problèmes de fertilité. L'homozygotie, qui peut être recherchée au niveau d'un locus

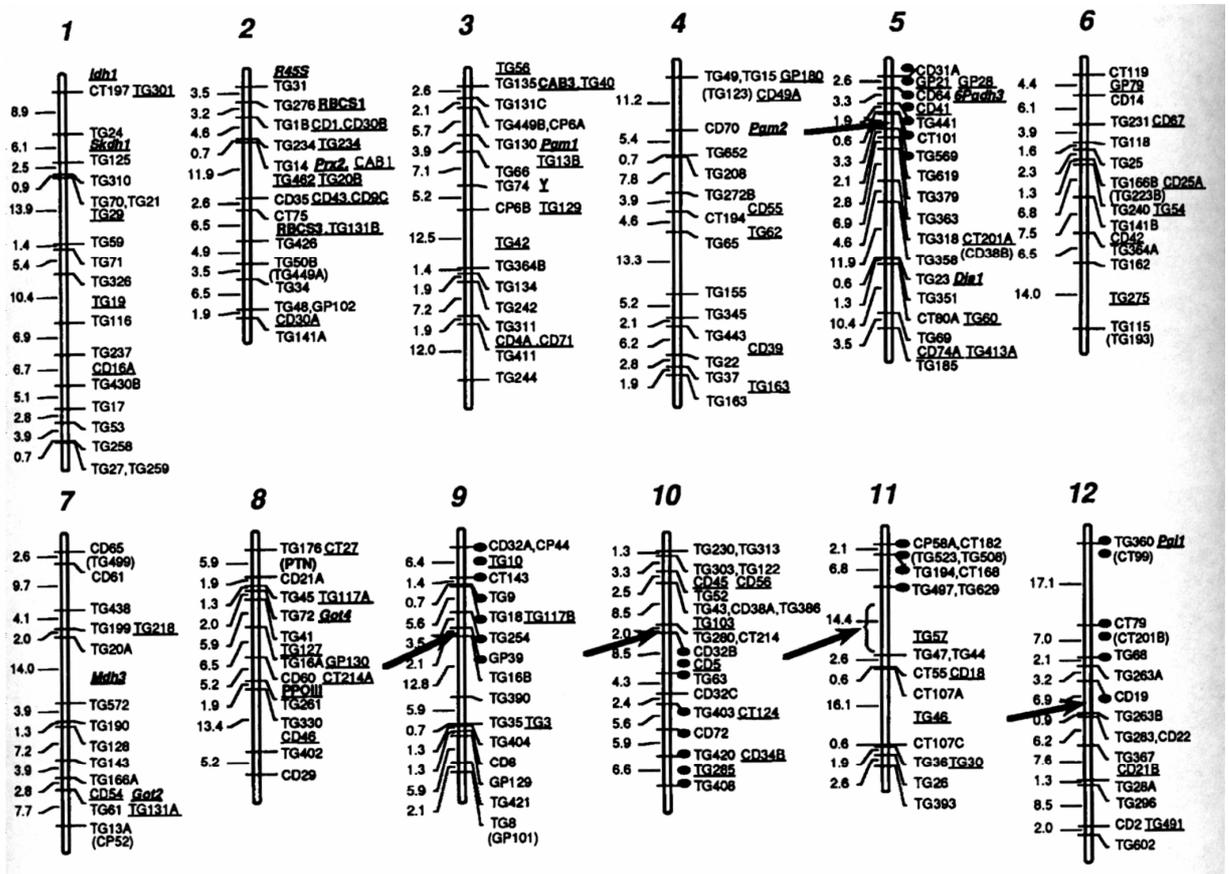


FIGURE 5.—Molecular linkage map of the potato genome. Loci by tick marks ordered with LOD > 2. Loci following commas cosegregate. Markers enclosed in parentheses have been located to corresponding intervals with LOD < 2. Position of underlined loci approximated from placement on previously published maps. All other loci mapped directly on backcross family N263 of 155 plants (*S. tuberosum* USW2230 (2n = 24) × *S. berthaultii* P1473331 (2n = 24) × *S. berthaultii* P11473331). Dots indicate markers involved in inversions that differentiate potato from tomato. Arrows indicate approximate break points for inversions (see text for details).

Figure 1.1 : Carte génétique de la pomme de terre réalisée par Tanksley et al. (1992) avec des sondes RFLP de tomate. Les flèches indiquent les points d'inversion des bras de chromosomes entre les cartes génétiques de la tomate et de la pomme de terre. Les points noirs indiquent les marqueurs situés sur les bras de chromosomes inversés. L'orientation des chromosomes est celle des cartes génétiques des différentes espèces de Solanacées (SGN : <http://www.sgn.cornell.edu/>).

contrôlant un caractère d'intérêt agronomique, devient néfaste si elle s'étend à l'ensemble du génome (Rousselle-Bourgeois 1996). Dans le cas de la fusion de protoplastes, les génotypes aptes à régénérer *in vitro* n'ont pas tous la même capacité à produire des protoplastes viables. Les produits de fusion peuvent également être incomplets (fusion des noyaux mais pas des cytoplastes, fusion partielle des noyaux, production d'aneuploïdes).

Malgré ces contraintes, la plupart des instituts de recherche travaillant sur la pomme de terre ont développé des programmes de sélection au niveau diploïde, en particulier pour introduire des facteurs de résistance aux parasites dans le génome de *S. tuberosum*. Les dihaploïdes sont généralement obtenus par parthénogenèse *in situ* après pollinisation par un clone inducteur, et le retour au niveau tétraploïde se fait le plus souvent grâce aux diplogamètes.

1.1.3 Génétique et génomique de la pomme de terre

Ce chapitre a pour objectif de décrire les cartes génétiques et les ressources génomiques utilisables pour l'étude du génome de la pomme de terre. Il serait réducteur de parler de cartographie génétique ou de génomique de la pomme de terre sans s'intéresser aux résultats obtenus chez les autres Solanacées, voire dans les espèces modèles.

La génétique comparative a permis de mettre en évidence une bonne conservation de la synténie entre les différentes espèces de Solanacées (Bonierbale et al. 1988, Doganlar et al. 2002, Livingstone et al. 1999). Des travaux réalisés sur les autres espèces de la famille peuvent être exploités pour les études de génétique et génomique de la pomme de terre. C'est actuellement chez la tomate que les travaux de génomique sont les plus avancés. Les remaniements chromosomiques majeurs entre la tomate et la pomme de terre sont limités à 5 inversions paracentriques sur les chromosomes 5, 9, 10, 11, et 12 (figure 1.1 ; Tanksley et al. 1992).

A un niveau taxinomique plus large, des blocs de synténie entre les génomes de la pomme de terre et de l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* ont été mis en évidence (Gebhardt et al. 2003).

1.1.3.1 Les cartes génétiques de la pomme de terre

1.1.3.1.1 Cartes de marqueurs RFLP

Les premières cartes génétiques de la pomme de terre ont été réalisées à partir de descendances diploïdes avec des marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length

Polymorphism, Botstein et al. 1980) par une équipe de l'Université de Cornell aux USA (Bonierbale et al. 1988) et une équipe du Max Plank Institut de Cologne en Allemagne (Gebhardt et al. 1989). La carte publiée par Bonierbale et al. (1988), réalisée avec des sondes RFLP de tomate permettait de comparer les génomes de la tomate et de la pomme de terre, et d'ancrer les groupes de liaison de la pomme de terre à ceux de la carte génétique déjà très détaillée de la tomate. Les groupes de liaisons de la carte publiée par Gebhardt et al. (1989) n'étaient pas assignés aux chromosomes.

Quelques années plus tard, ces 2 équipes publiaient de nouvelles cartes génétiques de la pomme de terre, ancrées entre elles et avec celle de la tomate par l'intermédiaire de marqueurs RFLP commun (Gebhardt et al. 1991, Tanksley et al. 1992). Ces cartes génétiques ont servi de référence pour les travaux de cartographie menés ultérieurement chez la tomate et chez la pomme de terre. La carte de la tomate de Tanksley et al. (1992) a également permis les comparaisons avec les génomes du piment (Livingstone et al. 1999) et de l'aubergine (Doganlar et al. 2002).

Les cartes génétiques de la pomme de terre, construites avec des sondes RFLP de tomate (Bonierbale et al. 1988, Tanksley et al. 1992), ainsi que les cartes de la tomate et de l'aubergine construites par l'Université de Cornell (USA), sont disponibles sur le site WEB de la Solanaceae Genomic Network (SGN, <http://www.sgn.cornell.edu/>). La séquence de plusieurs centaines de sondes de tomate utilisées pour la construction de ces cartes est disponible sur le site de la SGN (Ganal et al. 1998). Les données de séquences obtenues à partir de l'ADN d'une espèce de Solanacées peuvent ainsi être utilisées pour générer des marqueurs PCR locus-spécifiques qui seront localisés sur les cartes des autres espèces de la famille (Naess et al. 2000). Les cartes de la pomme de terre publiées par le Max Plank Institut de Cologne sont accessibles en ligne depuis janvier 2004 (PoMaMo : <http://gabi.rzpd.de/PoMaMo.html>). Ce site permet également d'accéder à la séquence des marqueurs cartographiés.

En 1995, une équipe de l'Université de Wageningen aux Pays-Bas a publié une carte génétique de la pomme de terre incluant, en plus des marqueurs RFLP, des marqueurs de type transposon (Jacobs et al. 1995) et des marqueurs de type AFLP (Van Eck et al. 1995). Cette carte est ancrée aux précédentes par l'intermédiaire de marqueurs RFLP communs.

1.1.3.1.2 Cartes de marqueurs PCR

Jusqu'en 1997, seuls les marqueurs RFLP étaient utilisés pour aligner entre elles les différentes cartes génétiques de la pomme de terre. (Roupe van der Voort et al. 1997b), de l'Université de Wageningen, mettent en évidence la possibilité d'aligner différentes cartes génétiques grâce à des marqueurs AFLP communs. Les auteurs démontrent que lorsque des bandes AFLP de la même combinaison d'amorce migrent au même niveau chez différents génotypes de *S. tuberosum*, elles se cartographient dans la plupart des cas au même locus. Il est donc possible, en comparant les profils AFLP des géniteurs, d'aligner des cartes génétiques réalisées dans des descendance différentes. Néanmoins, le nombre de marqueurs AFLP communs pour aligner des cartes génétiques est très faible lorsque les géniteurs proviennent d'espèces différentes (Roupe van der Voort et al. 1999b).

Milbourne et al. (1998) du Scottish Crop Research Institut (SCRI) en Ecosse ont cartographié 89 locus issus de marqueurs microsatellites (Tautz 1989) sur les cartes de 2 descendance dont celle de Gebhardt et al. (1991). Cette équipe a publié plus de 100 couples d'amorces flanquant des motifs microsatellites.

Plusieurs auteurs ont publié des marqueurs CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Segment, Konieczny and Ausubel 1993) et SCAR (Sequence-Characterised Amplified Region, Paran and Michelmore 1993) cartographiés en différents points du génome (Chen et al. 2001). Un grand nombre de ces marqueurs flanquent des gènes ou des cluster de gènes de résistance situés sur les chromosomes V (De Jong et al. 1997, Marano et al. 2002, Meksem et al. 1995, Niewohner et al. 1995), VII (Niewohner et al. 1995), VIII (Naess et al. 2000), IX (Roupe van der Voort et al. 2000), XI (Kasai et al. 2000, Roupe van der Voort et al. 1999b), et XII (Bendahmane et al. 1997, Kanyuka et al. 1999).

Les marqueurs communs AFLP, et les marqueurs locus-spécifiques microsatellites, CAPS et SCAR, permettent d'aligner différentes cartes entre elles. Il est désormais possible de réaliser et d'orienter de nouvelles cartes de la pomme de terre sans avoir recours à la technique RFLP très lourde à mettre en œuvre.

1.1.3.1.3 Carte à Ultra Haute Densité

En 1998, des équipes de 4 pays européens [Université de Wageningen (WAU), Pays-Bas ; Scottish Crop Research Institut (SCRI), Royaume Uni ; Nekazal Ikerketa eta Garapenerako Euskal Erakundea (NEIKER), Espagne ; Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), France] ont démarré un programme visant à réaliser une carte génétique de la pomme

de terre à Ultra Haute Densité (UHD) de marqueurs AFLP (Contrat européen FAIR5-PL97-3565, <http://potatodbase.dpw.wau.nl/UHDdata.html>). Cette carte comporte plus de 10000 marqueurs AFLP et est à ce jour la carte génétique la plus dense pour une espèce végétale (Isidore et al. 2003, van Os et al. in prep). Cette carte UHD est ancrée à la carte génétique de la tomate par l'intermédiaire d'une carte "pont" (Bres et al. in prep). Cette carte pont comprend des marqueurs AFLP communs avec la carte UHD et des marqueurs RFLP communs avec la carte de la tomate. Elle est décrite dans le chapitre 3 de la partie expérimentale.

1.1.3.1.4 Vers la cartographie physique

En 2003, l'Union Européenne a financé un nouveau programme visant à réaliser une carte physique et fonctionnelle de la pomme de terre, ancrée à la carte génétique UHD avec les marqueurs AFLP (acronyme APOPHYS pour "A POtato PHYSical map", <http://www.dpw.wau.nl/pv/projects/apophys/>). Cette cartographie physique doit couvrir 35 % du génome de la pomme de terre. Ces 35 % correspondent aux régions riches en gènes où ont été cartographiés la plupart des gènes impliqués dans les résistances aux bioagresseurs et dans la qualité du tubercule.

1.1.3.2 Autres ressources génomiques

1.1.3.2.1 SNP et génétique d'association

Les marqueurs de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism), déjà largement utilisés chez l'homme pour les études de génétique d'association (Jorde 2000), sont en plein développement chez les plantes pour lesquelles des informations de séquences sont disponibles (pour revue, voir Rafalski 2002a, Rafalski 2002b). Récemment, Rickert et al. (2003) ont séquencé 31 kb d'ADN génomiques (non contigus), correspondant à des extrémités de Bacterial Artificial Chromosome (BAC) situés dans les principaux clusters de gènes de résistance de la pomme de terre (cf. chapitre 1.5). Les auteurs ont analysé la variabilité nucléotidique correspondant à ces 31 kb sur un panel de 28 génotypes de pomme de terre. Ils ont mis en évidence près de 1498 SNP et 127 polymorphismes d'insertion/délétion (InDel). Cela correspond à un SNP tous les 21 paires de bases et à un InDel tous les 243 paires de bases. Ces données sont accessibles sur le site PoMaMo : <http://gabi.rzpd.de/PoMaMo.html>. Elles peuvent être utilisées pour des études de génétique d'association.

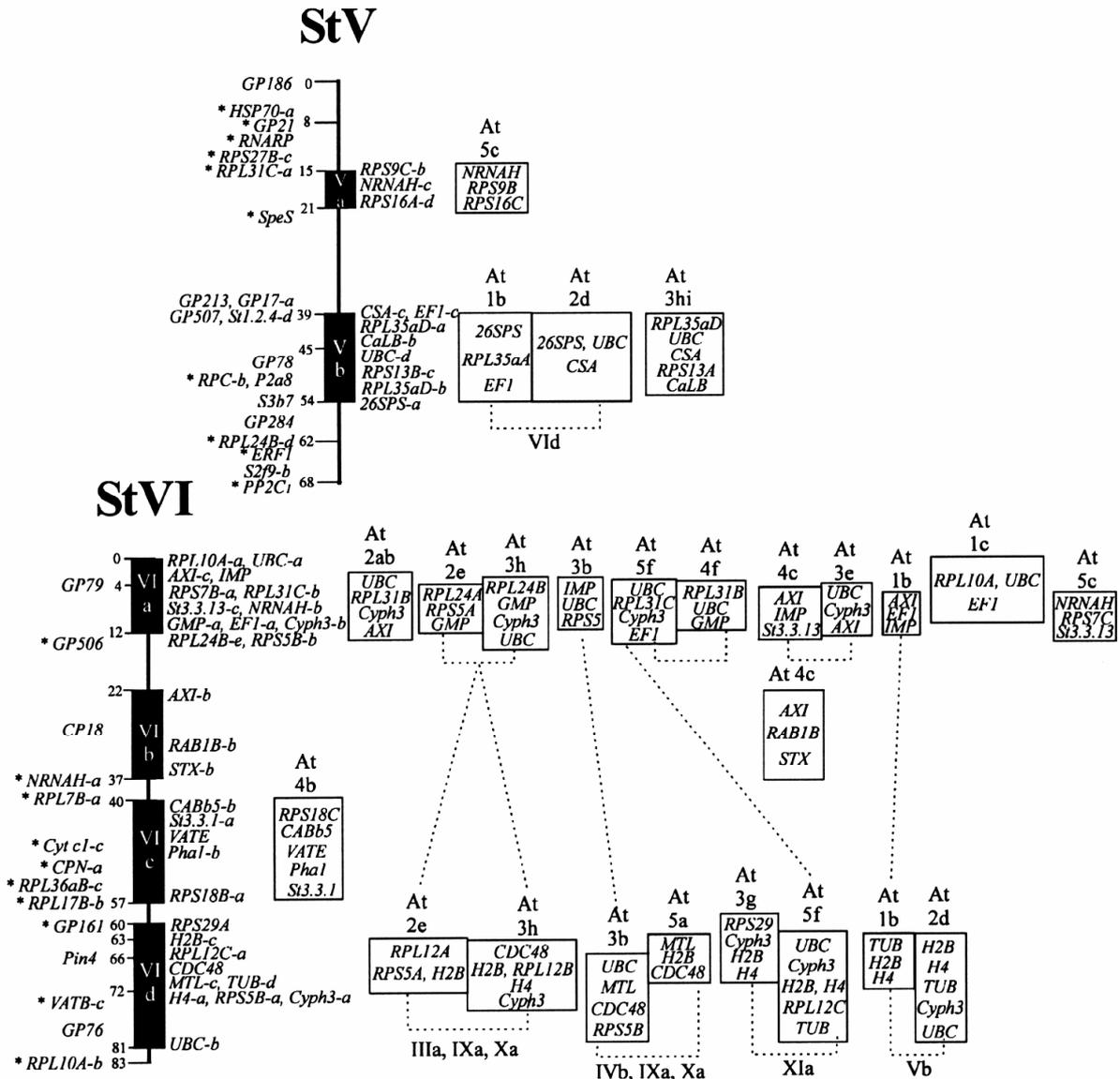


Figure 1.2 : Extrait de la carte génétique comparative de *S. tuberosum* avec *A. thaliana* (d'après Gebhardt et al., 2003). Les chromosomes I et VI de *S. tuberosum* sont représentés à gauche de la figure. Les locus RFLP définissant les blocs de synténie sont indiqués à droite des chromosomes de pomme de terre. Les locus RFLP de pomme de terre qui ne sont pas impliqués dans les blocs de synténie sont indiqués à gauche des chromosomes. Les blocs de synténie sont représentés par des rectangles noirs sur les chromosomes de pomme de terre et par des rectangles blancs pour le génomes *A. thaliana*. Le numéro des chromosomes d'*A. thaliana* est indiqué au dessus des rectangles contenant les noms des locus communs aux deux génomes.

1.1.3.2.2 Les banques d'EST

Un nombre croissant de séquences d'EST (Expressed Sequence Tag, Adams et al. 1991) de différentes espèces de Solanacées est disponible dans les banques de données. Ces EST sont issus du séquençage de clones d'ADN complémentaires, obtenus à partir d'ARN prélevés sur différents organes et dans différentes conditions. Les programmes de séquençage d'EST visent à établir un inventaire des gènes exprimés dans différents tissus ou différentes conditions. Les EST sont une source potentielle de marqueurs.

Fin décembre 2003, 131750 EST et 921 gènes complets de pomme de terre étaient disponibles dans les bases de données publiques, la majorité des EST (124952) étant dans la base de données du TIGR (The Institut For Genomic Research, <http://www.tigr.org/tdb/potato/>). Les neuf banques de cDNA dont sont originaires les EST du TIGR ont été constituées à partir d'ARN messagers exprimés dans différents organes à différents stades, et/ou dans différentes conditions d'infection par *Phytophthora infestans* (Ronning et al. 2003). Les EST et les gènes de pomme de terre ont été assemblés en 26830 unigènes dans le TIGR Potato Gene Index (http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=potato). Ces unigènes sont soit des TC (Tentative Consensus) correspondant à l'assemblage par bioinformatique d'au moins 2 EST, soit des séquences présentes une seule fois dans les bases de données (singletons). Sur les 26830 unigènes de pomme de terre, 18370 sont des TC et 8460 sont des singletons. Plus de 6700 motifs microsatellites ont été détectés à partir des séquences de plus de 90000 EST de pomme de terre (<http://www.tigr.org/tdb/potato/SSR.shtml>). Malheureusement, aucune information n'est disponible actuellement sur la localisation chromosomique de ces marqueurs microsatellites.

A partir de 26 banques de cDNA de tomate, 155317 EST avaient été séquencés en avril 2003 (<http://www.tigr.org/tdb/tgi/tgi/>, Van der Hoeven et al. 2002). Ces EST et les gènes de tomate présents dans GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) ont été assemblés en 31012 unigènes (15925 TC et 15087 singletons) dans le TIGR Tomato Gene Index http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=tomato. Cent quinze marqueurs microsatellites, parmi les 609 trouvés par analyse bioinformatique dans les banques d'EST de tomate et de pomme de terre, ont été cartographiés sur le génome de la tomate (http://www.sgn.cornell.edu/cgi-bin/legacy/microsats_top.pl). Il est étonnant de trouver un nombre de microsatellites si différent entre l'analyse du TIGR sur les EST de pomme de terre, et l'analyse de la SGN sur les EST de tomate et de pomme de terre. Cette différence s'explique par le nombre d'EST disponibles aux moments où les 2 analyses ont été faites, et par le

nombre de répétitions minimum pris en compte dans l'analyse bioinformatique (par exemple, le nombre de répétitions pour les motifs dinucléotides était de 12 pour la SGN contre 6 pour le TIGR).

Le nombre de séquences issues de Solanacées augmente chaque semaine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>). Au total en février 2004, il y avait dans les bases de données 139703 séquences nucléotidiques du genre *Solanum* dont 138947 pour *S. tuberosum* et 45 de *S. melongena* (l'aubergine), 176847 séquences nucléotidiques du genre *Lycopersicon* dont 165668 pour *L. esculentum*, et 23358 séquences nucléotidiques du genre *Capsicum* dont 22878 pour *C. annuum* (Lefebvre 2004).

1.1.3.2.3 Synténie avec les espèces modèles

1.1.3.2.3.1 Les espèces modèles séquencées

A ce jour, seul le génome de l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* (Kaul et al. 2000) a été complètement séquencé. Les informations sur la séquence d'*A. thaliana* sont disponibles sur le site WEB du TAIR (The Arabidopsis Information Resource, <http://www.Arabidopsis.org>).

Le séquençage complet du génome du riz est en voie d'achèvement (Goff et al. 2002, Yu et al. 2002). Les informations sur la séquence du riz sont disponibles sur plusieurs sites WEB. Le génome de la sous-espèce *Oryza sativa L. ssp. japonica* est sur le site du consortium de laboratoires publics IRGSP (International Rice Genome Sequencing Project, <http://rgp.dna.affrc.go.jp/IRGSP/index.html>), et sur le site du TIMRI (Torrey Mesa Research Institute, www.tmri.org) qui appartient à Syngenta Biotechnology, Inc. Le génome de la sous-espèce *O. sativa L. ssp. indica* est sur le site du Bejin Genomic Institut (<http://btn.genomics.org.cn:8080/rice/>).

Les génomes de deux nouvelles espèces végétales devraient être séquencés dans les 5 ans à venir : celui de *Medicago truncatula* (<http://medicago.org/genome/>), qui a été choisie comme espèce modèle pour les légumineuses et pour les études sur les symbioses, et celui de la tomate (<http://www.sgn.cornell.edu/solanaceae-project/>), qui a été choisie comme espèce modèle pour les Solanacées et plus généralement pour les études sur le développement et la qualité des fruits.

1.1.3.2.3.2 Comparaisons Solanacées-espèces modèles

Les Solanacées appartenant à la classe des dicotylédones, il est évident que les comparaisons de leur génome avec celui d'*A. thaliana* permettront de détecter plus d'homologies qu'avec celui du riz qui appartient aux monocotylédones. Néanmoins, Van der Hoeven et al. (2002) ont mis en évidence des homologies entre un EST de tomate et un gène de riz, alors qu'ils n'ont trouvé aucune homologie entre cet EST et des gènes d'*A. thaliana*.

Afin de tirer partie du séquençage du génome d'*A. thaliana* pour la génétique des autres espèces, l'équipe de l'Université de Cornell a entrepris d'identifier les gènes présents une seule fois ou un faible nombre de fois dans les génomes de la tomate et d'*A. thaliana* (Fulton et al. 2002). Par comparaisons bioinformatiques, les auteurs ont recherché les EST de tomate n'ayant qu'un homologue sur la séquence du génome d'*A. thaliana*. Ils ont ainsi identifié un ensemble de 1025 gènes appelés COS pour Conserved Orthologs Set. Le nombre de copies de ces marqueurs COS sur le génome de la tomate a été vérifié par RFLP et 85 % d'entre eux présentent moins de trois bandes sur les profils de restriction. Plus de 550 COS avaient été cartographiés à la date de la publication (Fulton et al. 2002). Les auteurs ont également hybridé neuf de ces COS sur l'ADN de 13 plantes de familles différentes, incluant la tomate, *A. thaliana*, et le riz. Ils s'hybrident sur l'ADN de la majorité des espèces, y compris le riz. La séquence des COS et leur position sur la carte de la tomate sont disponibles sur le site de la SGN (http://www.sgn.cornell.edu/markers/cos_markers.html). Ces marqueurs sont des outils précieux pour les études de génomique comparative car ils permettent de faire le lien entre le génome d'*A. thaliana* et celui d'espèces d'intérêt agronomique. Par l'exploitation de la microsyténie existant entre *A. thaliana* et les Solanacées, il est possible d'identifier, sur le génome de l'espèce modèle, des gènes candidats pour des caractères cartographiés dans l'espèce cultivée.

Gebhardt et al. (2003) ont comparé *in silico* les séquences de 293 marqueurs RFLP de la carte de la pomme de terre avec la carte physique d'*A. thaliana*. Ils ont mis en évidence l'existence d'une centaine de blocs de synténie entre les génomes de la pomme de terre et d'*A. thaliana*, couvrant 41 % de la carte génétique de la pomme de terre et 50 % de la carte physique d'*A. thaliana* (figure 1.2).

La comparaison de blocs de microsyténie peut permettre de choisir des gènes candidats positionnels et fonctionnels (Pflieger et al. 2001) chez *A. thaliana* pour caractériser des locus d'intérêt chez la tomate ou la pomme de terre. Néanmoins, bien que le contenu en gènes des blocs de microsyténie soit globalement semblable entre les Solanacées et *A. thaliana*,

certains gènes sont présents uniquement chez les Solanacées ou chez *A. thaliana* (Ku et al. 2000). Dans le cas où le gène d'intérêt n'a pas d'orthologue chez *A. thaliana*, les blocs de microsyténie permettent néanmoins de développer de nouveaux marqueurs à partir de la séquence des gènes qui lui sont physiquement liés (Oh et al. 2002).

1.1.4 Principaux bioagresseurs

La pomme de terre est attaquée par un grand nombre de bioagresseurs : des Oomycètes, des virus, des champignons, des bactéries, des insectes et des nématodes. Certains se manifestent pendant la période de culture, d'autres causent des dégâts lors du stockage. Oerke et al. (1994) estiment à 32 % les pertes mondiales de rendement en pomme de terre dues aux différents bioagresseurs.

L'importance relative des différents bioagresseurs est variable selon les conditions climatiques, les conditions de conservation, et la possibilité ou non d'utiliser des produits phytosanitaires efficaces. Certains bioagresseurs sont restreints à certaines zones géographiques. Afin de limiter les possibilités d'introduction d'un bioagresseur dans une zone géographique qui en est indemne, des listes de quarantaine ont été créées. Des mesures de confinement et de vérification sanitaire du matériel végétal sont associées à ces listes de quarantaine. Seuls les plants de pomme de terre munis d'un passeport sanitaire les déclarant indemnes des parasites inscrits sur la liste de quarantaine peuvent être échangés entre pays. Si un parasite de quarantaine est détecté dans un pays déclaré indemne, des mesures drastiques (interdiction de culture pendant plusieurs années, désinfection des sols, etc....) sont mises en œuvre en vue de son éradication. Toutefois, ces mesures peuvent avoir un poids économique important.

1.1.4.1 L'agent du mildiou : *Phytophthora infestans*

L'Oomycète *Phytophthora infestans* est l'agent du mildiou de la pomme de terre. Il est considéré comme le parasite majeur de la pomme de terre.

Les dégâts causés par *P. infestans* peuvent atteindre 90 % si les conditions climatiques lui sont favorables (hygrométrie élevée) et si l'épidémie est précoce. Il est à l'origine de la famine qui a frappé l'Irlande entre les années 1845 et 1851 (Spire and Rousselle 1996).

Le mildiou se développe sur les organes aériens des plants de pomme de terre, mais il peut également contaminer les tubercules et les rendre impropres à la consommation (Duvauchelle and Andrivon 1996).

1.1.4.2 Les nématodes

Les pertes de production de pomme de terre dues aux nématodes sont estimées à 141000 tonnes, soit 12,2 % de la production mondiale (Barker 1998). On distingue deux grands types de nématodes qui parasitent la pomme de terre : les nématodes endoparasites qui effectuent leur cycle de développement dans la racine et les nématodes ectoparasites qui restent libres dans le sol et se nourrissent par des piqûres dans l'épiderme des racines.

Les dégâts les plus importants sur pomme de terre sont provoqués par les nématodes endoparasites et particulièrement par ceux des genres *Meloidogyne* (nématodes à galles) et *Globodera* (nématodes à kyste). La résistance aux nématodes à kyste fait l'objet de la partie expérimentale de ce manuscrit et un chapitre particulier de cette introduction bibliographique leur est consacré. Brown and Sykes (1983) estiment à 22 tonnes par hectare les pertes de rendement maximum dues aux nématodes à kyste sur les cultures de pomme de terre. Trois autres nématodes endoparasites peuvent causer des dégâts notables sur les cultures de pomme de terre. *Nacobus aberrans*, présent dans les pays andins, peut provoquer des chutes de rendement de 60 à 90 %. Les espèces du genre *Pratylenchus* ne sont considérées comme des déprédateurs importants de la pomme de terre qu'aux Etats Unis. *Ditylenchus destructor*, inscrit sur les listes de quarantaine de l'Union Européenne, est présent en Asie, en Amérique, en Afrique du sud, en Nouvelle-Zélande et dans la partie européenne de l'ex-URSS.

Un grand nombre d'espèces de nématodes ectoparasites peuvent se nourrir sur pomme de terre sans provoquer de dommages apparents. Seules quelques espèces sont considérées comme dangereuses (Mugniéry 1996). Les nuisances liées à la présence des nématodes des genres *Trichodorus* et *Paratrichodorus* sont surtout dues au virus du Rattle qu'ils transmettent. Ces nématodes sont présents dans toutes les zones de climat tempéré.

1.1.4.3 Les virus

Le virus de l'enroulement de la pomme de terre (PLRV) et le virus Y de la pomme de terre (PVY) sont les virus les plus répandus et les plus dommageables sur cette culture, mais plus de 20 autres virus ont également été décrits (Kerlan 1996). Les dégâts causés par les virus sont beaucoup plus importants lors d'infections secondaires (plantation d'un tubercule déjà infecté) que lors des infections primaires.

Certains virus peuvent entraîner des pertes de rendement supérieures à 50 %. C'est pourquoi un système de production de plants indemnes de virus a été mis en place dans la plupart des pays développés (Merlet et al. 1996, Oerke et al. 1994). Les premières multiplications se font

par micro bouturage *in vitro*, les dernières étapes de multiplication au champ étant réalisées préférentiellement dans des zones géographiques où les pucerons vecteurs de virus sont rares, ou en protégeant le feuillage des pucerons par application d'huile minérale.

1.1.4.4 Les champignons

Le rhizoctone brun, la galle argentée, la gangrène, les verticillioses et les fusarioses sont les maladies fongiques les plus répandues sur les cultures de pomme de terre.

La galle argentée et la gangrène se développent surtout lors de la conservation (Elimane 1996, Tivoli 1996a). Le rhizoctone brun cause des dégâts importants lors de la levée des jeunes pousses de pomme de terre (Bedin 1996), alors que les verticillioses se manifestent plutôt en deuxième partie de culture (Tivoli 1996b). Les fusarioses provoquent des dégâts en culture et lors du stockage (Tivoli 1996b, 1996a).

D'autres champignons tels qu'*Alternaria solani* et *Synchytrium endobioticum* peuvent provoquer de graves dégâts, mais ne sont présents ou importants que dans de zones géographiques restreintes.

1.1.4.5 Les bactéries

Les maladies bactériennes les plus importantes sur les cultures de pomme de terre sont causées par des organismes des genres *Erwinia*, *Streptomyces*, et *Ralstonia*.

Les pourritures molles dues aux bactéries du genre *Erwinia* font partie des principales maladies de conservation. La contamination de la plante à partir du tubercule-mère entraîne la maladie de la jambe noire et un flétrissement de la plante (Priou and Jouan 1996). Les organismes du genre *Streptomyces* sont les agents de la galle commune de la pomme de terre. Cette maladie affecte la qualité et la présentation du tubercule (Pasco and Jouan 1996).

Ralstonia solanacearum, autrefois appelé *Pseudomonas solanacearum*, est une bactérie très polyphage qui sévit, entre autres, sur les différentes espèces de Solanacées, et entraîne un flétrissement des plantes en culture. Autrefois localisée dans la zone intertropicale, elle s'est largement répandue en Europe depuis les années 1980, suite à des introductions dans les Iles Britanniques et au Benelux (Prior and Samson 1996).

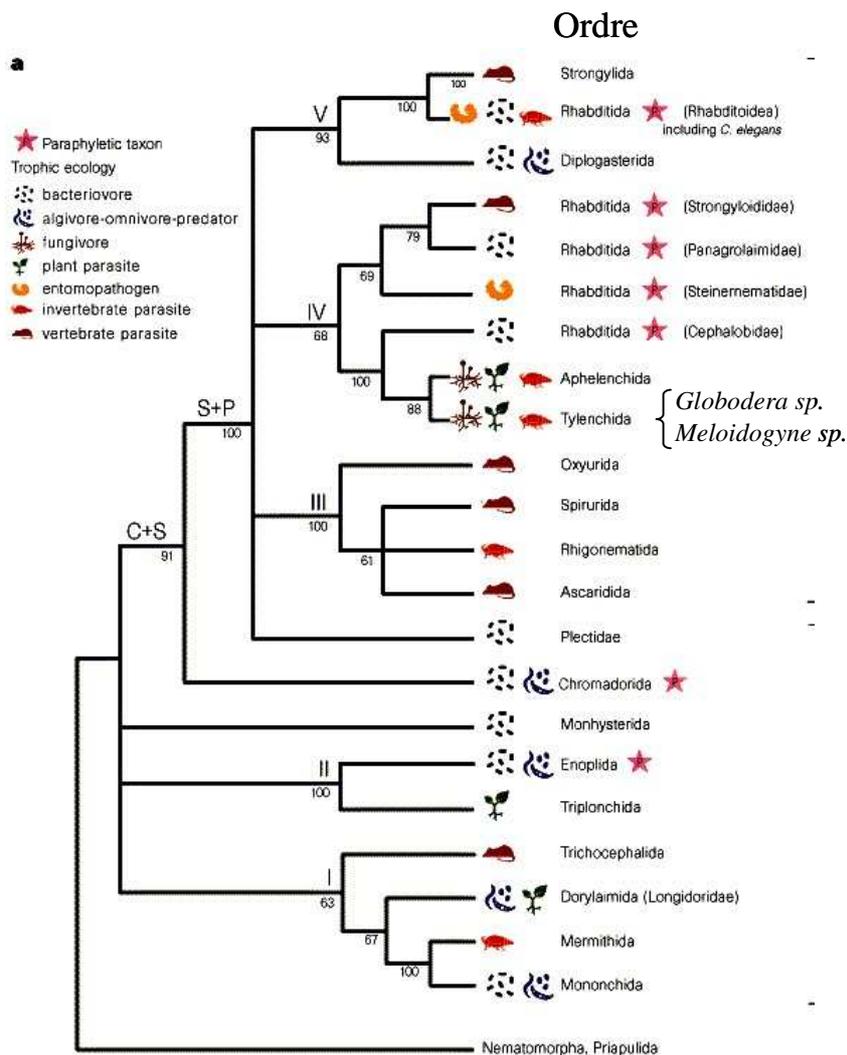


Figure 1.3 : Arbre phylogénétique du phylum *Nematoda* basé sur la séquence nucléotidique de la petite sous unité des ARN ribosomiques de 53 espèces de nématodes (d'après Blaxter et al., 1998). Les nématodes à kyste (*Globodera sp.*) et à galles (*Meloidogyne sp.*) sont classés dans le clade IV.

1.1.4.6 Les insectes

Les insectes qui causent le plus de dégâts sur les cultures de pomme de terre sont les pucerons, le doryphore (*Leptinotarsa decemlineata*), et la teigne (*Phthorimaea operculella*) (Robert 1996).

Les pucerons causent principalement des dégâts indirects en tant que vecteurs de nombreux virus. *Myzus persicae* est le puceron qui transmet le plus de virus sur pomme de terre. Le doryphore est un déprédateur important essentiellement en Amérique du Nord et en Europe ; les dégâts causés par les larves et les adultes peuvent aller jusqu'à une défoliation quasi complète des plantes. La teigne cause des dégâts principalement dans les régions tempérées chaudes et tropicales. Les larves creusent des galeries dans les feuilles, les tiges ou les tubercules. Si des larves sont présentes dans des tubercules lors de la récolte, l'infestation continue pendant la période de conservation.

1.2 Les nématodes

1.2.1 Généralités

Les nématodes sont les organismes pluricellulaires les plus abondants sur terre : on estime qu'il existe plus de 80000 espèces de nématodes et on trouve environ 1 million de nématodes dans une pelleté de terre. Ils colonisent tous les milieux, du sol aux fonds marins. Certains sont prédateurs de petits invertébrés, dont d'autres nématodes. D'autres se nourrissent de champignons ou de bactéries du sol. Enfin, certaines espèces de nématodes sont parasites, soit d'animaux (vertébrés ou invertébrés), soit de plantes. Ils sont généralement définis comme des vers ronds, à symétrie bilatérale, non segmentés, de taille microscopique. Néanmoins, la variabilité des nématodes est très importante : leur longueur peut varier de 82 μm pour *Greeffiella minutum*, un petit nématode marin, à 8 m de long pour *Placentonema gigantissima* qui parasite les cachalots (Barker 1998, Ferris and Ferris 1998). La majorité des nématodes phytoparasites mesurent entre 0,5 et 2 mm de long et environ 0,05 mm de diamètre.

1.2.2 Taxinomie

Dans le règne animal, les nématodes sont classés dans la section des Artiozoaires, la sous-section des Pseudo coelomates, l'embranchement des Némathelminthes.

Le phylum *Nematoda* ou *Nemata* (Eisenback 1998) a été pendant longtemps divisé en 2 classes, *Secernentea* et *Adenophora*, comprenant chacune des espèces phytoparasites. Les

données issues d'analyses moléculaires remettent en cause cette classification et une nouvelle classification a été proposée (Blaxter et al. 1998). Les auteurs divisent le phylum *Nematoda* en 5 clades majeurs, chacun des clades incluant des espèces parasites (figure 1.3). Ils suggèrent que le parasitisme animal serait survenu au moins 4 fois indépendamment, et le parasitisme végétal au moins 3 fois. Le nématode modèle *Caenorhabditis elegans* est classé dans un clade (clade V) ne comprenant pas de nématode phytoparasite.

Trois clades comportent des nématodes phytoparasites. Les nématodes ectoparasites des genres *Longidorus* et *Xiphinema* appartiennent à l'ordre des *Dorylaimida* et au clade I. Les nématodes vecteurs de virus, des genres *Trichodorus* et *Paratrichodorus*, appartiennent à l'ordre des *Triplonchida* et font partie du clade II.

Les nématodes endoparasites sont ceux qui causent le plus de dégâts sur les végétaux qu'ils attaquent. Ils appartiennent à l'ordre des *Tylenchidae* et sont classés dans le clade IV. Les nématodes des genres *Nacobus* et *Pratylenchus* font partie de la famille des *Pratylenchidae*, et ceux du genre *Ditylenchus* de la famille des *Anguinidae*. Les nématodes à kyste (*Globodera sp.* et *Heterodera sp.*) et les nématodes à galles (*Meloidogyne sp.*) font partie de la famille des *Heteroderidae* (<http://plpnemweb.ucdavis.edu/nemaplex/>).

1.2.3 Différences entre nématodes à galles et nématodes à kyste

Les espèces des genres *Meloidogyne* (nématodes à galles) et *Globodera* (nématodes à kyste) sont celles qui causent le plus de dégâts aux plantes de la famille des Solanacées et en particulier à la pomme de terre. Ce sont des endoparasites sédentaires qui induisent la formation de sites nourriciers complexes en manipulant la physiologie des racines des plantes qu'ils attaquent. Néanmoins, les espèces de ces deux genres sont caractérisées par un nombre important de différences.

1.2.3.1 Gamme d'hôtes, dégâts et symptômes

1.2.3.1.1 Nématodes à galles (*Meloidogyne sp.*)

Les espèces de nématodes à galles les plus fréquemment rencontrées sur Solanacées sont *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* et *M. javanica* en zones méditerranéenne, tropicale ou équatoriale, et *M. hapla*, *M. fallax* et *M. chitwoodi* en climat tempéré. Ces nématodes ont une gamme d'hôtes très large, l'ensemble des espèces de *Meloidogyne* pouvant attaquer plus de 2000 espèces végétales (Sasser 1980).

Des facteurs de l'hôte, communs à de nombreuses espèces, doivent être détournés par le nématode pour induire et maintenir les cellules géantes. Dans le même temps, le nématode doit éviter ou supprimer les mécanismes de résistance de l'hôte. Ainsi, *M. incognita* ne détruit que peu de cellules lors de sa migration intercellulaire et minimiserait l'activation des réactions de défense non spécifiques de l'hôte (Robertson 1996).

Les galles induites par ces nématodes sur les racines entravent la circulation de l'eau et des minéraux dans la plante, entraînant des pertes de rendement. Les tubercules fortement attaqués ne sont pas commercialisables, car ils présentent des déformations ou des pustules (Mugniéry 1996). *M. fallax* et *M. chitwoodi* sont classés comme parasites de quarantaine.

1.2.3.1.2 Nématodes à kyste (*Globodera* sp.)

Les espèces du genre *Globodera* ont une gamme d'hôte limitée à quelques espèces de la famille des Solanacées (Mugniéry 1996). Deux espèces attaquent la pomme de terre : *Globodera pallida* Stone (1972) et *G. rostochiensis* Wollenweber (1923).

G. pallida et *G. rostochiensis* provoquent le même type de dégâts. Ils pénètrent dans les racines et induisent une réduction du système racinaire, limitant ainsi l'absorption de l'eau et des nutriments. Des symptômes similaires à ceux induits en cas de stress hydrique, de carence minérale ou d'excès de désherbant sont alors observés sur la culture de pomme de terre (Mugniéry 1996). Des baisses de rendement de plus de 70 % peuvent être observées en cas de fortes infestations (Greco et al. 1984, Greco et al. 1982, Jimenez et al. 2000).

G. pallida et *G. rostochiensis* reconnaissent les plantes des espèces hôtes à leurs exsudats racinaires. Si des exsudats racinaires d'une plante hôte sont déposés sur des racines de plantes non-hôtes, il est possible de faire pénétrer des juvéniles J2 de nématodes à kyste dans ces racines. Néanmoins, le syncytium dégénère rapidement suite à une réaction nécrotique due à l'activation des mécanismes de défense de la plante (Blok et al. 1997).

La stimulation de l'éclosion des J2 de nématodes à kyste et la reconnaissance comme plante hôte semble être sous la dépendance de différents composés, présents dans les exsudats racinaires. Ainsi, les racines d'aubergine stimulent très faiblement l'éclosion des juvéniles des pathotypes européens de *G. pallida*, mais si les juvéniles sont déposés sur la racine, ils vont induire un syncytium et se développer normalement (D. Mugniéry, communication personnelle).

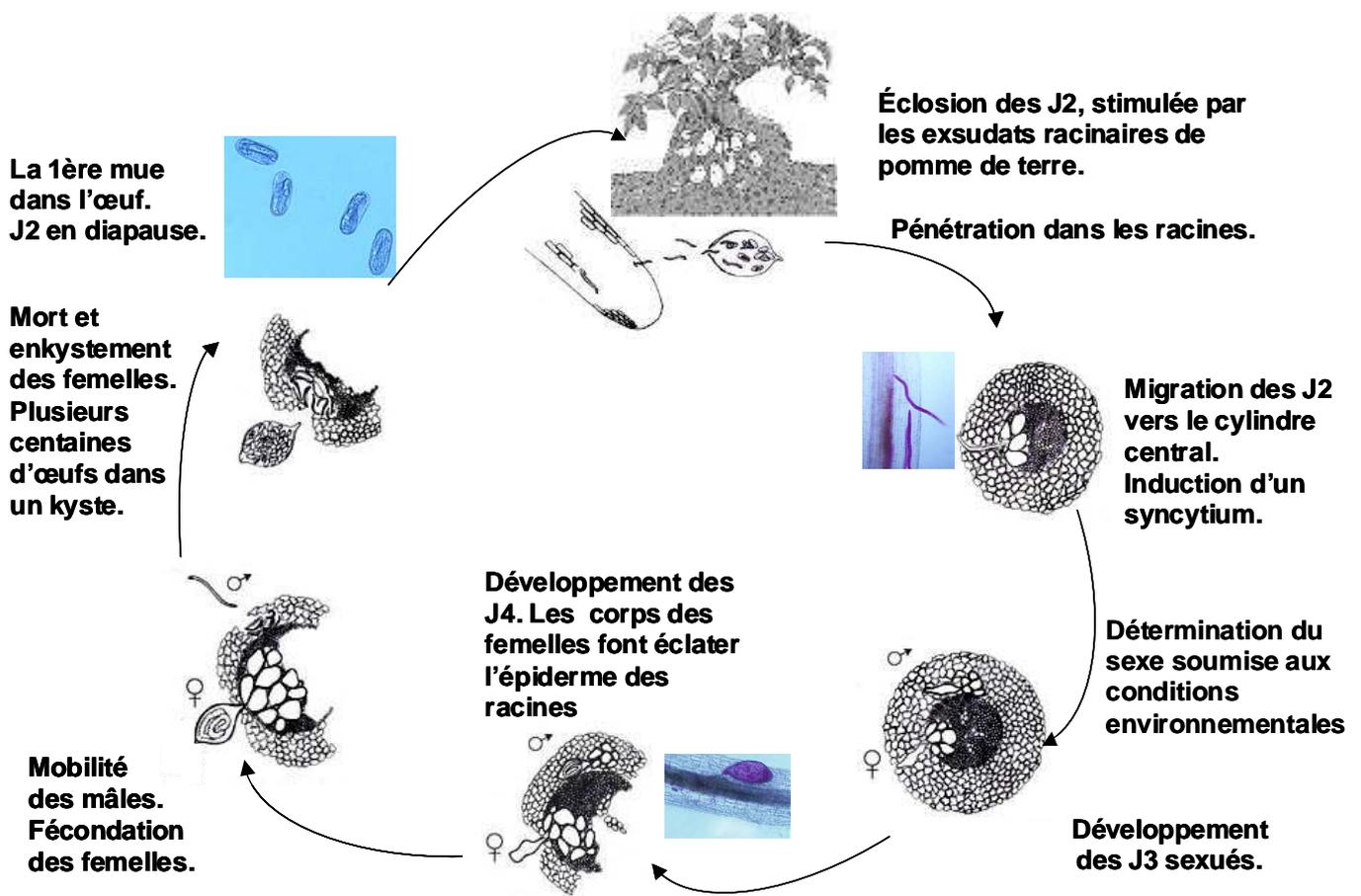


Figure 1.4: Cycle de développement des nématodes à kyste.

Ces nématodes sont surtout dommageables dans les régions à climat tempéré. En condition de forte infestation, le rendement peut être inférieur à la quantité de tubercules plantés (Oerke et al. 1994). Les larves en diapause, protégées par l'enveloppe du kyste, peuvent rester viables 15 à 20 ans dans le sol dans les conditions climatiques tempérées d'un pays comme la Grande Bretagne (Mugniéry 1996, Stone et al. 1973). Par contre, le potentiel infectieux du sol décroît de plus de 95 % en une année de culture sur une plante non-hôte en conditions climatiques chaudes telles que dans le sud du Maroc (Schluter 1976). *G. pallida* et *G. rostochiensis* sont classés comme parasites de quarantaine dans la plupart des pays européens et en Amérique du nord, ce qui permet de limiter les dégâts causés par ces parasites.

1.2.3.2 Cycle de développement

Les nématodes à galles et à kyste sont des endoparasites sédentaires. Ils passent par 4 stades juvéniles et un stade adulte. La première mue a lieu dans l'œuf.

1.2.3.2.1 Nématodes à kyste (Globodera sp.)

Le cycle de développement des nématodes à kyste est illustré sur la figure 1.4. Les juvéniles de deuxième stade (J2) de nématodes à kyste pénètrent par la zone d'élongation racinaire et progressent ensuite directement vers le cylindre central, détruisant les cellules corticales situées sur leur passage grâce à leur stylet et leurs sécrétions glandulaires. Arrivés à proximité de l'endoderme, ils testent, avec leur stylet, les cellules qui les entourent avant de choisir celle qui servira de point de départ à l'induction du site nourricier (Rice et al. 1985). Les critères qui déterminent ce choix ne sont pas encore connus. Le stylet perce la paroi de la cellule choisie et s'enfonce de quelques microns sans abîmer la membrane plasmique. Une sécrétion fluide, provenant des glandes œsophagiennes ou des amphides est projetée à l'intérieur de la cellule induisant d'importants changements cellulaires. Les parois latérales s'épaississent alors que la paroi distale s'amincit. Des plasmodesmes se forment entre cette cellule et les cellules adjacentes, situées à l'opposé du stylet du nématode. Celles-ci se modifient également et la lyse des parois situées entre ces cellules entraîne la formation d'une cellule géante multinucléée, à cytoplasme dense, appelé syncytium. L'expansion du syncytium est principalement longitudinale et se poursuit jusqu'au quatrième stade larvaire (Smant et al. 1998). Il peut être constitué de plus de 200 cellules fusionnées (Gheysen and Fenoll 2002). Les parois cellulaires adjacentes au xylème s'épaississent et s'invaginent probablement pour augmenter l'efficacité du transport de solutés des vaisseaux du xylème vers le syncytium

(Robertson 1996). Les nématodes se nourrissent du cytoplasme du syncytium par l'intermédiaire d'un tube alimentaire.

Les J2 subiront deux mues successives, donnant des juvéniles J3 puis J4, avant de se transformer lors d'une dernière mue en adultes sexués. Les mâles filiformes redeviennent mobiles. Les femelles restent en place et grossissent jusqu'à faire éclater l'épiderme de la racine. La copulation déclenche la ponte des ovocytes. La fécondation et l'embryogenèse ont lieu dans les oviductes de la femelle, généralement fécondée par plusieurs mâles. A la fin de l'embryogenèse, la femelle meurt. Sa cuticule, riche en tanins, durcit et se transforme en kyste protégeant ainsi 200 à 1200 œufs. Une première mue a lieu dans l'œuf et les juvéniles J2 en arrêt de développement (diapause) peuvent rester viables jusqu'à vingt ans dans l'enveloppe protectrice du kyste (Thiery 1996). La diapause ne sera levée que sous l'action du froid et des exsudats racinaires d'une autre culture de pomme de terre. On n'observe qu'une génération par an chez *G. pallida* et une à deux générations par an chez *G. rostochiensis* pour qui la diapause est moins longue (Mugniéry 1996).

Le déterminisme du sexe des nématodes à kyste est sous la dépendance des conditions environnementales (Grundler et al. 1991, Mugniéry and Fayet 1981, 1984) et la reproduction est strictement amphymictique (reproduction sexuée obligatoire). Les nématodes sont sexués à partir du stade larvaire J3 et le ratio mâle sur femelle est fonction des conditions d'alimentation des juvéniles J2. En conditions favorables, il y a développement d'un plus grand nombre de femelles. En conditions défavorables (compétition intra ou interspécifique trop importante, mauvais état physiologique de la plante attaquée, présence de certains gènes de résistance), un plus grand nombre de mâles se développent (Mugniéry 1996).

1.2.3.2.2 *Nématodes à galles (Meloidogyne sp.)*

Les juvéniles infestants (J2) de nématodes à galles pénètrent dans les racines par la zone d'élongation. Ils migrent vers l'apex de la racine entre les cellules corticales et sous-épidermiques, séparant les cellules au niveau de la lamelle moyenne. Dès qu'ils atteignent la zone de différenciation de l'endoderme, ils remontent jusqu'au cylindre vasculaire où ils induisent la formation de quatre à sept cellules géantes qui leur serviront de site nourricier (Wyss et al. 1992). Les cellules géantes, reliées entre elles par des plasmodesmes, entourent la tête du nématode qui va se nourrir alternativement dans chacune d'entre elles. Ces cellules géantes sont multinucléées et résultent d'une succession d'endomitoses sans cytokinèse. Les

cellules végétales situées autour des cellules géantes se divisent et forment les galles (Sijmons et al. 1994).

Les J2, sédentarisés au niveau de leur site nourricier, subiront trois mues successives avant de devenir adultes. La majorité des espèces de nématodes à galles se reproduisent par parthénogenèse mais en conditions défavorables certains juvéniles se développent en mâles. Les femelles pondent leurs œufs à l'extérieur de la racine dans une masse gélatineuse qu'elles sécrètent grâce à leurs glandes uro-génitales (Gheysen and Fenoll 2002). Les juvéniles éclosent immédiatement pour aller infester de nouvelles racines. Deux à trois cycles par an peuvent avoir lieu en France contre une dizaine en zone tropicale (Mugniéry 1996).

1.3 Gènes impliqués dans l'interaction plante-nématode, et résistance aux nématodes endoparasites chez les Solanacées

Des revues récentes ont été publiées sur l'étude des gènes impliqués dans l'interaction plante-nématode (Davis et al. 2000, Gheysen and Fenoll 2002, Jasmer et al. 2003, Williamson and Gleason 2003).

Des études d'expression ont été réalisées au niveau de racines de plantes (infectées et/ou non infectées), en particulier au niveau des sites nourriciers induits par le nématode, afin de mettre en évidence les gènes dont l'expression est influencée par celui-ci (Lambert et al. 1999, Vaghchhipawala et al. 2001, Wang et al. 2003).

Peu de temps après l'infection d'une plante par des nématodes, des gènes de défense non spécifiques sont activés, dans l'interaction compatible comme dans l'interaction incompatible, avec cependant des différences de niveau d'expression et des décalages dans le temps après infection (Williamson and Hussey 1996). Néanmoins, des promoteurs de gènes induits habituellement par des pathogènes sont inactivés dans les sites nourriciers des nématodes, suggérant une suppression active des réactions de défense de la plante. Cette suppression des réactions de défenses, alliée à une batterie d'antioxydants endogènes, permettent au nématode d'effectuer sa migration dans la racine jusqu'à son site nourricier et de maintenir l'intégrité de celui-ci tout au long de son développement (Gheysen and Fenoll 2002, Williamson and Gleason 2003).

Il semblerait que l'établissement d'un site nourricier commence par une stimulation hormonale du cycle cellulaire et des modifications des parois cellulaires. L'application d'auxine exogène sur des tissus de plantes entraîne des réactions communes avec ce qu'on observe lors de

l'induction du site nourricier par les nématodes (Gheysen and Fenoll 2002). Plusieurs gènes régulés par l'auxine et l'éthylène sont surexprimés dans les sites nourriciers (Goverse et al. 2000b, Wubben et al. 2001). Les nématodes à kyste et à galles possèdent des molécules capables d'altérer les balances hormonales. Des chorismate mutases ont été identifiées chez les nématodes à kyste et à galles (Bekal et al. 2003, Doyle and Lambert 2003). Cette enzyme agit sur la voie de biosynthèse des flavonoïdes, molécules qui ont un rôle dans l'inhibition du transport de l'auxine chez les plantes. Ce mécanisme permettrait d'augmenter la concentration en auxine au voisinage du site nourricier et de favoriser l'établissement de celui-ci par les nématodes (Gheysen and Fenoll 2002).

Parmi les événements communs observés lors de l'application d'auxine et lors de l'établissement d'un site nourricier, il y a une activation et une modification du cycle cellulaire (Gheysen and Fenoll 2002, Goverse et al. 2000a). Lors de l'induction des cellules géantes par les nématodes à galles, il se produit une succession de mitoses sans cytokinèse, alors que lors de l'induction du syncytium par les nématodes à kyste, on assiste à des endoreduplications correspondant à une succession de phases S sans mitose apparente (Gheysen and Fenoll 2002). L'application d'inhibiteurs du cycle cellulaire entraînent un arrêt du développement des cellules nourricières (De Almeida Engler et al. 1999). La présence de protéines ayant des activités kinase/phosphatase a été démontrée chez les nématodes à kyste. Ces protéines du nématode pourraient également agir directement sur des régulateurs du cycle cellulaire indépendamment des mécanismes hormonaux (Gheysen and Fenoll 2002).

Les phytohormones sont également des régulateurs de gènes codant pour des expansines et des enzymes hydrolytiques. Des β -1,4 endoglucanases (Goellner et al. 2001), pectine acétyl esterases (Vercauteren et al. 2002), polygalacturonases (Mahalingam et al. 1999) et expansines (Gheysen and Fenoll 2002) de l'hôte sont surexprimées dans les sites nourriciers des nématodes à kyste et à galles. Les nématodes possèdent également un arsenal d'enzymes codant pour des fonctions similaires : β -1,4 endoglucanase (Rosso et al. 1999, Smant et al. 1998), pectate lyase (Popeijus et al. 2000), et polygalacturonase (Jaubert et al. 2002). Une expansine, protéine qui n'avait jusqu'à présent été décrite que chez les plantes, a également été trouvée chez *G. rostochiensis* (Qin et al. 2004). Ces enzymes sont sécrétées par le nématode au cours de sa migration vers le cylindre central, mais ne semblent pas servir à l'établissement du site nourricier (Goellner et al. 2000).

Des gènes du métabolisme général et des facteurs de transcription sont surexprimés dans les sites nourriciers (Vaghchhipawala et al. 2001, Vercauteren et al. 2001). La surexpression de

tels gènes concorde avec l'intense activité métabolique observée dans les sites nourriciers et leur fonction de puits métaboliques.

Certains gènes, surexprimés dans les nodules des plantes lors de l'induction de symbioses par les bactéries endosymbiotiques, le sont également dans les cellules géantes des nématodes à galles (Koltai et al. 2001). Néanmoins, seule une faible proportion de gènes surexprimés dans les nodules le sont également dans les cellules géantes (Favery et al. 2002).

C'est avec des endoglucanases et des chorismate mutases bactériennes que les endoglucanases et chorismate mutases des nématodes à galles et à kyste montrent la plus forte similarité. D'autres gènes de nématodes phytoparasites montrent également de fortes similarités avec des gènes bactériens. Ces observations suggèrent la possibilité d'acquisition par les nématodes de gènes microbiens par transfert horizontal (Davis et al. 2000).

1.4 La résistance aux nématodes endoparasites chez les Solanacées

1.4.1 Etapes du cycle du nématode sur lesquelles peuvent agir les gènes de résistance

La résistance d'une plante aux nématodes a été définie comme l'aptitude de la plante hôte à réduire ou à prévenir la reproduction du nématode (Trudgill 1991). Potentiellement, les gènes de résistance de l'hôte peuvent avoir une action sur toutes les étapes clés du cycle infectieux du nématode. Des différences importantes entre les nématodes à kyste et à galles se manifestent sur les premières phases du cycle.

1.4.1.1 Lors de l'éclosion

Contrairement aux nématodes à galles (*Meloidogyne* sp.), les juvéniles J2 de nématodes à kyste (*Globodera* sp.) ont besoin d'une stimulation par les exsudats racinaires de la plante hôte pour éclore du kyste. Arntzen et al. (1993) ont montré que les exsudats racinaires de différents génotypes de pomme de terre peuvent stimuler de façon différente l'éclosion des juvéniles de *G. pallida* : cette éclosion peut être retardée et le pourcentage final de juvéniles éclos être plus faible chez certaines variétés partiellement résistantes.

1.4.1.2 Lors de la pénétration et de la migration du nématode dans la racine

Les gènes de résistance aux nématodes à kyste décrits jusqu'à présent chez les Solanacées ne s'opposent pas à la pénétration et à la migration du nématode.

La résistance aux nématodes à galles peut s'exprimer très tôt lors de la pénétration et des premières étapes de migration dans la racine. C'est le cas de la résistance conférée par les gènes *Mh* de *S. sparsipilum* et *Me3* du piment face aux espèces tropicales de *Meloidogyne* (Berthou et al. 2003b, Bleve-Zacheo et al. 1998). Kouassi et al. (2004) ont montré qu'un mécanisme de résistance induite, inhibant la pénétration de *M. fallax* dans les racines de *S. sparsipilum*, se mettait en place après une première infection par ce nématode.

1.4.1.3 Lors de l'induction du site nourricier

Chez la pomme de terre, l'expression de la résistance conférée par le gène *H1*, conférant la résistance à *G. rostochiensis* et originaire de *S. tuberosum* ssp. *andigena*, est détectée dans la cellule nourricière initiale deux jours après l'initiation du syncytium et se poursuit par une nécrose des cellules environnantes, empêchant le fonctionnement du syncytium comme cellule de transfert (Mugniery and Balandras 1986, Rice et al. 1985). Le même type de réaction est observée chez les tomates possédant le gène *Hero*, qui confère la résistance à *G. rostochiensis* (Ernst et al. 2002). Dans le cas de la résistance polygénique à *G. pallida* et *G. rostochiensis* originaire de *Solanum vernei*, et de la résistance à *G. pallida* conférée par le gène *Gpa2* de *S. tuberosum* ssp. *andigena*, le développement du syncytium est freiné sans qu'on observe de réactions de nécrose autour de celui-ci. Suite aux mauvaises conditions d'alimentation dues à un syncytium atrophié, la plupart des nématodes se développent en mâles, ce qui réduit le taux de multiplication de ce parasite (Bakker 2003, Rice et al. 1987).

La résistance aux nématodes à galles conférée par le gène *Mi* de la tomate ne se met en place que lorsque le nématode a atteint son site nourricier. Il s'agit d'une résistance par hypersensibilité caractérisée par la présence de cellules nécrosées autour de la tête du nématode. Cette nécrose intervient avant que le développement d'une cellule géante ne soit visible (Paulson and Webster 1972). Ce timing et le mode de migration extracellulaire des nématodes à galles semblent indiquer que la pénétration du stylet du nématode dans la première cellule nourricière est un préalable à la mise en place de la réaction de défense. Toutefois, des réactions de résistance précoces à *M. incognita* ont été observées dès la migration de ce nématode dans des racines de tomates possédant le gène *Mi* (P. Castagnone-Sereno et D. Mugniéry, communication personnelle).

1.4.1.4 Lors du développement larvaire et de la différenciation sexuelle

La différenciation sexuelle des nématodes à kyste étant strictement épigénétique, l'expression de la résistance se manifeste fréquemment par une inversion du sexe-ratio habituellement

observé sur plantes sensibles. En conditions favorables, plus de 90 % des juvéniles évoluent en femelles adultes. Lorsqu'une résistance se manifeste par une perturbation du développement des syncytia, et donc par une moins bonne alimentation des nématodes, ceux-ci restent bloqués à un stade larvaire ou évoluent préférentiellement en mâles (Mugniéry and Fayet 1981, 1984, Rice et al. 1985, Rice et al. 1987).

1.4.2 Les sources de résistance aux nématodes chez les Solanacées

1.4.2.1 Chez la tomate

1.4.2.1.1 Résistance aux nématodes à galles (*Meloidogyne sp.*)

Actuellement, toutes les variétés de tomates résistantes aux nématodes à galles possèdent le gène *Mi-1* qui confère la résistance à *M. incognita*, *M. javanica*, et *M. arenaria* (Ammiraju et al. 2003, Williamson 1998). Ce gène a été introgressé dans l'espèce *L. esculentum* à partir de *L. peruvianum* au début des années 1940. Ces deux espèces se croisent très difficilement et l'hybride qui est à l'origine de cette introgression a été obtenu par sauvetage d'embryon (Smith 1944).

Des variétés de tomate possédant *Mi-1* ont été déployées à grande échelle depuis plus de 20 ans et des populations de *Meloidogyne* contournant *Mi-1* ont été isolées sur ces variétés (Castagnone-Sereno et al. 1996). De plus, la résistance conférée par *Mi-1* n'est pas efficace au-dessus de 28°C (Dropkin 1969). De nouvelles sources de résistance ont été recherchées dans les banques de gènes du genre *Lycopersicon*. La plupart des accessions résistantes ont été trouvées au sein du complexe *L. peruvianum* (Ammati et al. 1985, Veremis et al. 1999, Veremis and Roberts 1996a, 1996c, 1996b, 2000, Yaghoobi et al. 1995). Neuf gènes majeurs de résistance (de *Mi-1* à *Mi-9*) à une ou plusieurs espèces de *Meloidogyne*, stables ou non à haute température, ont été décrits (Williamson 1998). Certains de ces gènes sont en cours d'introgression dans le génome de *L. esculentum* grâce à l'utilisation de sauvetage d'embryon *in vitro*, ou par croisement avec des espèces pont (Ammiraju et al. 2003).

1.4.2.1.2 Résistance aux nématodes à kyste (*Globodera sp.*)

L'importance économique des dégâts causés par les nématodes à kyste sur la tomate est bien moindre que celle des dégâts causés par les nématodes à galles. C'est pourquoi la résistance aux nématodes à kyste a été moins étudiée chez cette espèce (Ganal et al. 1995). Néanmoins, des accessions des espèces apparentées à la tomate, *L. pimpinellifolium* et *L. peruvianum*,

présentent de bons niveaux de résistance (Ellis 1968). Un gène majeur, *Hero*, conférant la résistance à tous les pathotypes de *G. rostochiensis*, a été introgressé dans l'espèce cultivée *L. esculentum*.

1.4.2.2 Chez le piment

Des recherches de résistances aux nématodes à galles ont été entreprises au sein du genre *Capsicum*. Des accessions résistantes ont été trouvées chez *C. annuum* (Hendy et al. 1983, 1985), *C. chacoense*, *C. chinense*, et *C. frutescens* (di Vito et al. 1992a, di Vito et al. 1993). Les gènes originaires de *C. annuum* ont été utilisés dans les programmes de sélection. Le spectre d'action et la durabilité de ces gènes sont variables. *Me-1* et *Me-3* confèrent la résistance aux 3 espèces tropicales *M. incognita*, *M. javanica*, et *M. arenaria*, *Me-1* étant plus difficile à contourner que *Me-3* (Castagnone-Sereno 2002, Castagnone-Sereno et al. 1996). D'autres gènes conférant la résistance à *M. chitwoodii* sont en cours de caractérisation.

Le piment n'est pas une plante hôte des nématodes à kyste.

1.4.2.3 Chez l'aubergine

Aucune source de résistance aux nématodes à galles n'a été trouvée dans l'espèce cultivée en Europe *Solanum melongena* (Fassuliotis 1973). Des accessions résistantes ont été découvertes au sein des espèces apparentées *S. sisymbriifolium*, *S. torvum*, et *S. warscewiczii* (Daunay and Dalmaso 1985, di Vito et al. 1992b).

Les nématodes à kyste ne sont pas considérés comme des parasites importants de l'aubergine. En effet, les exsudats racinaires d'aubergine ne stimulent que faiblement l'éclosion des juvéniles de nématodes à kyste et certaines populations européennes de *Globodera* ont perdu l'aptitude à infecter l'aubergine (Roberts and Stone 1981). Aucune résistance n'a été trouvée dans les espèces d'aubergines originaires de l'ancien monde. En revanche, Roberts and Stone (1983) en ont trouvé dans les espèces *S. torvum* et *S. viarum* provenant d'Amérique latine d'où sont originaires les nématodes à kyste.

1.4.2.4 Chez la pomme de terre

Aucune résistance aux nématodes n'a été trouvée au sein de l'espèce *S. tuberosum ssp. tuberosum*. En revanche, de nombreuses espèces apparentées sont résistantes aux nématodes à kyste ou à galles.

1.4.2.4.1 Résistance aux nématodes à galles (*Meloidogyne sp.*)

Des résistances à différentes espèces de nématodes à galles ont été trouvées dans des espèces apparentées à *S. tuberosum* (Berthou et al. 2003a, Brodie and Plaisted 1976, Brown et al. 1989, 1991, Janssen et al. 1996, Jatala and Rowe 1976, Kouassi et al. 2004). Des facteurs génétiques de résistance originaires de *S. bulbocastanum* (Brown et al. 1995), *S. hougasii* (Brown et al. 1999), et *S. sparsipilum* (Berthou et al. 2003a, Kouassi et al. 2004) ont été introgressés dans le génome de *S. tuberosum*.

1.4.2.4.2 Résistance aux nématodes à kyste (*Globodera sp.*)

Des facteurs génétiques de résistance aux nématodes à kyste provenant des espèces *S. tuberosum ssp.andigena* et *S. vernei* ont été incorporés depuis plusieurs décennies dans les programmes de sélection (Ross 1986, Rousselle-Bourgeois and Mugniéry 1995) et sont actuellement présents dans des variétés commerciales. C'est le cas en particulier du gène *H1*, originaire de *S. tuberosum ssp.andigena*, qui confère la résistance aux pathotypes Ro1 et Ro4 de *G. rostochiensis* (Ellenby 1954). Ce gène est présent dans la variété "Maris Piper" inscrite au catalogue anglais en 1967.

La résistance conférée par le gène *H1*, ne couvre pas tous les pathotypes de *G. rostochiensis*, et la résistance à *G. pallida* originaire de *S. vernei* est polygénique et donc difficile à introduire dans une variété. C'est pourquoi des évaluations pour la résistance aux nématodes à kyste ont été réalisées sur des accessions de plus de 100 espèces apparentées à la pomme de terre (Castelli et al. 2003, Dellaert and Hoekstra 1987, Rousselle-Bourgeois and Mugniéry 1995, Ruiz De Galarreta et al. 1998, Turner 1989). Les espèces les plus fréquemment citées comme sources de résistance sont *S. tuberosum ssp.andigena*, *S. vernei*, *S. gourlayi*, et *S. spgazzinii* pour *G. rostochiensis*, et *S. vernei*, *S. gourlayi*, *S. spgazzinii*, et *S. sparsipilum* pour *G. pallida* (Dellaert and Hoekstra 1987, Rousselle-Bourgeois and Mugniéry 1995, Turner 1989). Castelli et al. (2003) trouvent une proportion identique d'accessions résistantes à *G. pallida* quel que soit l'origine géographique (nord ou sud de l'Amérique latine) des espèces apparentées à la pomme de terre qu'ils ont testées. Inversement, les accessions issues d'espèces originaires du sud de la Bolivie sont plus fréquemment résistantes à *G. rostochiensis* que celles collectées plus au nord. Les auteurs attribuent cette distribution géographique différente entre les accessions à *G. pallida* et à *G. rostochiensis*, à la coévolution entre les espèces de pomme de terre et les espèces de nématodes à kyste. En effet, *G. rostochiensis* est

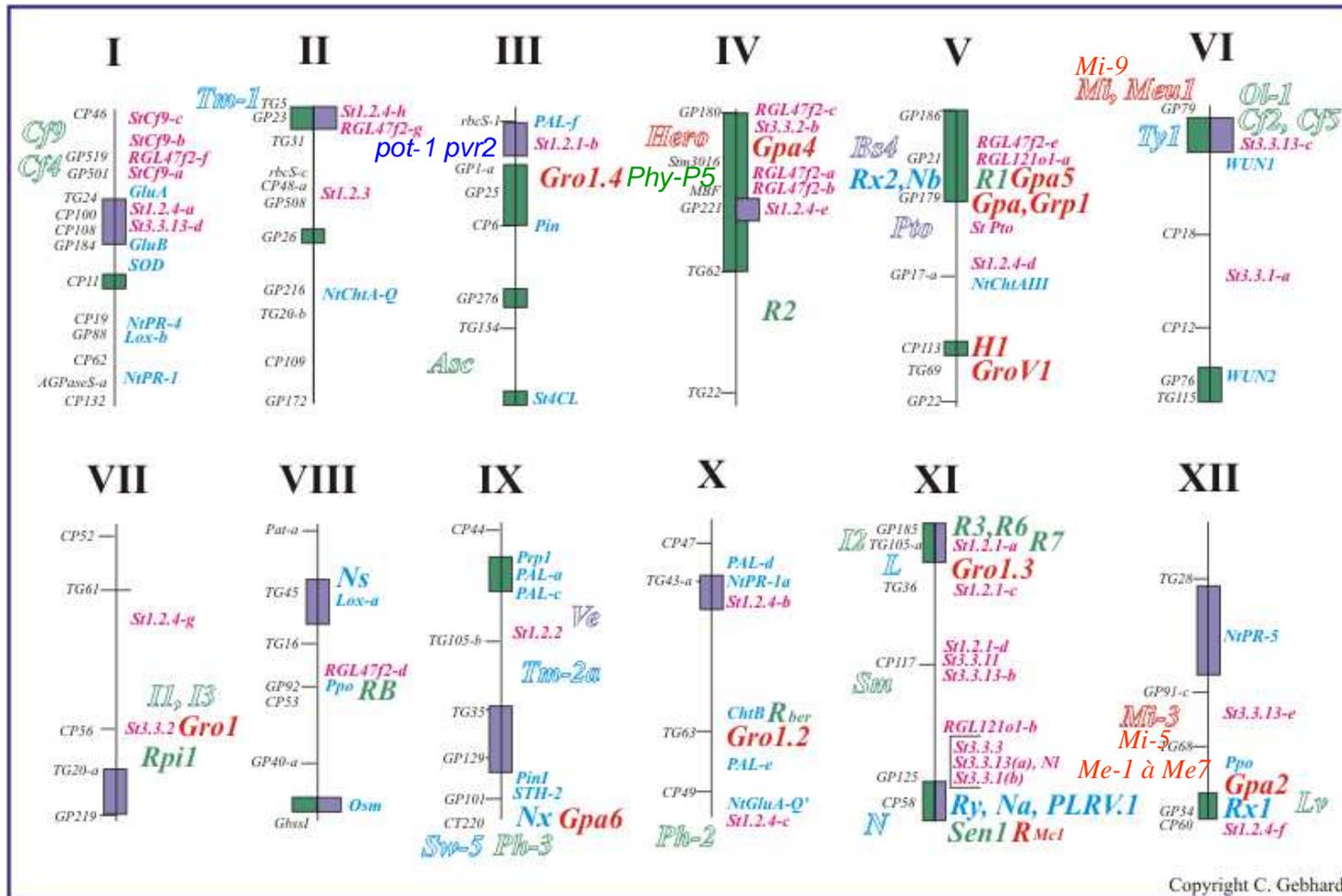


Figure 1.5: Carte fonctionnelle de la pomme de terre pour la résistance aux bioagresseurs (d'après Gebhardt et Valkonen (2001) ; APOPHYS Potato Resistance Map <http://www.dpw.wau.nl/pv/projects/apophys/>). Les 12 groupes de liaison correspondent aux 12 chromosomes de la pomme de terre orientés selon Dong et al. (2000). Les marqueurs RFLP sont indiqués en petites lettres à gauche des chromosomes. Les gènes de résistance de pomme de terre (en lettres pleines) et de tomate, tabac ou piment (en lettres creuses, à l'exception de *Phy-P5*, *Mi-5*, *Mi-9*; *Me-1* à *Me-7*, *pot-1* et *pvr2*) sont indiqués à leur position approximative par rapport aux marqueurs RFLP. En vert : gènes de résistance aux champignons et oomycètes. En rouge : gènes de résistance aux nématodes et aux pucerons. En bleu : gènes de résistances aux virus. Les QTL de résistance à *Phytophthora infestans* et à *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* sont représentés respectivement par des rectangles verts et violets. Les homologues de gènes de résistance (locus St et RGL) ou de gènes de défense (locus Nt) sont indiqués à droite des chromosomes.

plus fréquemment rencontré au sud du continent, alors que *G. pallida* est distribué dans toute l'Amérique latine.

1.4.3 Hérité et cartographie des facteurs génétiques de résistance aux nématodes chez la tomate et le piment

Les gènes décrits dans ce chapitre sont représentés sur la figure 1.5 et décrits dans le tableau 1.1.

1.4.3.1 Facteurs génétiques de résistance aux nématodes chez la tomate

Neuf gènes majeurs de résistance (de *Mi-1* à *Mi-9*) à une ou plusieurs espèces de *Meloidogyne*, stables ou non à haute température, ont été cartographiés ou ont fait l'objet de tests d'indépendance. *Mi-1* et *Mi-9* ont été cartographiés sur le chromosome 6 (Ammiraju et al. 2003, Messeguer et al. 1991), et *Mi-3* sur le chromosome 12 (Yaghoobi et al. 1995) ; *Mi-5* est lié à *Mi-3* (Veremis and Roberts 1996b). *Mi-2* et *Mi-8* d'une part, et *Mi-6* et *Mi-7* d'autre part, sont liés entre eux et sont indépendants de *Mi-1* et de *Mi-3*.

Le gène *Hero* conférant la résistance à *G. rostochiensis* a été cartographié sur le chromosome 4 de la tomate (Ganal et al. 1995) et récemment cloné (Ernst et al. 2002).

1.4.3.2 Facteurs génétiques de résistance aux nématodes chez le piment

Sept gènes majeurs conférant la résistance à une ou plusieurs espèces de *Meloidogyne* (nématodes à galles) ont été localisés sur le génome de *C. annuum* (*Me-1* à *Me-7*). Tous sont positionnés sur le chromosome P9 dans une position probablement synténique avec les gènes *Gpa2* de la pomme de terre et *Mi-3* de la tomate (Djian-Caporalino et al. 2001 ; A. Palloix, communication personnelle).

1.4.4 Hérité et cartographie des facteurs génétiques de résistance aux nématodes chez la pomme de terre

Les gènes décrits dans ce chapitre sont représentés sur la figure 1.5 et décrits dans le tableau 1.1.

Un seul gène de résistance aux nématodes à galles (*Meloidogyne* sp.) a été cartographié chez la pomme de terre. Il s'agit du gène *Rmc1*, originaire de *S. bulbocastanum*, qui confère la résistance à *M. chitwoodi*, et *M. fallax* (Roupe van der Voort et al. 1999b).

Tableau n°1.1 : Gènes et QTL de résistance aux nématodes, cartographiés chez les Solanacées. Les chiffres romains correspondent aux chromosomes de la pomme de terre. T4, T6 et T12 correspondent aux chromosomes 4, 6 et 12 de la tomate. P9 correspond au chromosome 9 du piment.

Chromosome	Nom du gène	Espèce d'origine	Caractéristiques	Références Bibliographiques	Espèce et pathotype
III	<i>Gro1.4</i> QTL	<i>S. spegazzinii</i>	QTL mineur	Kreike et al., 1996	<i>G. rostochiensis</i> Ro1
IV	<i>Gpa4</i>	<i>S.andigena</i> CPC1673	QTL à effet fort	Bradshaw et al., 1998	<i>G. pallida</i> Pa2/3
T4	<i>Hero</i>	<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i>	LZ-NBS-LRR	Ganal et al., 1995 Ernst et al., 2002	Tous les pathotypes de <i>G. rostochiensis</i>
V	<i>Gpa</i>	<i>S. spegazzinii</i>	QTL à effet fort	Kreike et al., 1994	<i>G. pallida</i> Pa2 et Pa3
V	<i>Gpa5</i>	<i>S. vernei</i>	QTL à effet fort	Roupe van der Voort et al., 2000 Bryan et al., 2002	<i>G. pallida</i> Pa2 et Pa3
V	<i>Grp1</i>	<i>Solanum</i> sp.	QTL à effet fort	Roupe van der Voort et al., 1998	<i>G. rostochiensis</i> Ro1, Ro5, et <i>G. pallida</i> Pa2 et Pa3
V	<i>H1</i>	<i>S.andigena</i> CPC1673	Gène majeur	Gebhardt et al., 1993 ; Pineda et al., 1993 ; Niewöhner et al., 1995	<i>G. rostochiensis</i> Ro1 et Ro4
V	<i>GroV1</i>	<i>S. vernei</i>	Gène majeur	Jacobs et al., 1996	<i>G. rostochiensis</i> Ro1 et Ro4
T6	<i>Mi-1</i>	<i>L. peruvianum</i>	Gène majeur LZ-NBS-LRR	Milligan et al., 1998	<i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M. arenaria</i> + <i>Macrosiphon</i> + <i>Bemisia</i>
T6	<i>Mi-9</i>	<i>L. peruvianum</i>	Gène majeur	Ammiraju et al. 2003	<i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M. arenaria</i>
VII	<i>Gro1</i>	<i>S. spegazzinii</i>	Gène majeur TIR-NBS-LRR	Barone et al., 1990 Paal et al., 2004	<i>G. rostochiensis</i> Ro1
IX	<i>Gpa6</i>	<i>S. vernei</i>	QTL mineur	Roupe van der Voort et al., 2000 Bryan et al., 2002	<i>G. pallida</i> Pa3
X	<i>Gro1.2</i> QTL	<i>S. spegazzinii</i>	QTL mineur	Kreike et al., 1993	<i>G. rostochiensis</i> Ro1
XI	<i>Gro1.3</i> QTL	<i>S. spegazzinii</i>	QTL mineur	Kreike et al., 1993	<i>G. rostochiensis</i> Ro1
XI	<i>Gpa3</i>	<i>S. tarijense</i>	QTL à effet fort	Wolters et al., 1999 Ritter, comm. pers.	<i>G. pallida</i> large spectre
XI	<i>Rmc1</i>	<i>S. bulbocastanum</i>	Gène majeur	Roupe van der Voort et al., 1999	<i>M. chitwoodi</i> , et <i>M. fallax</i>
XII	<i>Gpa2</i>	<i>S. andigena</i>	Gène majeur LZ-NBS-LRR	Roupe van der Voort et al., 1997b Van der Vossen et al., 2000	<i>G. pallida</i> Pa2 population D383 et D372
T12	<i>Mi-3</i> et <i>Mi-5</i>	<i>L. peruvianum</i>	Gènes majeurs	Yaghoobi et al. 1995 Veremis and Roberts 1996	<i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M. arenaria</i>
P9 synténie avec VII ou XII	<i>Me1</i> et <i>Me3</i>	<i>Capsicum annuum</i>	Gènes majeurs	Hendy et al., 1985 Djian-Caporalino et al. 2001	<i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i> , <i>M. arenaria</i>
P9 synténie avec VII ou XII	<i>Me4</i>	<i>Capsicum annuum</i>	Gènes majeurs	Djian-Caporalino et al. 2001	<i>M. arenaria</i>

1.4.4.1 Classifications des nématodes à kyste (*Globodera* sp.) en pathotypes

Si la différenciation de *G. pallida* et *G. rostochiensis* en deux espèces semble bien établie, il n'en va pas de même pour distinguer différentes populations au sein de chaque espèce. Kort *et al.* (1977) ont tenté d'établir une classification des populations européennes de chacune de ces espèces en pathotypes, en fonction de leur comportement sur une gamme d'hôtes différentiels. Ils ont distingué 5 pathotypes de *G. rostochiensis* (Ro1 à Ro5) et trois pathotypes de *G. pallida* (Pa1 à Pa3). Toutefois, le concept de pathotype suppose que l'on connaisse les gènes impliqués dans la résistance chez tous les hôtes différentiels, que la résistance soit monogénique, et que tous les individus appartenant à un même pathotype aient tous les mêmes gènes de virulence. Ces conditions n'étant pas remplies ou étant difficiles à vérifier, le schéma proposé par les auteurs reste très imprécis. Les seules interactions clairement définies concernent les gènes *H1* et *H2* (tableau 1.2). Le gène *H1* originaire du clone de *S. tuberosum* subsp. *andigena* CPC1673 (CPC : Commonwealth Potato Collection), permet de différencier les pathotypes Ro1 et Ro4 avirulents, des pathotypes Ro2, Ro3, et Ro5 virulents. De la même façon, les populations de *G. pallida* qui ne se développent pas sur les plantes possédant le gène *H2*, originaire d'un clone de *S. multidissectum*, sont identifiées comme faisant partie du pathotype Pa1 (Mugniéry *et al.* 1989).

1.4.4.2 Cartographie de facteurs génétiques de résistance aux nématodes à kyste

A ce jour, 12 gènes et QTL de résistance aux nématodes à kyste ont été cartographiés sur le génome de la pomme de terre (figure 1.5).

1.4.4.2.1 Cartographie de facteurs génétiques de résistance à *G. rostochiensis*

Un gène de résistance dominant nommé *H1* a été identifié chez le clone de *S. tuberosum* subsp. *andigena* CPC1673. Ce gène, qui induit une résistance totale contre les pathotypes Ro1 et Ro4 de *G. rostochiensis*, a été cartographié sur le bras long du chromosome V (Gebhardt *et al.* 1993, Pineda *et al.* 1993). Il est présent depuis plus de 30 ans dans des variétés commerciales et n'a pas été contourné au Royaume-Uni où seuls les pathotypes Ro1 et Ro4 de *G. rostochiensis* sont présents.

Sur le même bras chromosomique mais en position plus distale, a été cartographié *GroVI*, originaire de *S. vernei* (Jacobs *et al.* 1996). Ce gène dominant induit une résistance partielle aux pathotypes Ro1 et Ro4. Les individus possédant ce gène permettent le développement de

Tableau 1.2 : Distinction des pathotypes de *G. pallida* et *G. rostochiensis* sur des clones possédant des résistances conférées par des gènes majeurs (d'après Kort et al., 1977).

Espèce d'origine	Gène de résistance	réaction incompatible (résistance)	réaction compatible (sensibilité)
<i>S. tuberosum</i> subsp. <i>andigena</i>	<i>H1</i>	<i>G. rostochiensis</i> Ro1/4	<i>G. rostochiensis</i> Ro2/3/5
<i>S. multidissectum</i>	<i>H2</i>	<i>G. pallida</i> Pa1	<i>G. pallida</i> Pa2/3

0 à 30 kystes par plante, alors que plus de 100 kystes par plante sont observés sur les individus sensibles.

Toujours sur le chromosome V, mais cette fois-ci sur l'autre bras, un QTL de résistance à *G. rostochiensis* a été cartographié (Roupe van der Voort et al. 1998). Ce QTL, appelé *Grp1*, confère également une résistance partielle à *G. pallida*. Le clone tétraploïde duquel est issu le parent résistant utilisé par les auteurs, a dans son pedigree de nombreux clones d'espèces sauvages, en particulier trois clones de *S. vernei*, un clone de *S. oplocense*, et le clone de *S. tuberosum* subsp. *andigena* CPC1673.

Barone et al. (1990) ont localisé un gène majeur de résistance, nommé *Gro1*, provenant de *S. spegazzinii* sur le chromosome VII de la pomme de terre. Des QTL de résistance provenant de cette même espèce ont également été cartographiés sur les chromosomes III (*Gro1.4*), X (*Gro1.2*), et XI (*Gro1.3*) (Kreike et al. 1993, Kreike et al. 1996).

1.4.4.2.2 Cartographie de facteurs génétiques de résistance à *G. pallida*

Le clone de *S. spegazzinii* résistant à *G. rostochiensis*, utilisé par Kreike et al. (1993), présentait également une résistance à *G. pallida* (Kreike et al. 1994). Toutefois les QTL impliqués dans ces deux résistances sont différents. Les auteurs ont localisé sur le chromosome V un QTL (nommé *Gpa*) expliquant environ la moitié de la résistance à *G. pallida*. Deux QTL à effet plus faible ont été positionnés sur les chromosomes IV et VII.

Le QTL *Grp1* est également actif contre *G. pallida*. Roupe van der Voort et al. (1998) l'ont cartographié sur le chromosome V, dans la même zone chromosomique que *Gpa*.

Au moins deux QTL expliquent la résistance originaire de *S. vernei*. Le QTL à effet fort, nommé *Gpa5*, est localisé sur le bras court du chromosome V dans la même région que *Gpa* et *Grp1*. Le QTL à effet faible (*Gpa6*) est localisé sur le bras long du chromosome IX (Bryan et al. 2002, Roupe van der Voort et al. 2000).

Roupe van der Voort et al. (1997a) ont cartographié un gène majeur de résistance à *G. pallida* sur le chromosome XII. Toutefois ce gène, nommé *Gpa2*, n'est actif que contre 2 populations de nématodes. Ce gène provient du même clone de *S. tuberosum* subsp. *andigena* (CPC 1673) que le gène *H1*, cité au paragraphe précédent. Il est également physiquement lié à *Rx* (Roupe van der Voort et al. 1999a), gène de résistance au virus X de la pomme de terre (Bendahmane et al. 1997, Ritter et al. 1991). *Gpa2* a été introduit fortuitement dans des variétés commerciales suite à la sélection pour la résistance au virus X.

Un QTL à effet fort, originaire de *S. tarijense*, a été cartographié sur le bras court du chromosome XI. Ce QTL, nommé *Gpa3* est efficace contre un grand nombre de populations de *G. pallida* (Wolters et al. 1999 ; E. Ritter, communication personnelle).

Un clone de l'espèce *S. tuberosum* subsp. *andigena* est à l'origine du QTL de résistance à *G. pallida* cartographié par Bradshaw et al. (1998) sur le chromosome IV.

1.5 Répartition des facteurs de résistance sur le génome des Solanacées

Des gènes ou QTL de résistance à différents bioagresseurs ont été cartographiés sur tous les chromosomes de la pomme de terre, de la tomate, et du piment (Gebhardt and Valkonen 2001, Grube et al. 2000, Lefebvre 2004). Néanmoins, ces gènes et QTL ne se répartissent pas de manière homogène sur le génome, mais se regroupent dans des points chauds ou clusters. Chez la pomme de terre, les principaux clusters (composés d'au moins 3 gènes ou QTL) sont situés sur les chromosomes IV, V, IX, XI et XII (Gebhardt and Valkonen 2001). La présence de familles de gènes de résistance, fortement apparentés et organisés en tandems, explique la répartition biaisées de ces gènes (Hamalainen et al. 1998, Paal et al. 2004, Song et al. 2003, Van der Vossen et al. 2000).

Certains clusters de gènes de résistance comprennent des gènes impliqués dans la résistance à un même bioagresseur ou à une même famille de bioagresseurs chez plusieurs espèces de Solanacées. C'est le cas du chromosome situé sur le bras court du chromosome IV de la pomme de terre où ont été cartographiés plusieurs QTL de résistance à *P. infestans* (Leonards-Schippers et al. 1994, Oberhagemann et al. 1999). En position synténique chez le piment, ont été cartographiés plusieurs QTL de résistance à *P. capsici* (Thabuis et al. 2003). Le gène récessif de résistance *pot-1* a été cartographié sur le bras court du chromosome T3 de la tomate, en position synténique avec le gène *pvr2* du piment (Parrella et al. 2002). Ces 2 gènes codent pour la même fonction et confèrent la résistance au PVY (Ruffel et al. 2002).

La localisation des gènes et QTL de résistance sur le génome de la pomme de terre ou en position synténique chez la tomate et le piment est représenté sur la figure 1.5.

1.6 Structure des gènes de résistance aux nématodes clonés à ce jour

A ce jour, 5 gènes de résistance aux nématodes ont été clonés : *HsI^{pro-1}* chez la betterave (Cai et al. 1997), *Mi-1* (Milligan et al. 1998) et *Hero* (Ernst et al. 2002) chez la tomate, et *Gpa2* (Van der Vossen et al. 2000) et *Gro1* (Paal et al. 2004) chez la pomme de terre.

Mi-1 confère la résistance à trois espèces de nématodes à galles (*M. incognita*, *M. javanica*, et *M. arenaria*), à une espèce de puceron *Macrosiphum euphorbiae* (Rossi et al. 1998, Vos et al. 1998), et une espèce d'aleurode *Bemisia tabaci* (Nombela et al. 2003). *HsI^{pro-1}* confère la résistance à *Heterodera schachtii*. *Hero* confère la résistance à tous les pathotypes de *G. rostochiensis*, alors que *Gro1* confère la résistance uniquement au pathotypes Ro1 de cette espèce. *Gpa2* confère la résistance à quelques populations du pathotype Pa2/3 de *G. pallida*.

Gpa2, *Gro1*, *Hero* et *Mi-1* codent des protéines de type NBS-LRR (Jones 2001), possédant un domaine d'accrochage de nucléotides (Nucleotide Binding Site, NBS), et un domaine riche en répétitions de leucines (Leucine-Rich Repeats, LRR). Les protéines *Gpa2*, *Hero* et *Mi-1* présentent également un domaine coiled coil (CC) dans leur partie N-terminale. Ces trois gènes appartiennent donc à la famille de gènes de résistance CC-NBS-LRR. La partie N-terminale de la protéine codée par *Gro1* présente une homologie avec les récepteurs Toll de la drosophile et Interleukin-1 de l'homme, classant le gène *Gro1* dans la famille de gènes de résistance TIR-NBS-LRR.

HsI^{pro-1} code pour une protéine composée d'un domaine LRR extracellulaire, d'un domaine transmembranaire, et d'un court domaine cytoplasmique en position C-terminal.

Le produit des gènes de type NBS-LRR est supposé avoir une localisation cytoplasmique (Dangl and Jones 2001, Jones 2001), bien qu'il ait été démontré qu'une protéine de cette famille était associée à la membrane plasmique (Boyes et al. 1998). Cela implique que le produit du gène d'aviorulence du nématode doit pénétrer dans le cytoplasme de la cellule (Nimchuk et al. 2001).

Le domaine NBS est impliqué dans la transduction du signal. Ainsi, il a été démontré que les domaines NBS des gènes *Mi-1* et *I-2* de la tomate étaient capables de se lier et de dégrader l'ATP, apportant de nouveaux arguments à l'hypothèse de l'implication du domaine NBS dans la transduction du signal (Tameling et al. 2002).

Le domaine LRR est impliqué dans la spécificité de reconnaissance du pathogène. Cette spécificité peut également être conférée par le domaine TIR (Ellis et al. 1999). L'interaction

directe entre le domaine LRR du gène de résistance *Pita* du riz et le produit du gène d'avirulence de *Magnaporthe grisea* (*Avr-Pita*) sur un modèle récepteur-ligand a été démontrée (Jia et al. 2000).

Néanmoins, dans la plupart des cas, une telle interaction directe entre gène de résistance et gène d'avirulence n'a pu être mise en évidence. De plus, des gènes de résistance très similaires, voire le même gène, peuvent conférer la résistance à des bioagresseurs très différents, n'ayant probablement pas les mêmes gènes d'avirulence : nématode et virus dans le cas des gènes *Gpa2* et *Rx* (Van der Vossen et al. 2000), et nématode et insectes dans le cas du gène *Mi-1* (Rossi et al. 1998, Vos et al. 1998). Il a également été montré dans plusieurs cas que le produit du gène de résistance formait un complexe avec d'autres protéines de l'hôte en l'absence de pathogènes (Shirasu and Schulze-Lefert 2003). Un nouveau modèle a donc été proposé dans lequel le gène de résistance est perçu comme un gardien d'une cible d'un ou plusieurs bioagresseurs (guard hypothesis) : quand le produit du gène d'avirulence vient modifier la conformation d'une protéine ou d'un complexe protéique, le gène de résistance reconnaît cette modification et déclenche une cascade de réactions de défenses (Dangl and Jones 2001, van der Biezen and Jones 1998).

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

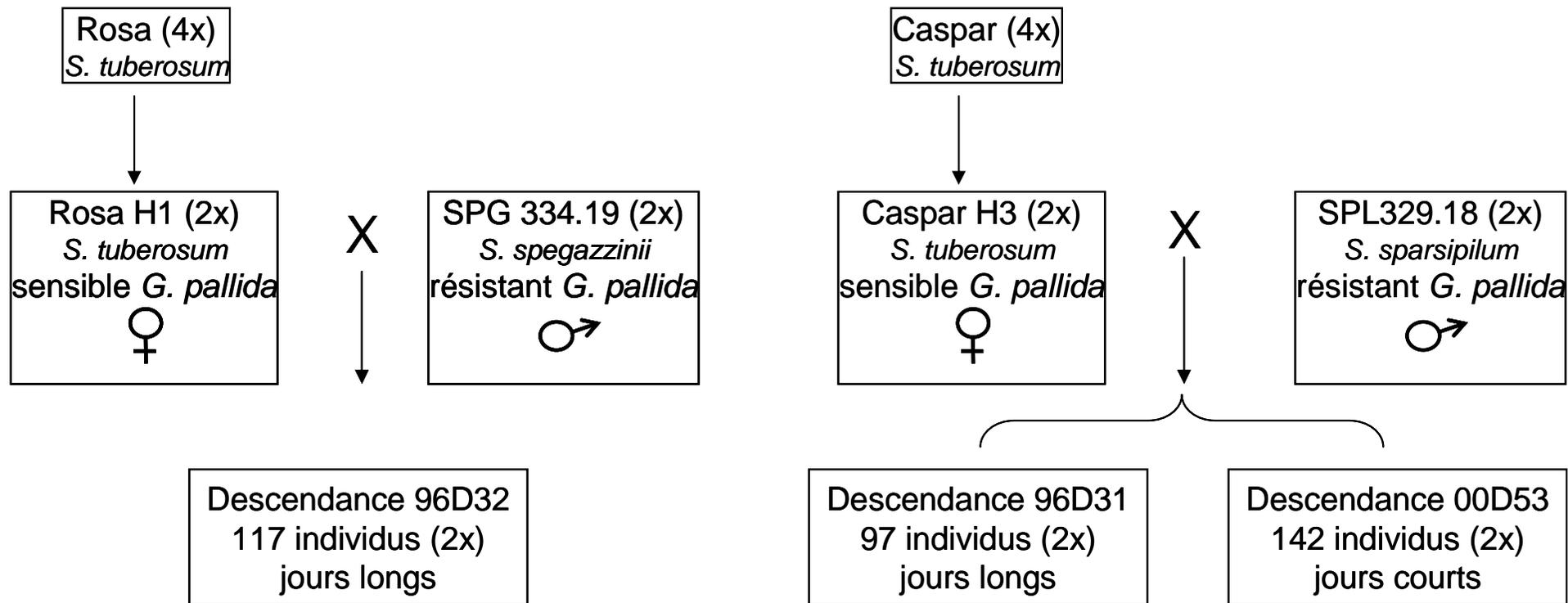


Figure 2.1 : Matériel végétal utilisé pour la recherche de QTL. Les clones dihaploïdes de *S. tuberosum* ont été extraits des variétés tétraploïdes par parthénogenèse *in situ*.

2 Matériel et Méthodes

2.1 Matériel végétal

Deux descendance interspécifiques ont été étudiées pour cartographier des facteurs génétiques impliqués dans la résistance à *Globodera pallida* (figure 2.1).

La descendance 96D32 est issue du croisement entre Rosa H1, clone dihaploïde de *S. tuberosum* sensible à *G. pallida*, et spg88S.334.19 (appelé spg334.19 dans la suite de ce manuscrit), clone de l'espèce sauvage *S. spgazzinii* résistant à *G. pallida*. Les 299 graines obtenues à la suite de ce croisement correspondent chacune à un individu différent et hétérozygote. Elles ont été semées au printemps 1996 à l'INRA de Ploudaniel, et 127 d'entre elles ont donné au moins un tubercule génétiquement identique à la graine de départ. Ils ont été identifiés par un numéro de 1 à 127. Tous les tubercules fils issus des multiplications annuelles porteront toujours ce même numéro. Sept génotypes ont été perdus au cours des deux années suivantes de multiplication. Trois autres ont été éliminés des analyses car ils se sont révélés être triploïdes. Les analyses QTL ont été réalisées sur 117 génotypes.

La deuxième descendance est issue du croisement entre Caspar H3, clone dihaploïde de *S. tuberosum* sensible à *G. pallida*, et spl88S.329.18 (appelé spl329.18 dans la suite de ce manuscrit), clone de l'espèce sauvage *S. sparsipilum* résistant à *G. pallida*. Cette descendance a été obtenue lors de deux séries de croisements. Trois cent graines de la première série ont été semées au printemps 1996 à l'INRA de Ploudaniel, et 116 d'entre elles ont donné au moins un tubercule. Cette série, appelée 96D31, a toujours été multipliée en photopériode de jours longs. Dix neuf génotypes ont été perdus au cours des multiplications, et le test de résistance a été réalisé sur 97 génotypes. Trois cents graines de la seconde série ont été semées à l'automne 2000, et 144 d'entre elles ont donné au moins un tubercule. Cette série, appelée 00D53, a toujours été multipliée en photopériode de jours courts. Un individu triploïde a été éliminé, et un autre n'a pas été phénotypé par manque de tubercule. Le test de résistance et les analyses QTL ont été réalisés sur 142 génotypes.

2.2 Populations de *G. pallida*

Huit populations de *G. pallida* ont été utilisées. Les populations Lufness, Duddingston, et G. East Craigh ont été collectées en Grande-Bretagne. Les populations Audierne et Perpignan ont été collectées en France. La population Chavornay a été collectée en Suisse. La population Rookmaker a été collectée aux Pays-Bas. Enfin, la population Pukekoé a été collectée en Nouvelle-Zélande.

La population Duddingston appartient au pathotype Pa1 de *G. pallida*, car elle ne se développe pas sur les clones de pomme de terre possédant le gène *H2* de *S. multidissectum* (Mugniéry et al. 1989). Les sept autres populations appartiennent au pathotype Pa2/3.

La population Chavornay est la plus agressive sur les clones de pomme de terre possédant des facteurs de résistance originaires de *S. vernei*. *S. vernei* étant l'espèce de *Solanum* apparentée à la pomme de terre la plus utilisée dans les programmes de sélection, la population Chavornay a été choisie comme population de référence dans les tests réalisés par le CTPS pour l'inscription des variétés de pomme de terre au catalogue. Nous l'avons également choisie pour la réalisation des tests de résistance à partir desquels a été effectuée la détection des QTL.

2.3 Tests de résistance à *Globodera pallida*

2.3.1 Pour la cartographie de QTL et la mesure du niveau d'agressivité des huit populations de *G. pallida*

Le test de résistance à *G. pallida* permet de mesurer le nombre de kystes néoformés sur une plante de pomme de terre après un cycle complet du nématode. Il a été réalisé sur 4 plantes (4 répétitions) de chaque génotype avec des kystes de la population Chavornay.

Les tubercules sont plantés individuellement dans un pot contenant 400 grammes d'un mélange de terreau et de terre franche, auxquels sont ajoutés 10 kystes de *G. pallida*. Ce nombre de kystes est suffisant pour obtenir, après éclosion, 5 à 10 larves de nématode par gramme de sol. Les plantes sont cultivées en serre. Un cycle complet de culture est effectué afin de laisser le temps aux nématodes de se développer et de s'enkyster. Au bout de quatre mois de culture, le contenu de chaque pot est lavé et tamisé afin de permettre le comptage des kystes néoformés.

Les nématodes à kyste étant classés comme parasites de quarantaine, leur manipulation ne peut s'effectuer que dans une station agréée par les services du Ministère de l'Agriculture ; c'est pourquoi les tests de résistance à *G. pallida* ont été réalisés à l'UMR BiO3P du Rheu (Ille et Vilaine) par Didier Mugniéry et son équipe.

2.3.2 Pour l'analyse de l'effet des QTL sur le développement de *G. pallida*

Quatre clones de la série 96D31 et 8 clones de la descendance 96D32 ont été choisis en fonction de leurs allèles aux différents QTL. Dix tubercules par clone ont été mis à pousser en boîte de Pétri sur de l'eau gélosée avec 2 % d'agar (Mugniéry and Person 1976). Une à trois racines par tubercule ont été inoculées avec 10 juvéniles J2 de *G. pallida*, population Chavornay. Un total de 20 racines inoculées par clone a été observé à la loupe binoculaire (grossissement 40 X), 15 jours après inoculation (Mugniéry et al. 2001). Pour chaque nématode retrouvé, le stade de développement a été noté selon la classification suivante : juvénile aux stades larvaires J2 ou J3, mâle ou femelle. La présence ou l'absence de nécrose autour du nématode a été notée. Les nématodes non retrouvés ont été considérés comme n'ayant pas pénétrés et notés "données manquantes".

2.4 Mesure du poids sec de racines

Trois tubercules de chaque clone de la descendance 96D32 ont été plantés dans 3 pots remplis de sable. Les trois tubercules ont été répartis en trois blocks randomisés et cultivés en serre. Les plantes ont été arrosées deux fois par semaine avec un engrais soluble N P K Mg (18-6-26-3) à une concentration de 768 ppm. Au bout de deux mois de culture, les racines ont été lavées, essuyées et déposées dans des boîtes métalliques numérotées et préalablement pesées. Elles ont ensuite été séchées à l'étuve sous vide à 80°C pendant 6 heures. A la fin du séchage, le couvercle de chaque boîte a immédiatement été remis en place afin d'éviter une réhydratation des racines. Les boîtes contenant les racines ont ensuite été pesées et le poids de racines de chaque échantillon a été déduit.

2.5 Extraction de l'ADN génomique

Pour la descendance issue du croisement entre Rosa H1 et spg334.19 (96D32), l'extraction d'ADN a été réalisée à partir de dix grammes de feuilles fraîches, prélevées sur des plantes cultivées en serre et âgées de deux mois environ. La méthode d'extraction employée a été adaptée de Bernatzky and Tanksley (1986) et de Lefebvre et al. (1993). Cette méthode permet

Tableau 2.1 : Combinaisons AFLP analysées dans les différentes descendance de pomme de terre. Le symbole X indique les combinaisons d'amorces AFLP utilisées dans des différentes descendance (96D32 : Rosa H1 x spg334.19 ; 96D31 et 00D53 : Caspar H3 x spl329.18)

Nom Keygene	Enzymes + bases sélectives	96D32	96D31	00D53
E32M48	EcoRI AAC / MseI CAC	X	X	
E32M49	EcoRI AAC / MseI CAG	X	X	
E32M51	EcoRI AAC / MseI CCA	X	X	
E32M61	EcoRI AAC / MseI CTG	X	X	
E35M48	EcoRI ACA / MseI CAC	X	X	
E35M49	EcoRI ACA / MseI CAG	X	X	
E35M54	EcoRI ACA / MseI CCT	X	X	
E35M58	EcoRI ACA / MseI CGT	X	X	X
E35M61	EcoRI ACA / MseI CTG	X	X	
E45M60	EcoRI ATG / MseI CTC	X	X	X
C33M47	SacI AAG / MseI CAA	X	X	
C33M49	SacI AAG / MseI CAG	X	X	X
C33M50	SacI AAG / MseI CAT	X	X	X
C35M50	SacI ACA / MseI CAT	X	X	
C35M48	SacI ACA / MseI CAC	X		
C35M60	SacI ACA / MseI CTC	X		
C35M61	SacI ACA / MseI CTG	X		
C39M62	SacI AGA / MseI CTT	X		
C43M47	SacI ATA / MseI CAA	X	X	X
C43M50	SacI ATA / MseI CAT	X	X	
C43M62	SacI ATA / MseI CTT	X	X	X
C44M47	SacI ATC / MseI CAA	X	X	
C44M51	SacI ATC / MseI CCA	X	X	
C45M59	SacI ATG / MseI CTA	X	X	

Tableau 2.2 : Marqueurs microsatellites analysés dans les différentes descendance de pomme de terre. Le symbole X indique la descendance dans laquelle a été cartographié le marqueur microsatellite. Marqueurs Stm : Milbourne et al. (1998). Marqueurs SSR : site SGN (<http://www.sgn.cornell.edu/>).

(96D32 : Rosa H1 x spg334.19 ; 96D31 : Caspar H3 x spl329.18)

Code du marqueur INRA Avignon	Non du marqueur dans les publications ou les bases de données		
		96D31	96D32
MS032	Stm0013	X	
MS034	Stm0028	X	
MS036	Stm0038		X
MS041	Stm1020	X	
MS057	SSR19	X	
MS058	SSR4	X	
MS066	Stm0003	X	

d'obtenir les quelques centaines de microgrammes d'ADN nécessaires aux analyses RFLP. Pour la descendance issue du croisement entre Caspar H3 et spl329.18 (96D31 et 00D53), une méthode d'extraction en microtubes Eppendorf à partir de 100 mg de feuilles fraîches a été employée (Fulton et al. 1995). L'ADN a ensuite été dosé visuellement sur gel d'agarose, après hydrolyse par une endonucléase de restriction, par rapport à une gamme d'ADN de concentration connue.

2.6 Marqueurs moléculaires

Les combinaisons d'amorces AFLP utilisées pour la construction des cartes génétique sont décrites dans le tableau 2.1. Elles ont été choisies car elles ont généré des marqueurs couvrant l'ensemble de la carte génétique à Ultra Haute Densité de marqueurs de la pomme de terre (Isidore et al. 2003 ; <http://potatodbase.dpw.wau.nl/UHDdata.html>). Les marqueurs AFLP ont été révélés suivant la méthode décrite par Vos et al. (1995) avec des modifications mineures : le tampon d'électrophorèse anodique employé était constitué de TBE 1X, NaAc 0,5M, les enzymes de restriction utilisées était *SacI* et *EcoRI* comme enzymes à site de coupure rare, et *MseI* comme enzyme à site de coupure fréquent. Seul les marqueurs hétérozygotes présent chez un seul parent (ségrégation attendue 1:1) ont été pris en considération. Ils ont été identifiés par le nom de la combinaison, et un numéro d'ordre ou la taille du fragment amplifié pour les marqueurs des chromosomes V et XI de spl329.18. Les marqueurs ont été lus visuellement et indépendamment par deux personnes.

Les marqueurs microsatellites utilisés proviennent de deux sources (tableau 2.2). Les marqueurs dont le nom commence par le préfixe *Stm* ont été publiés par Milbourne et al. (1997, 1998). Ils ont été révélés conformément à la méthode décrite dans ces publications. Les marqueurs dont le nom commence par le préfixe *SSR* ont été extraits du site de la SGN. Ils ont été révélés selon la méthode décrite par Milbourne et al. (1997) avec une température d'hybridation des amorces de 50°C.

Des sondes d'ADN de plusieurs espèces ont été utilisées pour révéler les marqueurs RFLP. Les noms des sondes d'ADN de tomate commencent par des préfixes *CD*, *CT*, *T*, et *TG* indiquant le nom de la banque de sondes. Les préfixes sont suivis par un numéro d'ordre dans la banque. Les sondes *TG* sont des sondes d'ADN génomique et les sondes *CD* et *CT* sont des sondes d'ADN complémentaire (Tanksley et al. 1992). Les sondes *T* sont des marqueurs *COS*, *ADNc* simple copie ayant un ou deux homologues chez *A. thaliana* (Fulton et al. 2002). Les

Tableau 2.3 : Amorces et adaptateurs utilisés pour cartographier les homologues des gènes *Gpa2*, *Rx*, et *Rx2*.

Gpa2_Rx_Rx2_F	5' -TGTGAATGTTATCAGAGGAAAGAGTGATCAAAA-3'
Gpa2_Rx_Rx2_R	5' -CATTATAGCAAGAATGAGCATGCAGGTATAAGAA-3'
Amorce TaqI	5' -GATGAGTCCTGAGCGA-3'
AdaptateurTaqI	5' -GACGATGAGTCCTGAG-3' 3' -TACTCAGGACTCGC-5'

sondes ayant pour préfixe GP ou CP sont des sondes de pomme de terre (Gebhardt et al. 1991). Les sondes GP sont des sondes d'ADN génomique et les sondes CP sont des sondes d'ADN complémentaire. La sonde PC8 est un ADNc de piment et la sonde GC015 est un gène de chitinase de tabac. La sonde homologue du gène *Rx* (homRx) a été obtenue par PCR en utilisant les amorces 77L publiées par Kanyuka et al. (1999) pour amplifier l'ADN génomique de SPG. Les sondes ayant pour préfixe AIF et AUD, correspondent à des bandes AFLP amplifiées chez *S. sparsipilum* et cartographiées par RFLP sur les cartes de Rosa H1 ou spg334.19.

Les conditions d'utilisation des marqueurs RFLP, CAPS et SCAR sont décrites dans les articles.

Les homologues des gènes *Gpa2/Rx/Rx2* ont été révélés suivant une méthode adaptée de Bakker et al. (2003). Des amorces différentes de celles décrites par Bakker et al. (2003) ont été définies pour amplifier simultanément les homologues des 3 gènes de résistance. Leurs séquences sont données dans le tableau 2.3. Après une étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min, 35 cycles PCR ont été réalisés (94°C, 30 sec ; 57°C, 45 sec ; 72°C, 1 min 30), suivis par une étape finale d'élongation de 10 min à 72°C. Un microlitre d'amplifiat a été digéré avec 5 unités de l'enzyme de restriction *TaqI*, et 50 picomoles d'adaptateur complémentaire au site de restriction (tableau 2.3) ont été ligués aux fragments digérés. Les fragments digérés-ligués ont été dilués 80 fois et cinq microlitres de cette dilution a servi de cible à une nouvelle amplification. Cette nouvelle amplification et la séparation sur gel d'acrylamide dénaturant ont été réalisées selon le protocole décrit par Bakker et al. (2003) en utilisant l'amorce *Gpa2_Rx_Rx2_R* marquée en 5' au γ -³³P-ATP, et l'amorce *TaqI+0* (tableau 2.3) complémentaire de l'adaptateur *TaqI*. Les marqueurs ont été codés en présence *versus* absence.

2.7 Méthodes d'analyses statistiques

2.7.1 Analyses descriptives des tests de résistances à *G. pallida*

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel R version 1.7.7 (Ihaka and Gentleman 1996).

Pour la descendance issue du croisement entre Caspar H3 et spl329.18, les clones des séries 96D31 et 00D53 ont été testés indépendamment. Trois clones témoins (Caspar H3,

96D31.137, et 96D31.143) ont été répétés dans les 2 tests. Les nombres moyens de kystes des clones des deux séries ont été ajustés en utilisant les paramètres de la régression linéaire, calculés avec les données de ces trois clones.

Afin de rapprocher les données brutes de la normalité (Roupe van der Voort *et al.*, 1997b), la variable "nombre de kystes par plante" a été transformée par la formule : $\log_{10}nb = \log_{10}(\text{nombre de kystes} + 1)$. Une analyse de variance a été effectuée sur les données transformées du test de résistance, afin de déterminer si les résultats obtenus étaient essentiellement dus au potentiel génétique des individus ou à d'autres facteurs. L'analyse a été réalisée selon le modèle suivant : $\log_{10}nb_{ij} = \mu + C_i + \varepsilon_{ij}$, avec $\log_{10}nb_{ij}$ = valeur phénotypique de la plante j du clone i, μ = valeur moyenne de l'ensemble des plantes, C_i = effet du clone i, ε_{ij} = effet résiduel. La Normalité de la distribution des résidus a été testée (Shapiro and Wilk 1965).

L'héritabilité au sens large du caractère ($\log_{10}nb$) lors du test de résistance a été estimée avec la formule suivante : $h^2_b = \sigma^2g / (\sigma^2g + \sigma^2e/n)$, avec σ^2g = variance génétique, σ^2e = variance environnementale entre plantes d'un même génotype et n = nombre de plantes de chaque génotype.

2.7.2 Construction des cartes génétiques

La ségrégation attendue pour tous les marqueurs utilisés pour la cartographie était de type 1:1. L'égalité des fréquences des deux allèles a été testée par une statistique de χ^2 à un degré de liberté.

La construction des cartes génétiques a été faite séparément pour chacun des deux parents de chaque descendance en utilisant la stratégie de "double pseudo test-cross" (Grattapaglia and Sederoff 1994). Ces cartes génétiques ont été réalisées grâce au logiciel MAPMAKER/EXP V3.0 (Lander et al. 1987). Pour les cartes génétiques de Rosa H1 et spg334.19, les groupes de liaisons ont été construits (commande "group") avec un LOD minimal de 5 et une fraction maximale de recombinaison de 0,3 (Lefebvre et al. 1995). Pour les groupes comportant des marqueurs très biaisés ($p < 0,001$), la même commande a été exécutée une nouvelle fois avec un LOD de 10 afin de s'assurer de la fiabilité de la liaison. Les marqueurs très biaisés ($p < 0,001$) ne se liant à aucun groupe de liaison ont été éliminés des analyses. Pour les cartes génétiques de Caspar H3 et spl329.18, les groupes de liaisons ont été construits avec un LOD

minimal de 6. Les marqueurs de chaque groupe de liaisons ont ensuite été ordonnés grâce à des analyses multipoints (commande "compare") donnant les ordres les plus probables. Un ordre a été préféré à un autre lorsqu'il était 100 fois plus probable. Les taux de recombinaison ont été convertis en distances génétiques par la transformation de Kosambi (1944). Une carte trame de chaque parent a été construite à partir des marqueurs ayant le moins de données manquantes, espacés de 5 à 10 cM. Les nombres moyens de marqueurs par chromosome et les distances moyennes entre marqueurs, ainsi que les écart-types pour ces deux valeurs ont été calculées avec le module Rmap de QTL Cartographer, version 1.12 (Basten *et al.*, 1997). Les cartes trames des 2 parents d'une même descendance ont été intégrées en un seul fichier avant la recherche de QTL. Les cartes génétiques ont été dessinées grâce au logiciel MAP DISPLAY (Decou et Causse, communication personnelle).

2.7.3 Détection des QTL

Le logiciel QTL Cartographer, version 1.12 (Basten *et al.*, 1997) a été utilisé pour détecter des QTL. Les QTL ont été détectés par Interval Mapping (IM ; Lander and Botstein 1989) et Composite Interval Mapping (CIM ; Zeng 1993, 1994) en utilisant comme cofacteurs les marqueurs les plus explicatifs détectés par la régression multiple (Forward-Backward stepwise), et en utilisant une fenêtre de 10 cM autour de ces marqueurs. Les seuils de détection de QTL ont été choisis après 1000 permutations en prenant le LOD score correspondant à un risque α de 0,05. L'intervalle de confiance des QTL a été déterminé à partir de la courbe de LOD issue de l'analyse par IM. Les limites ont été choisies en considérant une décroissance de 1,5 unité de LOD à partir du maximum de la courbe.

La recherche d'effets d'épistasie a été réalisée par analyse de variance avec un modèle à deux facteurs et un terme d'interaction. Elle a été effectuée sur les marqueurs des cartes trames des parents de chaque descendance. Un seuil de signification de 10^{-4} a été choisi. Le modèle utilisé était le suivant : $Y_{ijk} = \mu + M_i + M_j + (M_i * M_j) + \varepsilon_{ijk}$, avec Y_{ijk} = valeur phénotypique du clone k pour les marqueurs M_i et M_j , μ = moyenne de la descendance, M_i et M_j = effet des marqueurs M_i et M_j , $(M_i * M_j)$ = effet de l'interaction entre les marqueurs M_i et M_j , ε_{ijk} = effet résiduel, comprenant la variation environnementale et la variation génétique due aux autres QTL. L'équiprobabilité des fréquences des 4 classes génotypiques a été testée par une statistique du χ^2 à 3 degrés de liberté.

L'effet cumulé des QTL a été estimé par analyse de variance. Pour les QTL à effet additif, nous avons pris en compte l'effet lié au marqueur le plus proche du pic de la courbe de LOD du QTL. Pour les QTL à effet épistatique, a été pris en compte l'effet de l'interaction des deux marqueurs impliqués.

2.7.4 Analyse de l'effet des QTL de résistance sur le cycle de développement de *G. pallida* et sur le niveau d'agressivité de huit populations

Le stade de développement des nématodes retrouvés dans les racines inoculées a été transformé en une variable semi-quantitative : les nématodes retrouvés aux stades J2/J3 ont été notés 1, les mâles ont été noté 2, et les femelles ont été notées 3. L'effet du clone sur le stade de développement a été déterminé par analyse de variance en utilisant cette variable semi-quantitative. Pour chaque stade de développement, les nombres de nématodes retrouvés dans les racines de chaque clone ont été comparés par un test χ^2 de Kullback mentionné dans Arbonnier (1966).

Le niveau d'agressivité de huit populations de *G. pallida*, sur des clones de pomme de terre possédant différentes combinaisons alléliques aux QTL de résistance, a été étudié par analyse de variance, après transformation du nombre de kystes par la fonction suivante : $\text{Logkyste} = \text{Log}_{10}(\text{nombre de kystes} + 1)$. L'effet de la combinaison allélique aux QTL, l'effet de la population de *G. pallida*, et les effets des interactions QTL-population, sur la variable "Logkyst" ont été estimés par analyse de variance à deux facteurs avec un terme d'interaction selon le modèle suivant :

$Y_{ijk} = \mu + Q_i + P_j + (Q_i * P_j) + \varepsilon_{ijk}$, avec Y_{ijk} = valeur phénotypique du clone k, μ = moyenne des clones testés, Q_i = effet de la combinaison allélique au QTL i, P_j = effet de la population j de *G. pallida*, $(Q_i * P_j)$ = effet de l'interaction entre la combinaison allélique au QTL i et la population j de *G. pallida*, ε_{ijk} = effet résiduel.

Deux ou trois clones ont été étudiés pour chaque combinaison allélique aux QTL originaires de spl329.18. L'effet du clone sachant le QTL a été estimé, pour l'ensemble des populations de *G. pallida*, par une analyse de variance à deux facteurs, dont un facteur conditionnel : $Y_{ijk} = \mu + Q_i + C_j/Q_i + \varepsilon_{ijk}$, avec Y_{ijk} = valeur phénotypique du clone k, μ = moyenne des clones testés, Q_i = effet de la combinaison allélique au QTL i, C_j/Q_i = effet du clone j sachant

l'effet du QTL i , ε_{ijk} = effet résiduel. Un seul clone par combinaison allélique a été étudié pour les QTL originaires de Rosa H1 et spg334.19, et les effets clone et QTL sont confondus.

Pour chaque combinaison allélique aux QTL, les niveaux d'agressivité des populations ont été comparés par un test de comparaison de moyennes multiple de Tukey, avec un risque α de 0,05.

Chapitre 3

Les cartes génétiques

3 Les cartes génétiques

3.1 Introduction

Afin de localiser les locus impliqués dans la résistance au nématode à kyste *G. pallida*, des cartes génétiques des parents de deux descendances interspécifiques de pomme de terre ont été construites. Dans les articles présentés dans ce manuscrit, seuls les chromosomes portant les QTL de résistance sont décrits. C'est pourquoi ce chapitre se propose de donner une vue plus détaillée de l'ensemble des cartes génétiques construites.

Les cartes génétiques de pomme de terre, présentées dans ce chapitre, sont orientées dans le même sens que les cartes des autres espèces de la famille des Solanacées, pour des raisons de comparaison avec les cartes de ces espèces (site WEB SGN : <http://www.sgn.cornell.edu/>). Dans l'article sur le déterminisme de la résistance à *G. pallida* originaire de *S. sparsipilum* (Chapitre 4), le chromosome XI de spl329.18 est inversé par rapport à l'orientation qu'il a dans ce chapitre, conformément aux études de cytogénétiques les plus récentes (Dong et al. 2000).

3.2 Résultats

3.2.1 Cartes génétiques de Rosa H1 et spg334.19

Les cartes génétiques de Rosa H1 et de spg334.19 ont été principalement construites avec des marqueurs RFLP et AFLP. La recherche de polymorphisme RFLP a été réalisée avec 395 sondes, constituées principalement d'ADN de tomate et cartographiées précédemment sur la carte génétique de référence de cette espèce (Tanksley et al. 1992). Ces 395 sondes ont été hybridées sur l'ADN génomique de Rosa H1 et spg334.19 digéré par cinq enzymes de restriction. Cent trois sondes RFLP, polymorphes entre les parents et hétérozygotes pour au moins un des deux parent, ont été hybridées sur l'ADN génomique des 117 individus de la descendance 96D32. Ces 103 sondes ont révélé 119 locus, dont 85 sur la carte de Rosa H1, et 68 sur la carte de spg334.19. Parmi ces locus, 34 sont communs aux cartes des 2 parents. Les marqueurs de 23 combinaisons d'amorces AFLP et un marqueur microsatellite ont ensuite été ajoutés. Au total, 506 et 269 marqueurs ont servi à la construction des cartes de Rosa H1 et de spg334.19 (tableau 3.1A). Une carte trame ("framework map" dans les articles) de chaque

A: Caractéristiques des cartes génétiques comprenant tous les marqueurs cartographiés

Parents	Nombre de locus RFLP	Nombre de marqueurs AFLP	Nombre de marqueurs micro-satellites	Nombre de marqueurs CAPS ou SCAR	Nombre de marqueurs total	Nombre de groupes de liaison	Nombre moyen de marqueurs par groupe de liaison (a)	Distance moyenne entre marqueurs (b)	Taille de la carte en cM
Rosa H1	85 (c)	420 (23 PC)	1	0	506	12	42 (18,9)	2,5 cM (3,7 cM)	1144,1
spg334.19	69 (d)	200 (23 PC)	0	0	269	12	22 (6,5)	3,4 cM (4,3 cM)	861,8
Caspar H3	0	359 (20 PC)	5	2	366	13	28 (13,0)	3,1 cM (5,5 cM)	1048,6
spl329.18	0	286 (20 PC)	4	3	293	12	24 (9,9)	3,4 cM (5,4 cM)	966,6

B: Caractéristiques des cartes trames

Parents	Nombre de marqueurs total	Nombre de groupes de liaison	Nombre moyen de marqueurs par groupe de liaison (a)	Distance moyenne entre marqueurs (b)	Taille de la carte en cM
Rosa H1	121	12	10 (1,8)	9,2 cM (4,8 cM)	939,2 cM
spg334.19	112	12	9 (0,9)	7,4 cM (4,8 cM)	675,9 cM
Caspar H3	115	13	8 (3,2)	9,6 cM (6,7 cM)	958,4 cM
spl329.18	106	12	8 (2,3)	9,5 cM (6,4 cM)	893,9 cM

(a) l'écart type pour le nombre de marqueurs par groupe de liaison est donné entre parenthèses

(b) la distance moyenne est donnée en cM Kosambi. L'écart type est donné entre parenthèses.

(c) dont 83 locus cartographiés sur la carte de la tomate (TGxxx, Txxx, CTxxx, CDxxx ; Fulton et al., 2002 ; Tanksley et al., 1992)

(d) dont 67 locus cartographiés sur la carte de la tomate (TGxxx, Txxx, CTxxx, CDxxx ; Fulton et al., 2002 ; Tanksley et al., 1992)

PC = Primer Combination ou combinaison d'amorces

Tableau 3.1 : Caractéristiques des cartes génétiques comprenant tous les marqueurs cartographiés (A) et des cartes trames (B) des parents des deux descendance (Rosa H1 x spg334.19) et (Caspar H3 x spl329.18).

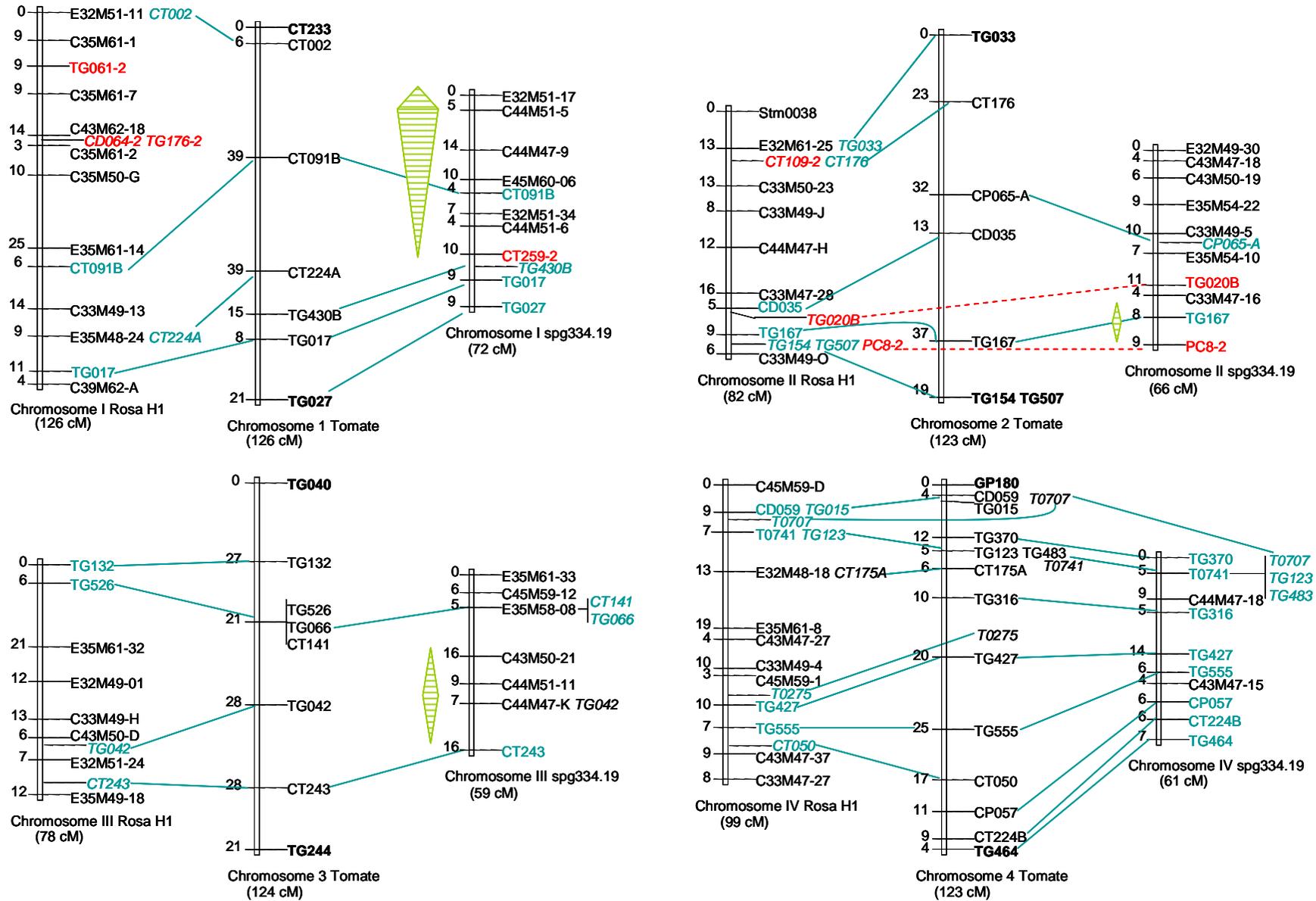


Figure 3.1 : Voir légende sur la page suivante

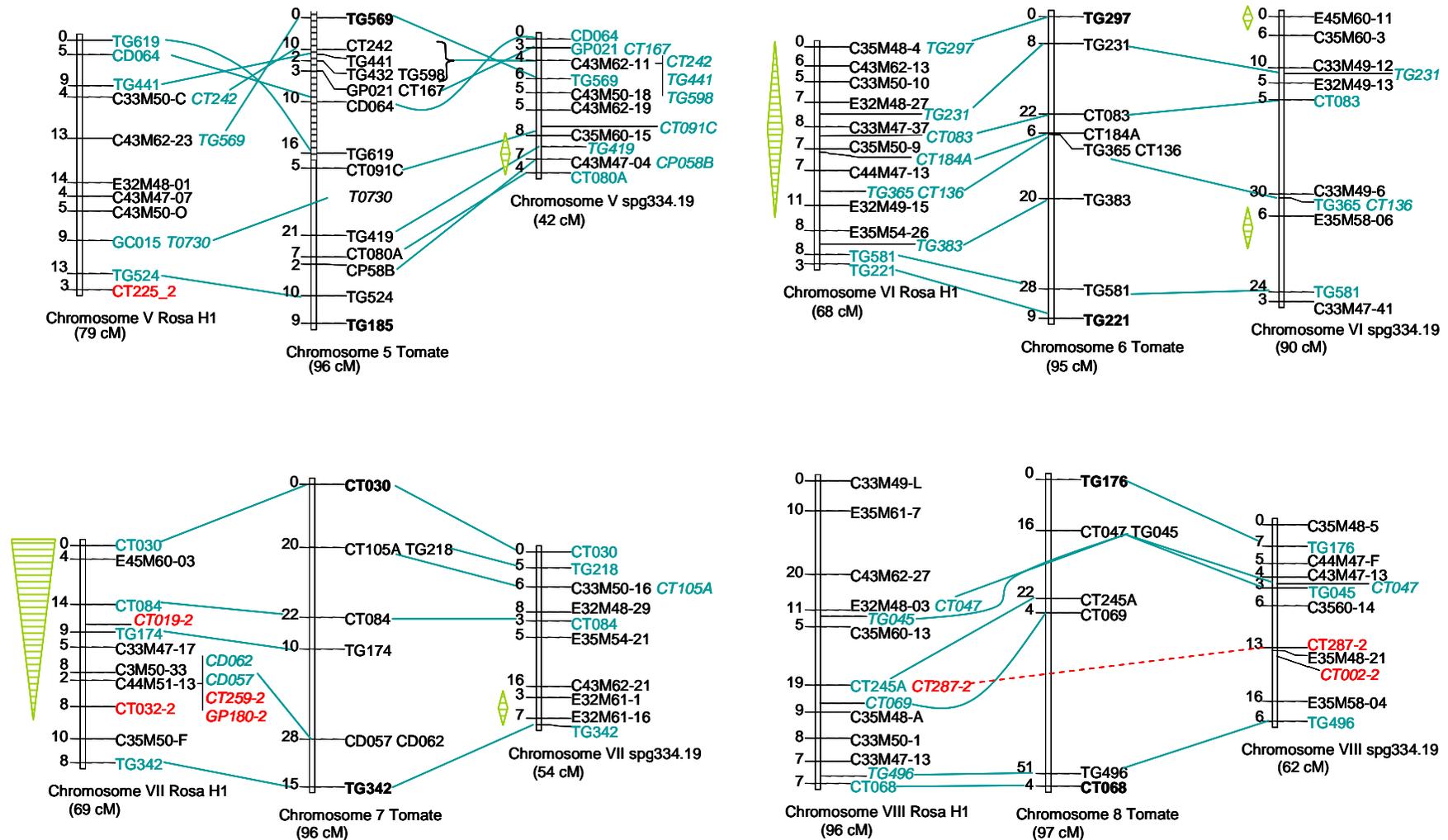


Figure 3.1 : Cartes génétiques trames de Rosa H1 et spg334.19 alignées avec la carte génétique de la tomate (Tanksley et al., 1992). Les distances génétiques entre marqueurs sont données en centimorgans Kosambi à gauche des chromosomes. Les marqueurs sont indiqués à droite des chromosomes. Les marqueurs AFLP sont en noir, les locus RFLP communs avec la tomate sont indiqués en bleu et reliés au chromosome de la tomate par un trait bleu. Les locus RFLP non cartographiés chez la tomate sont indiqués en rouge ; lorsqu'ils ont été cartographiés chez Rosa H1 et spg334.19, ils sont joints par un trait pointillé rouge. Les locus RFLP indiqués en italique ne font pas partie de la carte trame mais ont été ajoutés pour visualiser l'alignement avec la tomate. Les marqueurs homGpa2-Rx-Rx2 ont été amplifiés selon la méthode décrite par Bakker et al. (2003). Le marqueur Stm0038 est un marqueur microsatellite. Les losanges hachurés verts représentent les biais de ségrégation, la largeur maximale du losange étant située au niveau du marqueur le plus biaisé.

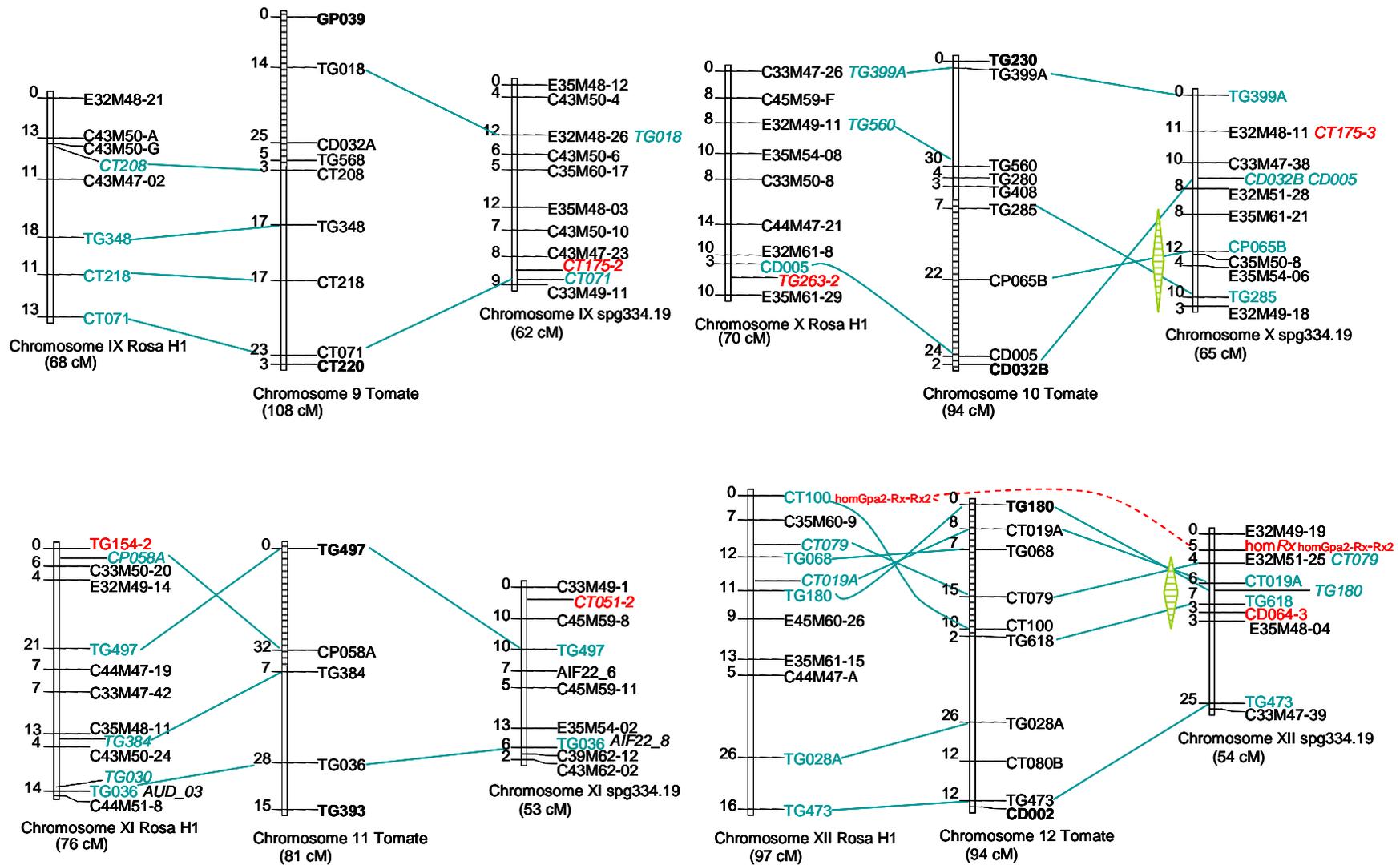


Figure 3.1 : fin.

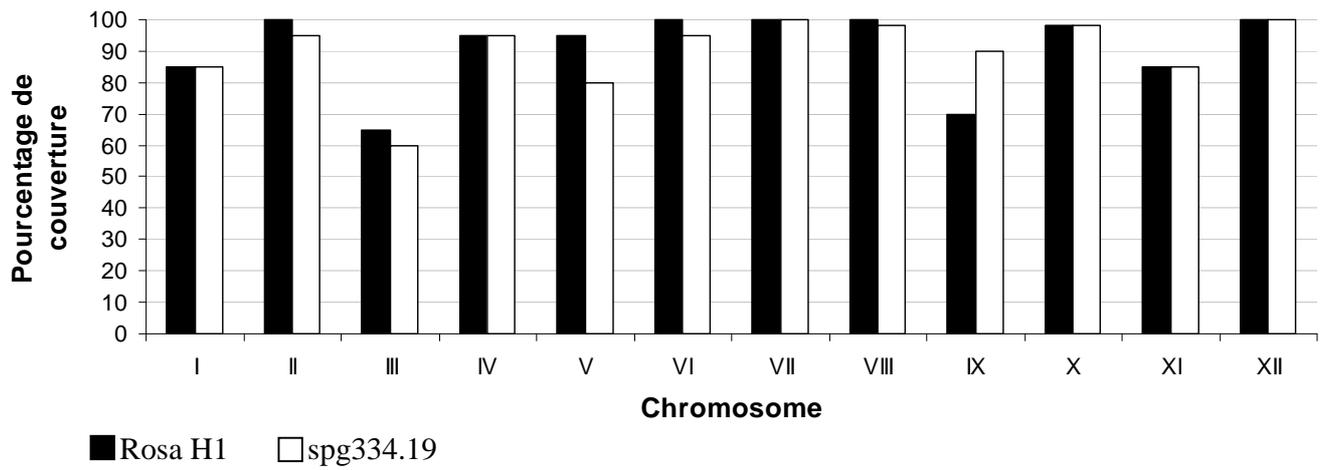


Figure 3.2 : Pourcentage du génome de la tomate couvert par les cartes génétiques de Rosa H1 et spg334.19.

parent a été construite à partir des marqueurs ayant le moins de données manquantes, espacés de 5 à 10 cM (tableau 3.1B, figure 3.1). Les marqueurs RFLP, cartographiés chez la tomate et chez la pomme de terre, ont permis d'assigner les 12 groupes de liaison de Rosa H1 et les 12 groupes de liaison de spg334.19 aux 12 chromosomes de la pomme de terre.

Les marqueurs RFLP obtenus à partir des sondes d'ADN de tomate permettent de comparer les génomes des deux espèces et d'estimer, chromosome par chromosome, le taux de couverture des cartes génétiques de Rosa H1 et de spg334.19 par rapport à la carte, considérée comme saturée, de la tomate (figures 3.1 et 3.2). Néanmoins, aucune sonde sub-télomérique n'a été cartographiée sur la carte de la tomate, et il n'est pas impossible que certaines zones chromosomiques situées près des télomères ne soient pas couvertes par la carte génétique publiée par Tanksley et al. (1992). Le taux de couverture des cartes de Rosa H1 et de spg334.19 est au moins égal à 80 % pour tous les chromosomes, excepté pour les chromosomes III de Rosa H1 (60 %) et de spg334.19 (65 %) et pour le chromosome IX de Rosa H1 (70 %). Bien que les deux cartes aient un taux de couverture du génome similaire, la carte de Rosa H1 (939,2 cM) a une taille globale supérieure de près de 40 % à la taille globale de spg334.19 (675,9). Ces différences de taille entre les cartes des deux parents sont plus ou moins marquées selon les chromosomes, voire même peuvent être inversées comme dans le cas du chromosome VI, plus grand chez spg334.19.

Vingt marqueurs, générés par des sondes RFLP utilisées également pour la construction de la carte génétique de la tomate (Tanksley et al. 1992), montrent des localisations différentes entre la carte de la tomate et nos cartes de pomme de terre. Dans 19 cas, les sondes en question appartiennent à des familles oligo- ou multigéniques et s'hybrident au niveau de plusieurs locus chez ces deux espèces. Dans ce cas, certains locus peuvent être cartographiés chez une espèce et pas chez l'autre par manque de polymorphisme. Seule la sonde CT109 présente un profil monocopie chez la tomate et chez la pomme de terre. La localisation non conforme du locus révélé par cette sonde peut être due à un mélange de tubes lors des échanges de sondes entre laboratoires.

Les marqueurs cartographiés sur le haut des chromosomes VI et VII de Rosa H1 présentent un biais par rapport à l'hypothèse d'une ségrégation 1 : 1 au seuil de 1 % (figure 3.1). Les biais sont particulièrement importants en haut du chromosome VII au niveau du marqueur CT030 ($\chi^2 = 100,83$; $p < 10^{-4}$; 115 individus d'une classe allélique contre 5 individus de l'autre classe). Huit zones génomiques présentent des marqueurs biaisés au seuil de 1 % sur la carte

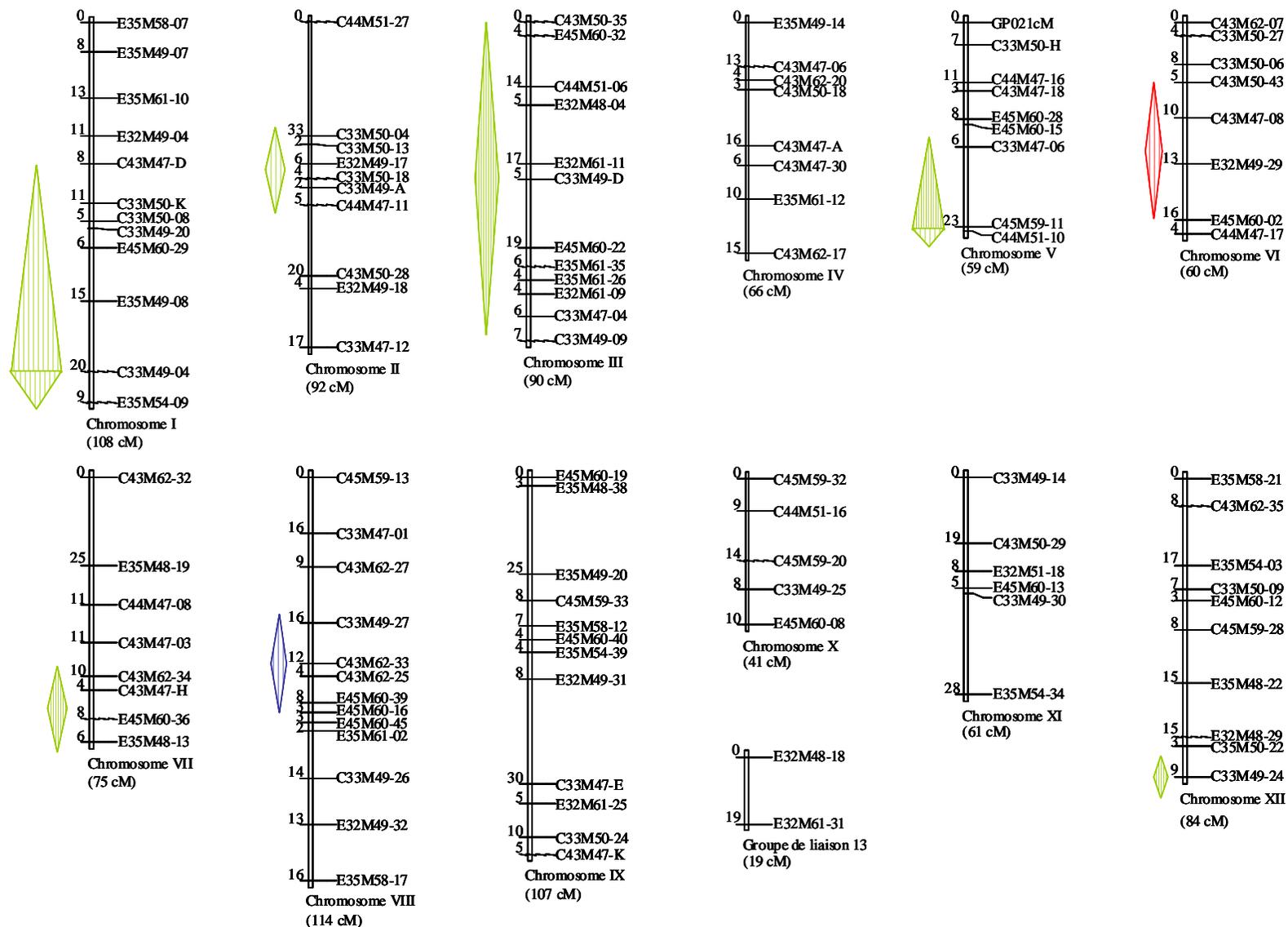


Figure 3.3 : Carte génétique trame de Caspar H3. Les distances génétiques entre marqueurs sont données en centimorgans Kosambi à gauche des chromosomes. Les marqueurs sont indiqués à droite des chromosomes. Les marqueurs AFLP sont identifiés par le nom de la combinaison d'amorce, suivi d'un numéro d'ordre. Les losanges hachurés représentent les biais de ségrégation, la largeur maximale du losange étant située au niveau du marqueur le plus biaisé : en rouge dans la série 96D31, en bleu dans la série 00D53, en vert dans les deux séries.

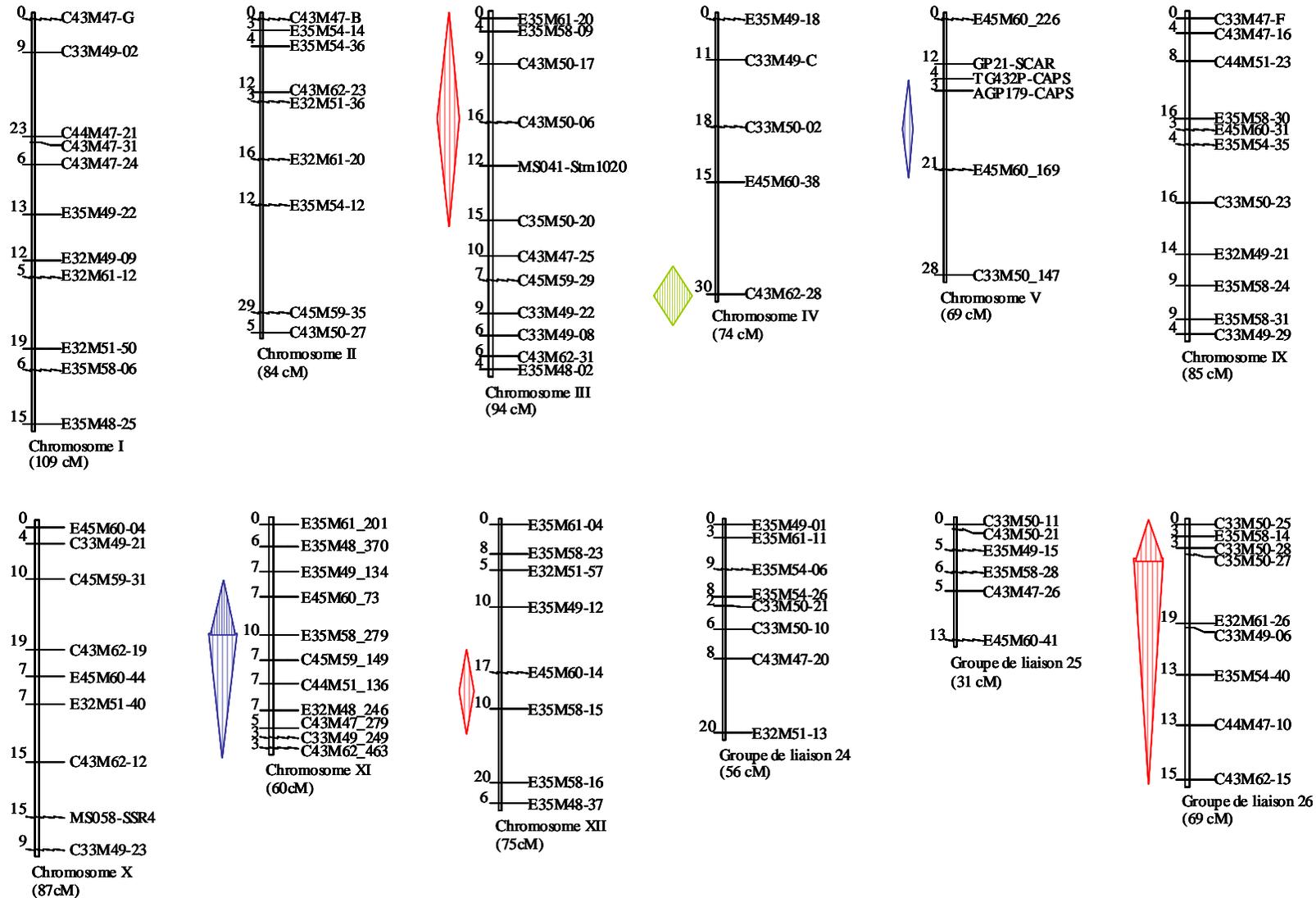


Figure 3.4 : Carte génétique trame de *spl329.18*. Les distances génétiques entre marqueurs sont données en centimorgans Kosambi à gauche des chromosomes. Les marqueurs sont indiqués à droite des chromosomes. Les marqueurs AFLP sont identifiés par le nom de la combinaison d'amorce, suivi d'un numéro d'ordre, excepté pour ceux des chromosomes V et XI pour lesquels le poids moléculaire est indiqué. Le nom des marqueurs microsatellites commence par le préfixe MS. Les losanges hachurés représentent les biais de ségrégation, la largeur maximale du losange étant située au niveau du marqueur le plus biaisé : en rouge dans la série 96D31, en bleu dans la série 00D53, en vert dans les deux séries.

de spg334.19. Il s'agit du chromosome I, du bas du chromosome II, du bas du chromosome III, du bas du chromosome V, du chromosome VI, du bas du chromosome VII, du bas du chromosome X, et du haut du chromosome XII. Les biais sont particulièrement important en haut du chromosome I au niveau du marqueur C44M51_5 ($\chi^2 = 98,19$; $p < 10^{-4}$; 115 individus d'une classe allélique contre 6 individus de l'autre classe).

3.2.2 Cartes génétiques de Caspar H3 et de spl329.18

Les cartes génétiques de Caspar H3 et de spl329.18 ont été construites en deux temps. Une première carte a été réalisée à partir des 97 individus de la série 96D31 avec les marqueurs de 20 combinaisons AFLP (tableau 2.1, chapitre 2), cinq marqueurs microsatellites (tableau 2.2, chapitre 2), trois marqueurs CAPS et un marqueur SCAR. Après cartographie, six combinaisons AFLP (tableau 2.1, chapitre 2) générant des marqueurs régulièrement répartis sur la carte de spl329.19, et deux marqueurs CAPS et un marqueur SCAR localisés sur le chromosome V, ont été utilisés pour génotyper les 142 individus de la série 00D53, issue du même croisement que la série 96D31. Les données de marquage des deux séries ont été fusionnées. Une carte trame de chaque parent a été construite à partir des marqueurs ayant le moins de données manquantes, espacés de 5 à 10 cM (tableau 3.1B, figure 3.3 et 3.4). Les marqueurs AFLP communs avec la carte UHD, les marqueurs, microsatellites, CAPS et SCAR, ont permis d'assigner aux chromosomes de la pomme de terre 12 des 13 groupes de liaisons de Caspar H3 (un groupe de liaison de 19 cM comprenant 2 marqueurs AFLP reste à lier à un des chromosomes) et les 9 des 12 groupes de liaisons de spl329.18 à des chromosomes. L'assignation des derniers groupes de liaisons de spl329.18 à des chromosomes va être réalisé avec des marqueurs microsatellites dont la localisation sur les chromosomes VI, VII, et VIII de la pomme de terre est connue.

Avec ses 13 groupes de liaison, la carte de Caspar H3 couvre une distance totale de 958,4 cM. Trois marqueurs AFLP sont non liés. La carte de spl329.18 couvre une distance totale de 893,9 cM. N'ayant pas de marqueurs RFLP communs avec la carte de la tomate et peu de marqueurs AFLP communs avec la carte UHD, la carte de Rosa H1 et la carte de spg334.19, il est difficile d'estimer le taux de couverture des cartes de Caspar H3 et de spl329.18. Toutefois, les 20 combinaisons d'amorces AFLP ont été choisies parce qu'elles généraient des marqueurs couvrant l'ensemble de la carte UHD, réalisées avec 400 combinaisons d'amorces. A l'exception des zones génomiques fortement homozygotes chez l'un ou l'autre des deux

parents, on peut considérer que le taux de couverture de ces cartes est globalement satisfaisant.

Huit chromosomes de Caspar H3 présentent un biais par rapport à l'hypothèse d'une ségrégation 1 : 1 au seuil de 1 % (figure 3.3). Il s'agit des chromosomes I, II, III, V, VI, VII, VIII et XII. Les biais de ségrégation sont généralement observés dans les deux séries de plantes issues du croisement entre Caspar H3 et spl329.18 : la série 96D31 conduite en photopériode de jours longs, et la série 00D53 conduite en photopériode de jours courts. Toutefois, les biais des marqueurs cartographiés sur le chromosome VI ne sont observés que dans la série 96D31 et les biais des marqueurs cartographiés sur le chromosome VIII ne sont observés que dans la série 00D53. Les biais les plus importants sont observés sur le chromosome I au niveau du marqueur C33M49_04 ($\chi^2 = 59,9$; $p < 10^{-4}$; 163 individus d'une classe allélique contre 50 individus de l'autre classe).

Six groupes de liaison de spl329.18 présentent un biais par rapport à l'hypothèse d'une ségrégation 1 : 1 au seuil de 1 % (figure 3.4). Il s'agit des chromosomes III, IV, V, XI, XII, et du groupe de liaison 26. Les biais des marqueurs cartographiés sur les chromosomes III, XII, et sur le groupe de liaison 26 ne sont observés que dans la série 96D31 et les biais des marqueurs cartographiés sur les chromosomes V et XI ne sont observés que dans la série 00D53. Les biais les plus importants sont observés sur le chromosome XI au niveau du marqueur E35M58_279 dans la série 00D53 ($\chi^2 = 83,85$; $p < 10^{-4}$; 120 individus d'une classe allélique contre 14 individus de l'autre classe dans cette série).

3.3 Discussion

3.3.1 Comparaison et utilisation des cartes génétiques comportant des marqueurs RFLP communs à plusieurs espèces

Des marqueurs de tomate localisés sur les cartes de la SGN et publiés par Tanksley et al. (1992) ont été utilisés pour comparer les génomes des différentes espèces de Solanacées (Doganlar et al. 2002, Lefebvre et al. 2002, Livingstone et al. 1999, Tanksley et al. 1992). Les cinq inversions de bras chromosomique précédemment décrites, entre les génomes de la pomme de terre et de la tomate, sur les chromosomes V, IX, X, XI, et XII (Tanksley et al. 1992 ; figure 1.1), sont également observées sur les cartes de Rosa H1 et de spg334.19, exceptés pour les chromosomes IX de Rosa H1 et de spg334.19, et pour le chromosome XI de

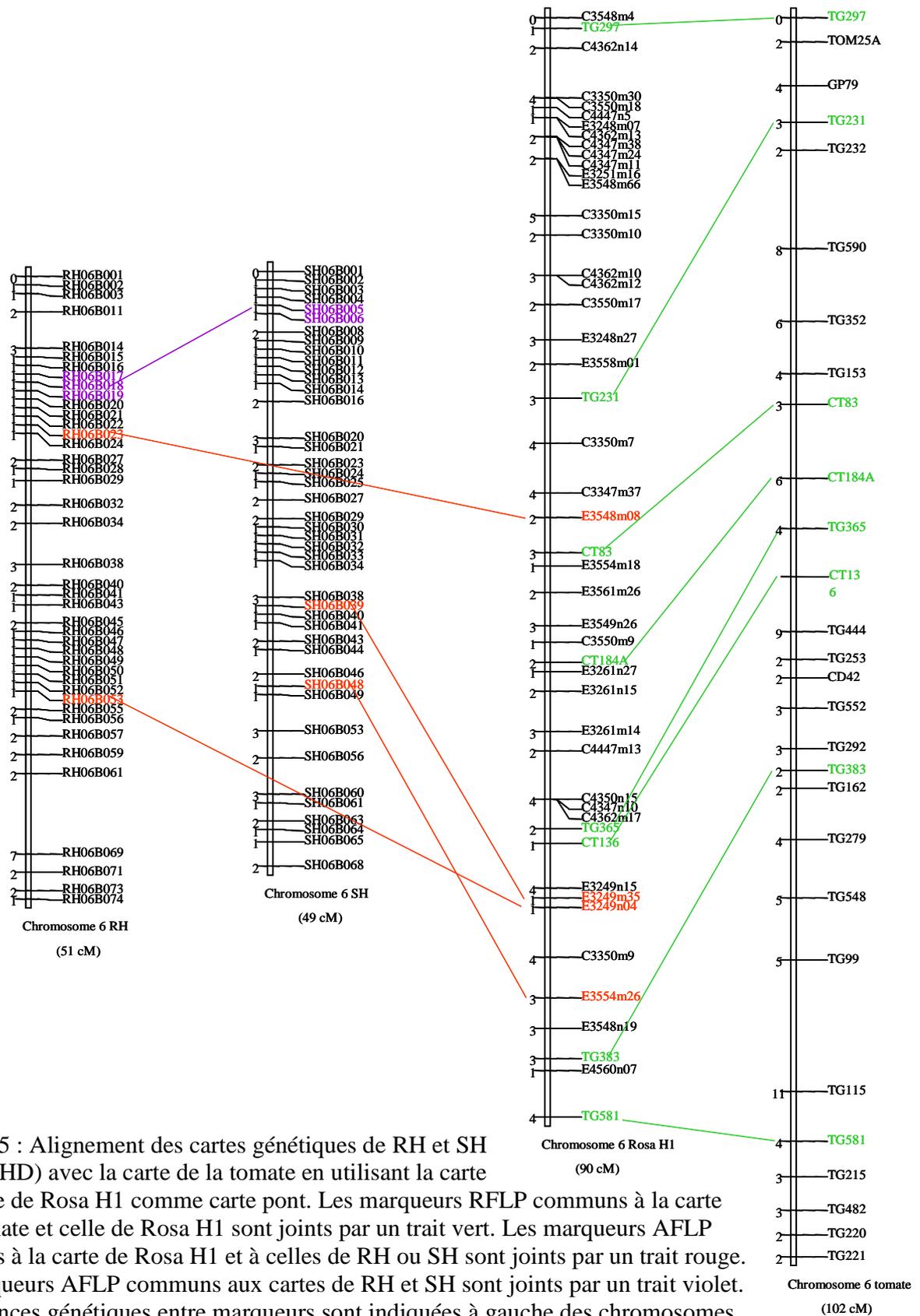


Figure 3.5 : Alignement des cartes génétiques de RH et SH (cartes UHD) avec la carte de la tomate en utilisant la carte génétique de Rosa H1 comme carte pont. Les marqueurs RFLP communs à la carte de la tomate et celle de Rosa H1 sont joints par un trait vert. Les marqueurs AFLP communs à la carte de Rosa H1 et à celles de RH ou SH sont joints par un trait rouge. Les marqueurs AFLP communs aux cartes de RH et SH sont joints par un trait violet. Les distances génétiques entre marqueurs sont indiquées à gauche des chromosomes en cM Kosambi. Le chromosome VI de Rosa H1 représenté comprend tous les marqueurs cartographiés sur ce chromosome.

spg334.19. Dans le cas du chromosome IX de Rosa H1, cela est dû à la faible couverture du bras court de ce chromosome, dans le cas des chromosome IX et XI de spg334.19, cela est plutôt dû à un manque de marqueurs communs aux cartes des deux espèces.

Les 23 combinaisons d'amorces AFLP utilisées pour la construction des cartes de Rosa H1 et de spg334.19 et le marqueur microsatellite Stm0038 ont également servi à la construction de la carte à Ultra Haute Densité (UHD) de marqueurs de la pomme de terre (Isidore et al. 2003). D'autres marqueurs microsatellites, précédemment localisés sur la carte UHD sont en cours de cartographie sur les cartes de Rosa H1 et de spg334.19. La carte UHD, qui est la carte méiotique la plus dense construite pour une espèce cultivée, est utilisée comme point de départ pour la construction de la carte physique et fonctionnelle de la pomme de terre (Contrat Européen APOPHYS). Grâce aux marqueurs AFLP et microsatellites communs à nos cartes et à la carte UHD, et aux marqueurs RFLP communs à nos cartes et à la carte de la tomate, il est possible d'établir des ponts entre la carte UHD et la carte de référence de la tomate (Figure 3.5, publication en préparation).

Dans le cadre du contrat Européen APOPHYS, plusieurs équipes s'attachent à positionner sur la carte physique de la pomme de terre, 300 gènes potentiellement impliqués dans les résistances aux bioagresseurs et dans la qualité du tubercule. Ces gènes fourniront directement des gènes candidats permettant de caractériser des locus d'intérêt, cartographiés chez la pomme de terre, mais aussi chez les autres espèces de Solanacées. En effet, le clone de pomme de terre ayant servi à la construction de la carte physique est un des parents de la carte UHD. Il sera donc possible d'établir des ponts entre la carte physique de la pomme de terre et la carte de la tomate par l'intermédiaire des cartes de Rosa H1 et de spg334.19.

Les marqueurs AFLP localisés sur la carte UHD peuvent également être convertis en marqueurs exploitables dans d'autres espèces de Solanacées. La saturation en marqueurs du locus *Phy-P5*, conférant une résistance partielle à *P. capsici* chez le piment, est en cours en utilisant cette stratégie (Danant, Bonnet et Lefebvre, résultats non publiés). Le locus *Phy-P5*, situé sur le chromosome P5 du piment, est flanqué de marqueurs RFLP de tomate, permettant d'établir des liens avec le chromosome IV de Rosa H1. Grâce aux marqueurs AFLP communs à la carte de Rosa H1 et à la carte UHD, une région de la carte UHD, synténique avec le locus *Phy-P5* a pu être déterminée. Des marqueurs AFLP de pomme de terre, cartographiés dans cette région génomique, sont en cours de conversion en marqueurs RFLP, utilisables chez le piment.

3.3.2 Analyse des biais de ségrégation

3.3.2.1 Hypothèses biologiques

Chez la pomme de terre, toutes les études de cartographie réalisées au niveau diploïde mettent en évidence des distorsions de ségrégation au niveau de marqueurs situés sur plusieurs chromosomes. Des allèles délétères de gènes situés sur ces chromosomes peuvent expliquer ces distorsions. Ces allèles peuvent intervenir au niveau de la viabilité des gamètes (mâles et/ou femelles), de la viabilité de l'embryon, de la faculté germinative de la graine (exprimant la qualité de l'albumen ou la viabilité de l'interaction embryon-albumen), de la viabilité de la plante, et de l'aptitude de chaque génotype à tubériser. A chacun de ces stades de développement, une sélection s'opère. Les descendances à partir desquelles sont réalisées la cartographie génétique et la recherche de QTL sont constituées des individus ayant survécu à cette sélection.

3.3.2.1.1 Aptitude à tubériser en fonction de la photopériode

Les biais de ségrégation observés dans des descendances issues de croisement interspécifiques sont souvent expliqués par l'aptitude des deux géniteurs à tubériser sous des conditions de photopériode différentes. En effet, l'induction de la tubérisation est soumise principalement à l'influence de la photopériode (Van den Berg et al. 1996). Les jours courts, ou plus précisément les nuits longues, favorisent une induction précoce de la tubérisation (Ellissèche 1996). La pomme de terre est originaire des Andes, où la photopériode est constamment proche de 12 heures de jours et 12 heures de nuit. L'espèce cultivée en Europe, *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, provient d'une sélection pour l'adaptation à tubériser en jours longs (durée de jour supérieure à 12 heures). Les cartes génétiques de Caspar H3 et spl329.18, réalisées à partir de deux séries de descendants, multipliées l'une en jours longs (96D31) et l'autre en jours courts (00D53), permettent d'avoir une idée des zones génomiques soumises à sélection en fonction de la photopériode. Le parent Caspar H3, dihaploïde de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, est multiplié en jours longs depuis plus de 20 ans. Le parent sauvage spl329.18 est multiplié en contre-saison, en photopériode de jours courts.

Sur la carte de Caspar H3, des biais de ségrégation sont observés spécifiquement dans la série 96D31, cultivée en jours longs, sur le chromosome VI. Ces biais peuvent s'expliquer par la subsistance chez ce génotype, issus d'une sélection pour la tubérisation en jours longs, d'allèles récessifs défavorables à ces conditions de culture. Il est plus difficile d'expliquer les

biais de ségrégation observés sur le chromosome VIII, spécifiquement dans la série 00D53 cultivée en jours courts, les nuits longues n'étant pas limitantes pour l'induction de la tubérisation (Ellissèche 1996).

Sur le génome de spl329.18, les biais de ségrégation affectant les chromosomes III, XII, et le groupe de liaison 26, observés uniquement dans la série 96D31 peuvent être expliqués par la présence d'allèles délétères pour la tubérisation en jours long. Cette hypothèse est étayée par la présence de biais de ségrégation sur les chromosomes III et XII de l'autre parent sauvage spg334.19. Les biais affectant les chromosomes V et XI n'ont été observés que dans la série 00D53, multipliée en jours courts. Il semble difficile d'expliquer ces biais de ségrégation par la présence d'allèles défavorables à la tubérisation en jours courts, particulièrement chez un génotype originaire des Andes.

Des QTL affectant la tubérisation ont été cartographiés dans deux back-cross réciproques impliquant un clone de *S. tuberosum* et un clone d'une espèce sauvage, *S. berthaultii* (Van den Berg et al. 1996). Les auteurs ont cartographié 11 QTL, répartis sur 7 chromosomes (I, II, III, IV, V, VI, VIII). Certains QTL de tubérisation colocalisent avec les régions génomiques biaisées différemment selon la saison de culture chez Caspar H3 (chromosomes VI et VIII) et chez spl329.18 (chromosomes III et V).

3.3.2.1.2 Autres hypothèses biologiques

La présence de distorsions de ségrégations particulièrement importantes sur le chromosome I de spg334.19 (parent mâle) peut être expliquée par la présence du gène *S* d'auto-incompatibilité gamétophytique (Kao and Tsukamoto 2004). Gebhardt et al. (1991) ont cartographié ce gène sur le bras court du chromosome I. Ce type d'incompatibilité se met en place quand les deux parents ont un allèle commun au locus *S*. Si le parent mâle est de type S_1S_2 et le parent femelle de type S_2S_3 , tous les grains de pollen ayant un gamète de type S_2 seront bloqués avant la fécondation. Aucune sélection ne s'opère sur les gamètes femelles. En effet, c'est dans le style, tissu maternel diploïde, que les gamètes mâles sont sélectionnés. La population, issue de ce croisement, sera donc exclusivement composée d'individus S_1S_2 et S_1S_3 , et seules les ségrégations du parent mâle seront affectées. Plus les marqueurs observés sont proches du gène *S*, plus les ségrégations sont distordues jusqu'à obtenir un seul allèle du parent mâle pour les marqueurs totalement liés au gène *S*. Sur le chromosome I de spg334.19, plus les marqueurs sont proches de la position où Gebhardt et al. (1991) ont cartographié le gène *S* d'auto-incompatibilité, plus les biais de ségrégation sont importants.

Certain biais observés sur les cartes de Caspar H3 et de Rosa H1 peuvent être dus à la présence d'allèles récessifs délétères. En effet, *S. tuberosum* est une espèce tétraploïde fortement hétérozygote, et la subsistance d'allèles récessifs délétères à certains locus est masquée par l'expression des trois autres allèles. Lors du passage au niveau diploïde, ces allèles délétères ont plus de probabilité de s'exprimer. Cela semble confirmée par la faible vigueur des clones dihaploïdes extraits de variétés tétraploïdes (Rousselle-Bourgeois and Rousselle 1992, Zimnoch-Guzowska and Dziejowska 1989). C'est également l'explication avancée pour expliquer la dépression de consanguinité chez les espèces hétérozygotes (Gallais 1990). Il est probable que de tels allèles délétères existent chez les parent dihaploïdes Rosa H1 et Caspar H3. Ils pourraient expliquer en particulier les biais observés chez Caspar H3, dans les deux séries 96D31 et 00D53, sur les chromosomes I, II, III, V, VII, et XII qui ne colocalisent pas avec des zones génomiques impliqués dans la précocité de tubérisation ou avec le gène *S*.

3.3.2.2 Conséquences des distorsions de ségrégation sur le déroulement des analyses de données

3.3.2.2.1 Sur la construction des cartes génétiques

Lorieux et al. (1995) ont démontré que des marqueurs présentant de fortes distorsions de ségrégation pouvaient se lier entre eux de manière totalement artificielle. Cela s'est vérifié lors de la construction de la carte de Rosa H1 où il a fallu utiliser comme seuil un LOD score de 10 pour séparer les marqueurs des chromosomes V et VII. Or les cartes génétiques sont couramment construites en utilisant comme valeur de seuil pour la constitution des groupes de liaisons, des LOD score variant entre 3 et 5 (de Vienne 1998, Grattapaglia and Sederoff 1994, Jacobs et al. 1995, Tanksley et al. 1992). Même avec des seuils aussi élevés (un LOD de 5, correspond à une probabilité 100000 fois supérieure d'avoir une liaison que de ne pas en avoir), notre expérience confirme le risque que l'on prend en utilisant des marqueurs biaisés pour la construction d'une carte génétique.

Malheureusement, dans beaucoup de populations, et ce quelle que soit l'espèce (Causse et al. 1994, de Vienne 1998, Grattapaglia and Sederoff 1994, Helentjaris et al. 1986, Jacobs et al. 1995, Lefebvre et al. 1995, Tanksley et al. 1992), des zones importantes du génome ne comportent que des marqueurs présentant des distorsions de ségrégation importantes. Les éliminer reviendrait à accepter de ne pas couvrir des bras entiers de chromosome, et les inclure entraîne le risque de fusionner des groupes de liaisons indépendants. Seule une

connaissance *a priori* de la localisation de certains marqueurs répartis sur chaque chromosome, permet de s'affranchir de ce risque. C'est une des raisons pour lesquelles, les cartes de référence construites avec des marqueurs locus spécifiques, sont extrêmement précieuses pour les études ultérieures. La carte de référence de la tomate a ainsi été très utile pour la construction des cartes de Rosa H1 et de spg334.19.

3.3.2.2.2 Sur la détection des QTL

La détection de QTL par cartographie d'intervalle est réalisée au moyen d'un jeu de données phénotypiques et d'une carte génétique. Si la fiabilité de certaines portions de la carte génétique est douteuse, à cause des distorsions de ségrégation, il faudra interpréter avec précaution les résultats obtenus dans ces régions lors de l'analyse QTL.

De plus, les calculs effectués pour détecter les QTL se basent sur l'hypothèse qu'il y a autant d'individus dans les deux classes génotypiques au(x) marqueur(s) considéré(s), et que les variances des individus de ces deux classes sont les mêmes pour le caractère phénotypique pris en compte. Or, en présence de distorsions de ségrégation, les fréquences génotypiques sont déséquilibrées. Dans ce cas la moyenne de la classe qui a l'effectif le plus faible est moins bien estimée que celle de la classe qui a l'effectif le plus élevé (Kaepler 1997), car l'importance prise par un individu atypique est beaucoup plus grande dans une classe à faible effectif que dans une classe à effectif important. Les risques de déclarer par erreur qu'un QTL est présent ou absent sont donc plus importants dans les régions chromosomiques qui présentent de fortes distorsions de ségrégation.

Dans notre étude, un QTL de résistance à *G. pallida*, nommé *GpaXII_{spg}* (*GpaM3* dans l'article), a été détecté sur le chromosome XII de spg334.19 (Chapitre 5). Le pic de la courbe de LOD de *GpaXII_{spg}* est situé au niveau de marqueurs affectés par des distorsions de ségrégation importantes.

Les deux QTL détectés sur les chromosomes V (*GpaV^s_{spl}*) et XI (*GpaXI^s_{spl}*) de spl329.18 (Chapitre 4) sont également situés dans des régions génomiques affectées par des distorsions de ségrégation. Toutefois, ces distorsions de ségrégation n'affectent que la série 00D53. Ce phénomène se traduit par un décalage de la distribution des clones vers la sensibilité. La proportion de clones sensibles dans la série 00D53 est supérieure à celle observée dans la série 96D31 (figure 4.5, chapitre 4). Les courbes de LOD ayant montré le même profil dans

les analyses réalisées indépendamment sur les clones de chaque série, on peut estimer que les biais de ségrégation n'ont pas affecté la précision de la localisation de *GpaV^s_{spl}* et *GpaXI^s_{spl}*.

3.3.3 Taille des cartes génétiques

Il est difficile de comparer les tailles des cartes de Caspar H3 est de spl329.18 car, en l'absence d'un nombre suffisant de marqueurs communs, nous ne pouvons estimer avec précision leur taux de couverture du génome. Malgré un taux de couverture du génome équivalent, la carte de Rosa H1 (939,2 cM) a une taille globale supérieur de près de 40 % à la taille globale de spg334.19 (675,9).

La différence de taille des cartes génétiques est liée à des taux de recombinaison plus ou moins importants lors de la méiose (de Vienne 1998). Plus il y a de recombinaisons dans un intervalle entre deux marqueurs, plus la distance génétique (exprimée en cM) entre ces deux marqueurs est grande. Bien que les taux de recombinaison ne soient pas identiques sur tous les chromosomes, les distances entre marqueurs sont, d'une manière générale, plus importantes sur la carte de Rosa H1 que sur celle de spg334.19. Sur le chromosome V par exemple, la distance entre les marqueurs CD064_A et TG569 est de 26 cM sur la carte de Rosa H1 et de 13 cM sur la carte de spg334.19. Seul le chromosome VI a un comportement inverse : les distances génétiques sont plus importantes sur la carte de spg334.19 (60 cM entre les marqueurs CT083 et TG581) que sur la carte de Rosa H1 (39 cM pour le même intervalle).

Gebhardt et al. (1991) et Rouppe van der Voort et al. (1997b) obtiennent des cartes plus courtes pour le parent mâle que pour le parent femelle, et expliquent ce phénomène par un plus faible taux de crossing-over lors de la méiose mâle. Ceci va dans le même sens que ce que nous observons entre les cartes de Rosa H1 (parent femelle) et de spg334.19 (parent mâle), et corrobore les expériences menées par Vicente and Tanksley (1991) sur la tomate. Toutefois, cette hypothèse est en contradiction avec les observations cytologiques menées par Jongedijk and Ramanna (1989), qui observent le même nombre de chiasmas dans les méioses mâle et femelle. En revanche, ils observent une réduction importante des chiasmas chez les individus possédant l'allèle récessif *ds1* (desynapsis) à l'état homozygote, aussi bien dans les méioses mâle que femelle (le gène *Ds-1* contrôle l'appariement des chromosomes homologues lors de la prophase). Les différences de taux de recombinaison observés entre Rosa H1 et spg334.19 pourraient s'expliquer par la présence chez spg334.19, de l'allèle *ds1* à l'état homozygote, ou d'allèles ayant un effet similaire (deux autres mutants désynaptiques sont

cités par les auteurs). Cette hypothèse pourrait être vérifiée en observant les différentes phases de la méiose de spg334.19.

Chapitre 4

Etude de la résistance à

G. pallida originaire de

S. sparsipilum

4 Etude de la résistance à *G. pallida* originaire de *S. sparsipilum*

4.1 Introduction

L'article présenté dans ce chapitre concerne l'étude du déterminisme génétique de la résistance à *G. pallida*, originaire de l'espèce sauvage de pomme de terre *S. sparsipilum*, et l'analyse de l'effet des QTL détectés sur le cycle de développement de *G. pallida*. Il a été soumis pour publication à la revue *Molecular Plant-Microbe Interactions* le 10 août 2004.

4.2 Resistance QTLs originating from *Solanum sparsipilum* act independently on the sex-ratio of *Globodera pallida* and together for developing a necrotic reaction

Bernard Caromel¹, Didier Mugniéry², Marie-Claire Kerlan³, Sandra Andrzejewski¹, Alain Palloix¹, Daniel Ellisèche³, Françoise Rousselle-Bourgeois¹, and Véronique Lefebvre¹

Institut National de la Recherche Agronomique,

¹ UGAFL, Unité de Génétique et d'Amélioration des Fruits et Légumes, Domaine Saint Maurice, BP 94, F-84143 Montfavet cedex, France;

² Bio3P, Unité de Biologie des Organismes et des Populations Appliquée à la Protection des Plantes, BP 35327, F-35653 Le Rheu cedex, France;

³ APBV, Station d'Amélioration de la Pomme de terre et des Plantes à bulbes, Kéraiber, F-29260 Ploudaniel, France.

Corresponding author: Bernard Caromel; E-mail : Bernard.Caromel@avignon.inra.fr

Abstract

Plant resistance to nematodes is related to the ability of the host to reduce the development of nematode juveniles into females. Resistance to the potato cyst nematode (PCN) *Globodera pallida*, originating from the wild species *Solanum sparsipilum*, was dissected by a QTL approach. Two QTLs explained 89% of the phenotypic variation. The QTL *GpaV^s_{spt}* on chromosome V displayed the major effect ($R^2=76.6\%$). It restricted *G. pallida* development to 16% of juveniles, 82% of males, and 2.3% of females. The QTL *GpaXI^s_{spt}* on chromosome XI displayed a lower effect ($R^2=12.7\%$). It restricted *G. pallida* development to 14% of juveniles, 35% of males and 51% of females. Clones carrying the both QTLs restricted the nematode

development to 58% juveniles, 41% of males, and 0.8% of females, and showed strong necrotic reactions around nematodes. This result underlines the importance to introgress together *GpaV^{spl}* and *GpaXI^{spl}* into potato cultivars in order to reduce the density of this quarantine pest in soil, and to decrease the risk of selecting overcoming *G. pallida* subpopulations.

Introduction

The Potato cyst nematodes (PCN), *Globodera pallida* (Stone) and *G. rostochiensis* (Wollenweber) are one of the most serious potato pests in temperate climates. Crop rotation is difficult to apply for economical reasons. Nematicide treatments are undesirable for environmental point of view. Breeding for resistant cultivars is the most desirable method of control.

Resistance to *G. pallida* was described in several accessions issued from cultivated and wild tuber-bearing *Solanum* species such as *S. tuberosum* subsp. *andigena*, *S. vernei*, *S. spegazzinii* and *S. sparsipilum* (Ross 1986, Rousselle-Bourgeois and Mugniéry 1995). Host resistance to PCN is defined as the ability of the host to restrict the number of developed females (Trudgill 1991), correlated with the reproductive potential of the parasite.

The PCN are biotrophic sedentary endoparasites with obligatory sexual reproduction. Their life cycle involves the J1 to J4 juvenile and the adult stages, separated by molts. The first molt occurs in the eggs contained in the female. Potato root exudates stimulate the hatching of the infective second stage juveniles (J2). The J2 penetrate the roots, migrate intracellularly, establish a permanent feeding site forming a syncytium close to the vascular tissues, and become sedentary. The J2 undergo three molts during development to the adult stage. Males leave the roots to fertilize the swollen females. Females produce hundreds of eggs which remain enclosed into a cyst constituted of the hardened phenolysed dead female body (Gheysen and Fenoll 2002). Nematodes remain viable into the cyst for many years. Sex is determined epigenetically, with the frequency of males increasing under crowding or poor nutrition conditions at the J2 stage (Mugniéry and Fayet 1981, 1984, Trudgill 1967).

Several authors described the effect of resistance sources on life cycle of the nematode (Arntzen et al. 1993, Mugniéry et al. 2001, Rice et al. 1987). They demonstrated that they

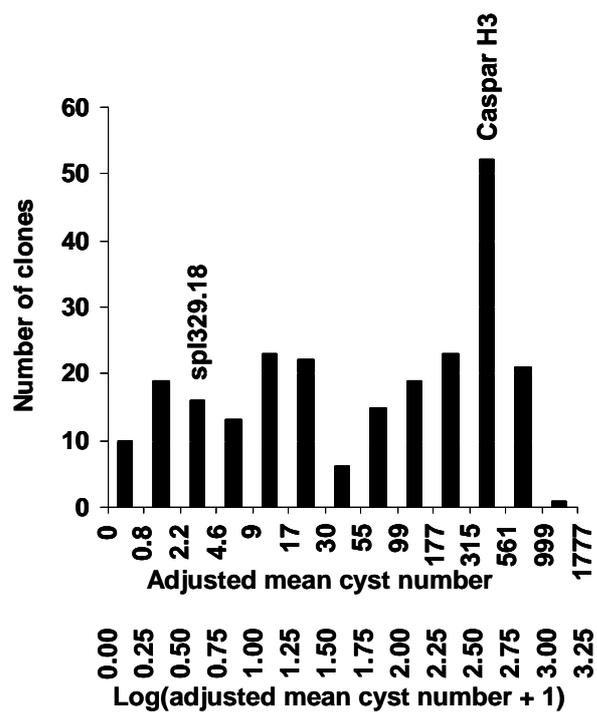


Fig. 4.1. Frequency distribution of *G. pallida* Pa2/3 resistance scores expressed by \log_{10} (adjusted mean cyst number+1), measured in the 239 clones derived from crosses between *S. tuberosum* Caspar H3 and *S. sparsipilum* spl329.18. The cyst numbers given on the *x-axis* of the figure follows a logarithmic scale. Position of the parental clones are indicate on the histogram.

may influence the hatching rate, the nematode development at juvenile stages, or the adult sex-ratio.

In parallel, the genetic dissection highlighted an oligo or polygenic inheritance for most of the resistance sources to *G. pallida*. Large effect QTLs originating from *S. spegazzinii* (Caromel et al. 2003, Kreike et al. 1994) and *S. vernei* (Bryan et al. 2002, Rouppe van der Voort et al. 1998, Rouppe van der Voort et al. 2000) have been mapped on the short arm (Dong et al. 2000) of chromosome V. QTLs with lower effect originating from *S. tuberosum* subsp. *andigena*, *S. vernei*, *S. spegazzinii* have been mapped on the chromosomes IV, VI, IX and XII (Bradshaw et al. 1998, Bryan et al. 2002, Caromel et al. 2003, Rouppe van der Voort et al. 2000). But until now, the stage of the PCN life cycle on which each QTL acts was never determined.

Map location of genetic factors conferring the resistance originating from *S. sparsipilum* was not yet determined. However this resistance source is attractive since it is effective against the most aggressive populations of *G. pallida* pathotype Pa2/3, which is the most frequently pathotype encountered in Europe. *S. sparsipilum* was shown to restrict the nematode development at a juvenile stage and to modify the sex-ratio toward males (Mugniéry et al. 2001).

In this paper, we report (*I*) the genetic map location of the loci involved in the resistance to *G. pallida* originating from *S. sparsipilum*, and (*II*) the phenotypic effects of the individual QTLs or the combination of QTLs on the sex ratio and developmental stages of the *G. pallida* life cycle.

Results

Mapping resistance QTLs to *G. pallida*

The resistance to *G. pallida* was evaluated by the number of newly formed cysts on a progeny of 239 hybrid clones issued from the cross between the susceptible *S. tuberosum* Caspar H3 and the resistant *S. sparsipilum* spl329.18. The whole progeny was split out in two sets that were separately assessed for resistance. The mean adjusted value per clone, as described in materials and methods, ranged from 0 to 1005. The log-transformed data showed a continuous distribution with a bimodal tendency, skewed toward the susceptibility (figure 4.1). Heritability of the genotypic means computed on the merged data was estimated to be 0.96.

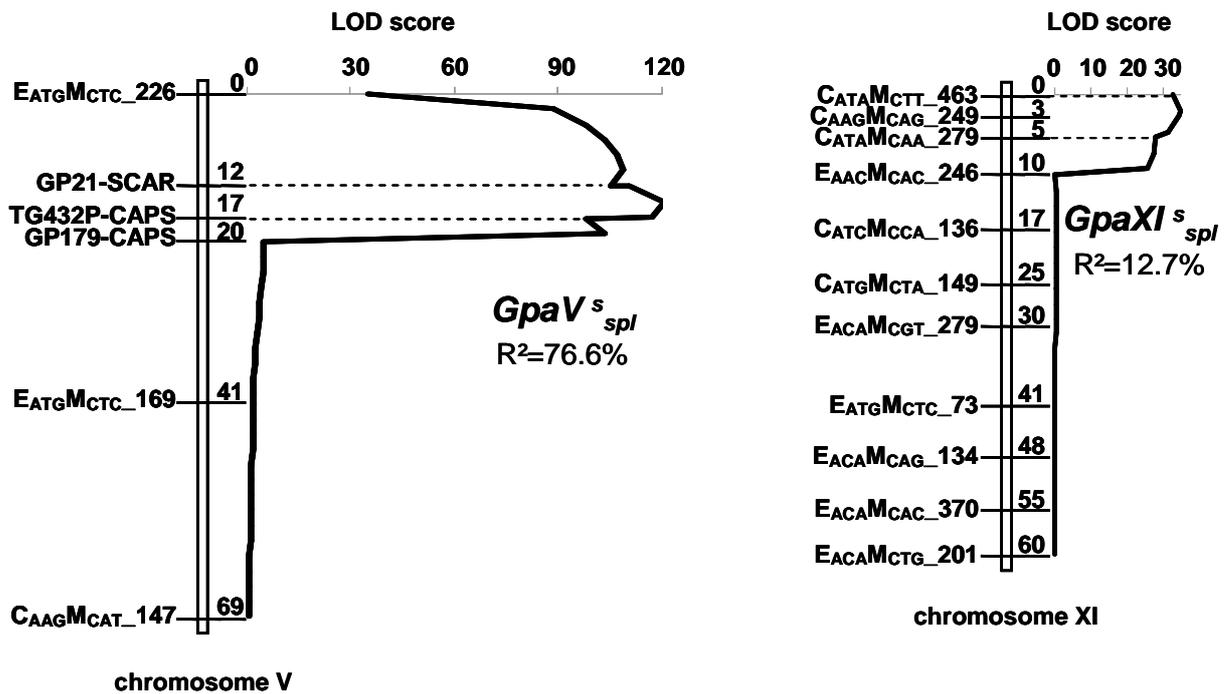


Fig. 4.2. QTL for the *G. pallida* Pa2/3 resistance detected by Composite Interval Mapping on the *S. sparsipilum* spl329.18 map. The LOD score is shown on the *x*-axis. Markers and scaled distances are given on the *y*-axis. Dotted lines indicate flanking markers of the most likely position of the QTLs.

Molecular genetic linkage maps were constructed for each parental clone, Caspar H3 and spl329.18, according to the double pseudo-test cross design. A total of 366 marker loci segregating from Caspar H3 mapped into 13 linkage groups, ranging from 18 to 131 cM. Three markers remained unlinked. A total of 293 marker loci segregating from spl329.18 mapped into 12 linkage groups, ranging from 31 to 108 cM. A set of 108 well-distributed markers with an average inter-marker distance of 9.6 cM (SD = \pm 6.3 cM) constituted the framework map of Caspar H3, spanning a total length of 958 cM. A set of 106 well-distributed markers with an average intermarker distance of 9.5 cM (SD = \pm 6.4 cM) constituted the framework map of spl329.18, spanning a total length of 894 cM.

QTL analyzes were performed on the 239 hybrid clones using the marker data of the two framework parental maps together. Composite Interval Mapping analyzes detected 2 QTLs on the chromosomes V and XI of the *S. sparsipilum* map (figure 4.2). They were named $GpaV^s_{spl}$ and $GpaXI^s_{spl}$. The QTL nomenclature indicates the nematode genus and species, the potato chromosome in roman figure, with the chromosome arm in superscript ("s" for short and "l" for long, according to Dong et al. 2000), and the species of origin in subscript. $GpaV^s_{spl}$ displayed a major effect ($R^2=76.6\%$) whereas $GpaXI^s_{spl}$ displayed a weak effect ($R^2=12.7\%$). No QTL was detected on the Caspar H3 map. No epistatic interaction was detected at a threshold of 10^{-4} . According to a two-factor ANOVA, $GpaV^s_{spl}$ and $GpaXI^s_{spl}$ explained 89 % of the total variation altogether.

Clones of the progeny were assumed to carry the resistance allele at a QTL when the both flanking markers of this QTL possessed the alleles in coupling with the resistance phenotype. Double recombination events between the flanking markers were ignored. The clones carrying different combinations of alleles at both QTLs are significantly different at a 95% confidence level. Their distribution is illustrated on fig.4.3. Clones without resistant alleles at both QTLs have the highest mean number of cysts (mean=475.0). Clones with the resistant allele at the $GpaV^s_{spl}$ QTL formed a smaller mean number of cysts (mean=14.5) than the clones with the resistant allele at the $GpaXI^s_{spl}$ QTL (mean=122.6). Clones carrying the resistant alleles at both QTLs have the smallest number of cysts (mean=1.7). This result illustrates the additivity of QTL effects.

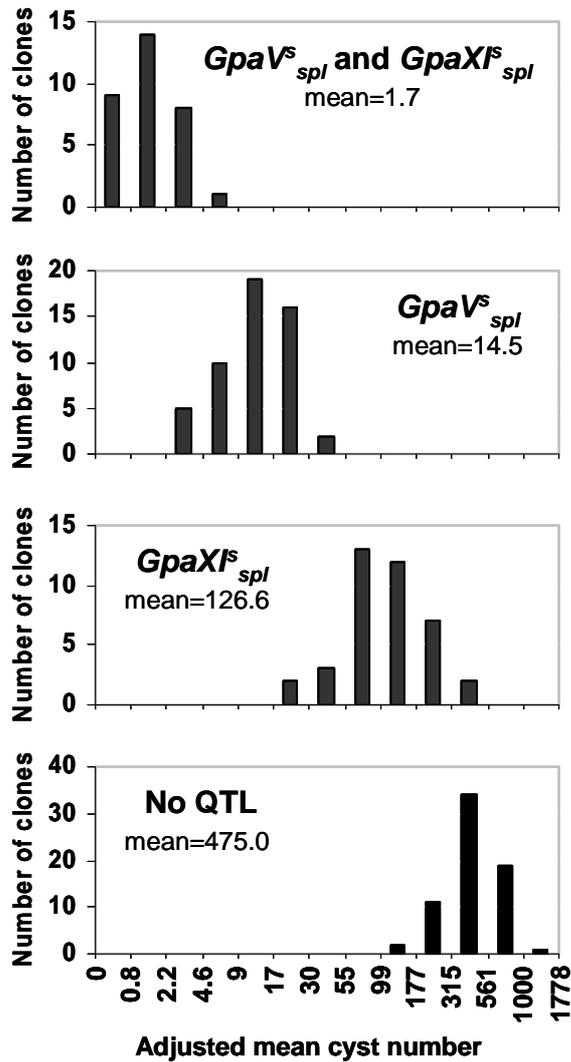


Fig. 4.3. Frequency distribution of *G. pallida* Pa2/3 adjusted mean cyst number for clones possessing different allele combinations at the $GpaV^{S_{spl}}$ and $GpaXI^{S_{spl}}$. The clones that recombined between markers flanking the QTLs were considered as missing data. The cyst number given on the *x-axis* follows a logarithmic scale. "Mean" indicates the mean value of the clones with each allele combination.

Effects of *GpaV^{spl}* and *GpaXI^{spl}* on the nematode development

Four clones of the progeny between Caspar H3 and spl329.18, carrying different combinations of alleles at resistance QTLs *GpaV^{spl}* and *GpaXI^{spl}*, were chosen to study their effects on the nematode development. For each infected clone, the developmental stage of the retrieved nematodes was noted as J2/J3 undeveloped nematodes, males or females. Analysis of variance detected a highly significant effect of the clone on the developmental stage ($P < 2.2 \cdot 10^{-16}$, $R^2 = 53\%$). The respective proportion of nematodes for each developmental stage showed evident differences between the 4 clones (figure 4.4). Two criteria are particularly favorable for the resistance expression: the percentage of undeveloped J2 and J3 nematodes and the percentage of adult nematodes developed into males. In the clone with both QTLs, 58% of the nematodes were restricted to a J2/J3 juvenile stage whereas the clones with a resistance allele at a single QTL harbored 3 to 5-fold fewer juveniles and the clone without any resistant QTL harbored 37-fold fewer juveniles. This result indicates that a single QTL confers a small effect for blocking the development of the juvenile nematodes and that the joint presence of the both QTLs is very effective for this trait.

In the clone without any resistance allele at the QTLs, 90% of the nematodes developed in females and 9% developed in males. In the clone with the resistance allele at the minor *GpaXI^{spl}* QTL, 51% of the nematodes developed in females and 35% in males. In the clone with the resistance allele at the major *GpaV^{spl}* QTL, 2.3% of the nematodes developed in female and 82% in males. In the clone with the resistance alleles at both QTLs, 0.8% of the nematodes developed in female and 41% in males. This result underlines the very effective effect of the *GpaV^{spl}* QTL on the sex-ratio unbalance toward males. Moreover, we systematically observed that the clone with both QTLs displayed a strong necrotic reaction around all the nematodes retrieved whatever their developmental stage, whereas no such reaction was observed in the three other clones with a single resistance QTL allele or without resistance QTL allele.

Discussion

To our knowledge, this study is the first report identifying QTLs associated with the resistance to *G. pallida* originating from *S. sparsipilum*. Two additive QTLs were detected on the chromosomes V and XI. The *GpaV^{spl}* QTL displayed the largest effect ($R^2 = 76.6\%$). The *GpaXI^{spl}* QTL displayed a smaller effect ($R^2 = 12.7\%$) that is perfectly additive to *GpaV^{spl}*

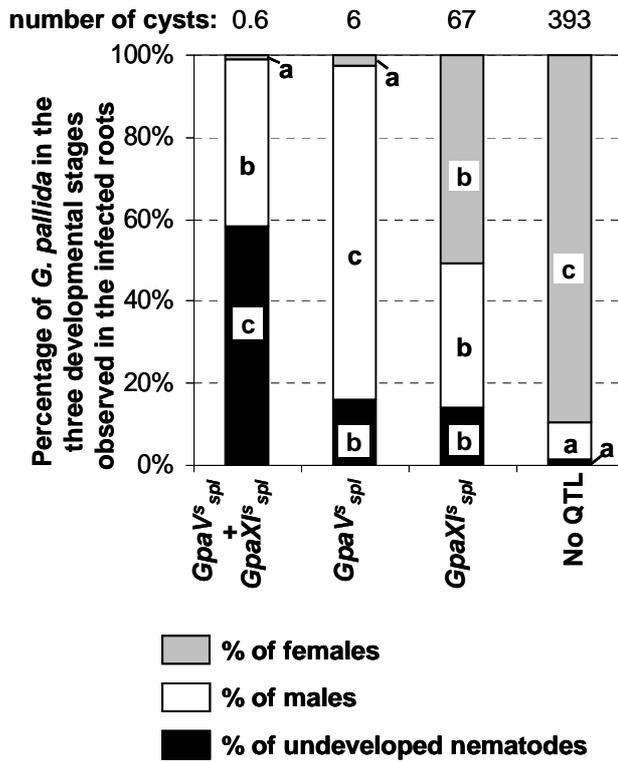


Fig. 4.4. Percentage of *G. pallida* reaching the J2/J3, male, or female developmental stage in 20 roots of four chosen clones carrying different allele combinations at the $GpaV^s_{spl}$ and $GpaXI^s_{spl}$ QTLs originating from *S. sparsipilum* [$GpaV^s_{spl}$: resistance allele at $GpaV^s_{spl}$; $GpaXI^s_{spl}$: resistance allele at $GpaXI^s_{spl}$; $GpaV^s_{spl} + GpaXI^s_{spl}$: resistance alleles at $GpaV^s_{spl}$ and $GpaXI^s_{spl}$; No QTL: No resistance allele at both QTLs]. For the three developmental stages observed, different letters indicate significant differences between clones assessed by a 2 \hat{I} multiple comparison test of Kullback (1959).

since both QTLs explained 89% of the total observed variation. This value is close to the broad-sense heritability value (0.96) indicating that most of the genetic variation is explained by those both QTLs.

Abortion of the juvenile development was associated with monogenic resistance involving hypersensitive reaction (HR) with a necrotic reaction. That is the case of the tomato *Mi* gene affecting resistance to *Meloidogyne* sp. (Paulson and Webster 1972) and the potato *Hl* gene affecting resistance to *G. rostochiensis* (Rice et al. 1985). The shift of the sex-ratio toward males was described in case of monogenic and polygenic resistances (Bakker 2003, Luedders 1987, Rice et al. 1987). In this paper, we demonstrated that the both resistance QTLs originating from *S. sparsipilum* independently modified the sex-ratio toward males with the largest effect attributed to *GpaV^s_{spl}* that increased the number of males 2 to 3-fold more than *GpaXI^s_{spl}*. Moreover the association of the both QTLs reduced to almost zero the percentage of females. The effect of these QTLs on the sex-ratio corroborated the previous descriptions for polygenic resistances.

However our experiment also showed that the joint presence of both QTLs in the same clone increased considerably the percentage of aborted juveniles and provoked a strong necrotic reaction, whereas the clones with a single QTL displayed a low percentage of aborted juveniles and did not provoke any visible necrosis. This is the first time that a complementation between two QTLs is reported as provoking a necrotic reaction. This rapid necrosis observed here is assumed to enclose the syncytium. The subsequent isolation of the feeding site from the vascular vessels results thus in a drastic starvation of juveniles. Consequently most of them do not reach the adult stage, and those who succeed to develop shift to male.

How two QTLs, without individual necrotic effect, could produce a strong necrotic reaction when they are together in a same potato clone remain unclear. One explanation to the phenomenon observed in our study could be that at least one of the two *GpaV^s_{spl}* and *GpaXI^s_{spl}* QTLs has potential to individually activate a necrotic reaction but that this reaction is too slow or too weak to be observed in our experimental conditions. Conversely, once the QTL are both present, the reaction is boosted due to a synergic effect conferred by the interaction of the both QTLs, so that the necrotic reaction is visible 15 days post-inoculation.

The both QTLs *GpaV^s_{spl}* and *GpaXI^s_{spl}* mapped in resistance gene clusters common to the Solanaceae (Gebhardt and Valkonen 2001). On the cluster of chromosome V containing *GpaV^s_{spl}*, the cloned resistance genes potato *R1* to *Phytophthora infestans* (Ballvora et al. 2002), potato *Rx2* to Potato Virus X (Bendahmane et al. 2000), and tomato *Bs4* to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Schornack et al. 2004) belong to the NBS-LRR super-family. On the cluster of the short arm of chromosome XI containing *GpaXI^s_{spl}*, the potato *R3* to *P. infestans* (Herman van Eck, personal communication) and tomato *I2* to *Fusarium oxysporum* also belong to the NBS-LRR super-family. Despite *GpaV^s_{spl}* and *GpaXI^s_{spl}* have a quantitative effect, they are also expected to encode NBS-LRR proteins.

The introgression of the *S. sparsipilum* resistance to *G. pallida* into potato cultivars have to take into account the two QTLs together. Despite its low effect, the *GpaXI^s_{spl}* QTL amplified and stabilized the action of the major effect *GpaV^s_{spl}* QTL. Potato clones with resistance alleles at the both QTLs displayed less than five cysts whereas clones with resistance alleles at the single *GpaV^s_{spl}* QTL allowed development of up to 45 cysts, compared to 173 to 1005 cysts in clones without resistance alleles at any QTL. Reducing the reproductive potential to a minimal number of cysts is of primary importance in the case of a quarantine pest such as *G. pallida*.

Our results also provide an explanation why in practical breeding programs, based on introgression of resistance from wild species, the recovery of fully resistant offspring is very difficult. After several backcrosses, the best breeding lines are at best highly resistant, but these clones still allow the development of a few cysts. Loss of a minor QTL as described in this paper is the most likely explanation for the enigmatic inability of practical breeding programs to retain the level of resistance of the donor wild species. In another pathosystem, Thabuis et al. (2004a) demonstrated that phenotypic selection did not retain low effect QTLs and hinder the creation of fully resistant lines.

Reducing the reproductive potential to a minimal number of cysts is also important in a durability point of view. The fewer the number of cysts, the lower the risk of selecting for subpopulations of *G. pallida* that overcome the resistance. It has been demonstrated that *G. pallida* rapidly overcame partial resistance originating from several wild potato species (Beniers et al. 1995, Schouten and Beniers 1997, Turner and Fleming 2000, 2002, Turner et al. 1983, Whitehead 1991) but overcoming was never reported in *S. sparsipilum* species even

after a five year experiment (Turner and Fleming 2000). Thus the *GpaV^{spl}* and *GpaXI^{spl}* QTLs together are *a priori* good candidates for assuring durable resistance to *G. pallida*.

Materials and methods

Plant material

Analyzes were performed on 239 diploid hybrid clones originating from crosses between the same parental accessions. spl329.18, a diploid clone of the *S. sparsipilum* PI 310984 accession from Sturgeon Bay collection, used as male, is resistant to *G. pallida*. It did not develop any cyst in previous tests (Rousselle-Bourgeois and Mugniéry 1995). Caspar H3, a dihaploid of *S. tuberosum* cv. Caspar, used as female, is susceptible.

Resistance assessment for QTL analysis

Resistance assessment was performed by artificial tests in controlled conditions. Four tubers per clone were planted separately in a plastic pots filled with 400 cm³ of a mixture of soil and sand. Ten cysts of *G. pallida* pathotype Pa2/3 (Chavornay population) were added into each pot in order to achieve an infestation of 5 - 10 juveniles per gram of soil. Plants were grown in greenhouse for 4 months. Newly-formed cysts were recovered from the soil by elutriation. Cysts were counted for each tuber individually.

To assess the resistance, the whole progeny was split out in two sets of 97 and 142 clones tested independently. Caspar H3, the susceptible parent, 96D31.137, a moderately resistant clone, and 96D31.145, a fully resistant clone were used as controls in both resistance tests.

Phenotypic effects of the QTLs on the components of nematode development

Four clones of the progeny were chosen according to their alleles at the both QTLs. Ten tubers per clone were grown at 20°C in Petri dishes on water solidified with 2% agar (Mugniéry and Person 1976). One to three roots per tuber were inoculated with 10 J2 juveniles per root. A total of 20 inoculated roots per clone were dissected, under 40 X magnification, 15 days after inoculation (Mugniéry et al. 2001). For each retrieved nematode among the ten inoculated per root, the developmental stage was noted according to the following classification: J2/J3 undeveloped nematodes, male, or female. The distinction male vs. female was determined on J4 or adult nematodes. Presence *versus* absence of a necrosis

Table 4.1 PCR primers designed for markers of the potato chromosome V

Marker	DNA sequences used for designing primers	Primer sequences 5' → 3'	Restriction enzyme for CAPS
TG432P-CAPS	DNA from Caspar H3 and spl329.18 amplified with TG432 primers of (De Jong et al. 1997)	GGACAGTCATCAGATTGTGG GTACTCCTGCTTGAGCCATT	<i>DraI</i>
CT242_2-CAPS	RFLP probe sequence available in the SGN Database	CAGCTACAACACTGCGATGC TGCATCCAAAATGAACAACC	<i>HaeIII</i>
GP21-SCAR	DNA from Caspar H3 and spl329.18 amplified with GP21 primers of (Meksem et al. 1995)	CTTTCATGTCTATGAGGTAATGGC GTGTTAAATTTCTTATTAGTCTTTTGTATTCA	-

around the nematode was noted. Non-retrieved nematodes were considered as non penetrated or missing data.

Molecular analysis

Molecular markers well distributed on published potato genetic linkage maps (Gebhardt et al. 1991, Isidore et al. 2003, Milbourne et al. 1998, Tanksley et al. 1992) were analyzed on the 239 diploid clones. Total nuclear DNA was extracted from 100 milligrams of fresh leaves of three-weeks old plants, following the protocol described by Fulton et al. (1995).

Twenty AFLP primer combinations, delivering markers covering the whole genome of the Ultra High Density (UHD) Potato map (Isidore et al. 2003) were chosen. They were generated with *EcoRI* (E) or *SacI* (C) as rare cutter and *MseI* (M) as frequent cutter restriction enzymes, and were analyzed according to the method described by Vos et al. (1995) except that the anodal electrophoresis buffer was 1 X TBE, 0.5 M NaAc. Segregating fragments were scored visually and independently by two people. Only markers heterozygous for a single parent were considered. They were identified by the name of the primer combination and the molecular weight of the fragment as indicated on the UHD potato database.

Five SSR markers were mapped. *Stm0003*, *Stm0013*, and *Stm1020* were amplified according to the procedure described by Milbourne et al. (1997, 1998). Primer sequences for *SSR4* and *SSR19* were retrieved from the Solanaceae Genomic Network (SGN) Database. PCR reactions were carried out as described by Milbourne et al. (1997) with an annealing temperature of 50°C.

Four CAPS or SCAR markers were mapped. PCRs for CAPS marker *GP179* were carried out as described by Meksem et al. (1995). Ten µl of the PCR reaction were then digested with 3 U of *EcoRV*, following instructions provided by the manufacturer (Invitrogen). Primers and PCR conditions for markers *CT242_2-CAPS*, *TG432P-CAPS*, and *GP21-SCAR* were adapted. We designed new primers (table 4.1) from published sequences (SGN database) or from sequences obtained in our laboratory. PCR were carried out using the Hot-Start version of TaKaRa Ex Taq enzyme, following instructions provided by the manufacturer (TaKaRa). Cycling conditions were as follows: 94°C for 3 min, followed by 40 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 45 s, 72°C for 2 min 30 s (*CT242_2-CAPS* and *TG432P-CAPS*) or 1 min 30 s (*GP21-SCAR*), followed by 72°C for 10 min. PCR using the *GP21-SCAR* primers amplified

a single *S. sparsipilum* allele of 400 bp. 0.25 µM of each GP179 primer (Meksem et al. 1995) were added to the PCR reaction, to get a fragment of 550 bp as amplification control.

Assignment of linkage groups was realized thanks to co-migrating AFLP markers (Roupe van der Voort et al. 1997b) with the UHD potato map (Isidore et al. 2003) or the Rosa H1 or SPG 334.19 maps (Caromel et al. 2003), or to SSR or CAPS markers of known locations. For one linkage group without previously mapped AFLP, SSR or CAPS markers, AFLP fragments mapped on this linkage group were isolated as described by Roupe van der Voort et al. (1997b) to produce RFLP probes. These probes were mapped on the Rosa H1 or SPG 334.19 maps, where all the linkage groups were assigned (Caromel et al. 2003).

Data analysis

Statistical analysis were performed using the R software version 1.7.7 (Ihaka and Gentleman 1996).

The average cyst number of the clones, which were assessed in two independent tests, was adjusted using parameters of the linear regression computed with the data of the control clones Caspar H3, 96D31.137, and 96D31.145. Adjusted data were further transformed as $\log_{10}(x+1)$, with x being the adjusted mean number of cysts. Further analyzes were performed with these values. Broad sense heritability was estimated with the following formula: $h^2_b = \sigma^2g / (\sigma^2g + \sigma^2e/n)$ where σ^2g = genetic variance, σ^2e = error variance and n = number of replicates.

Molecular analyzes and map constructions were performed in two steps. A set of 97 clones were genotyped with 20 AFLP primer combinations, four CAPS or SCAR markers, and five SSR markers. The 142 other clones were genotyped with a subset of evenly distributed markers covering most of the spl329.18 map. Two independent genetic linkage maps were derived from each parent following the double pseudo-test cross design (Grattapaglia and Sederoff 1994) using the software MapMaker/Exp 3.0 (Lander et al. 1987). Linkage groups were determined with a minimum LOD score of 6 and a maximum recombination rate of 0.3. Recombination frequencies were converted into mapping distances (cM) using Kosambi's function (1944). Framework maps were constructed with the most informative markers evenly distributed on the maps. A total of 115 and 106 markers from Caspar H3 and spl329.18 framework maps were integrated in a single dataset.

QTL detection was performed using the Composite Interval Mapping (CIM) method with the QTL Cartographer software (Basten et al. 1997). Two markers, selected by a forward-backward stepwise regression analysis, were used as cofactors in the CIM procedure, with a window size of 10 cM and a walking speed of 2 cM. A 1000-permutation test defined a significant threshold at LOD 3.0 (type I error = 0.05). The coefficient of determination (R^2) describes the percentage of the total variation explained by the QTL. It was computed at the maximum of the LOD score plot.

Digenic interactions between all pairs of markers of the single dataset integrating the two framework maps, were tested using a two-way analysis of variance with an interaction component. A signification level of $P < 10^{-4}$ was employed.

A two-factor analysis of variance was performed to estimate the total variation explained by the two QTLs. The most-tightly linked marker to each QTL maximum LOD score plot was used as factor.

Among the 239 clones of the whole progeny, 190 clones did not show any recombination event between the markers flanking each QTL. These 190 clones were classified according to their allelic combination at the both QTLs. For each QTL combination, the frequency distribution of the clones were compared for the $\log_{10}(\text{adjusted mean cyst number}+1)$. QTL effect was assessed by analysis of variance. The mean values of the clones possessing the different alleles at both QTLs were compared using the multiple comparison test of Tukey (Tukey Honest Significant Differences) with a 95% family-wise confidence level.

For the four clones of the 96D.31 progeny chosen for their different combination of alleles at the both QTLs, developmental stage of the retrieved nematodes was noted as J2/J3 undeveloped nematodes, males or females. The effect of the QTL allele combination on the developmental stage was assessed by analysis of variance. For each developmental stage, the number of retrieved nematodes were compared between the four clones using the $2\hat{I}$ multiple comparison test of Kullback (1959) mentioned in Arbonnier (1966) with a 95% family-wise confidence level.

Acknowledgments

We warmly thank Benoit Moury and Herman van Eck for their useful critical review of this manuscript. We also thank Nadia Lama, Jean-Paul Dantec, Claudia Rouaux, and Peggy

Cavallin for their technical assistance. This work was partly supported by the EU contract FAIR5-PL97-3565. We dedicate this paper to the memory of our colleague F. Rousselle-Bourgeois whose research inspired this work and who is greatly missed.

Author-Recommended Internet Resources

The Solanaceae Genomic Network (SGN) database: <http://www.sgn.cornell.edu/>

Ultra High Density (UHD) Potato map: <http://potatodbase.dpw.wau.nl/UHDdata.html>

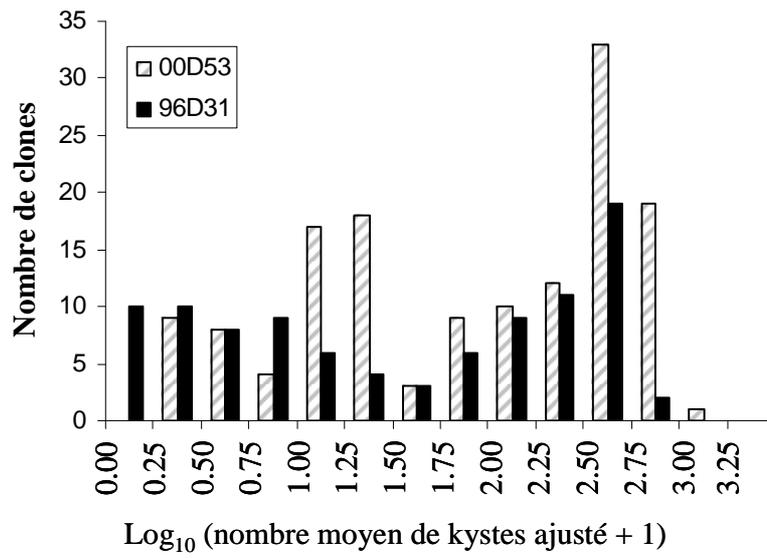


Figure 4.5: Distribution des clones des deux séries 00D53 et 96D31 pour la résistance à *G. pallida*, exprimée par Log_{10} (nombre moyen de kystes ajusté + 1).

4.3 Complément à l'article

4.3.1 Détection des QTL de résistance

L'analyse du déterminisme génétique de la résistance originaire de spl329.18, publiée dans l'article, a été réalisée sur les 239 clones de la descendance issue de croisements entre Caspar H3 et spl329.18. Cette descendance a été obtenue à partir de deux séries de croisements indépendants. Les clones de pomme de terre des deux séries ont été semés et multipliés dans des conditions de photopériode différentes : les clones de la série 96D31 ont été semés et multipliés en jours longs et les clones de la série 00D53 ont été semés et multipliés en jours courts (Chapitre 2.1). Les clones des deux séries ont été testés indépendamment pour la résistance à *G. pallida*, et trois clones témoins, utilisés dans les deux tests de résistance, ont servi à ajuster les données phénotypiques des clones des deux séries. Des biais de ségrégation ont été observés dans la série 00D53 sur les chromosomes V et XI, où ont été localisés les QTL de résistance (chapitre 3.2.2).

Les distributions des clones des deux séries pour la résistance sont différentes, montrant un décalage vers la sensibilité dans la série 00D53 (figure 4.5). Nous nous sommes assurés que les courbes de LOD des QTL de résistance, détectées à partir des données phénotypiques ajustées des clones de chaque série, se localisaient dans la même région chromosomique. Les courbes de LOD obtenues à partir des clones des deux séries étant superposées (figure 4.6), nous avons ensuite fusionné les deux jeux de données.

4.3.2 Etude de l'effet des QTL sur le développement de *G. pallida*

Un des points faibles du dispositif expérimental utilisé pour étudier l'effet des allèles de résistance aux QTL originaires de *S. sparsipilum* sur le développement de *G. pallida* est lié au nombre de clones de pomme de terre analysés par combinaison de QTL. Un seul clone possédant chaque combinaison d'allèles aux deux QTL a été utilisé. Cette restriction ne permet pas de différencier l'effet la combinaison d'allèles aux QTL de l'effet du fonds génétique. Cependant les résultats obtenus par Mugniéry et al. (2001) vont également dans le sens d'une implication conjointe des deux QTL *GpaV^{spl}* et *GpaXI^{spl}* dans l'effet de blocage des nématodes aux stades juvéniles et dans le développement d'une réaction nécrotique.

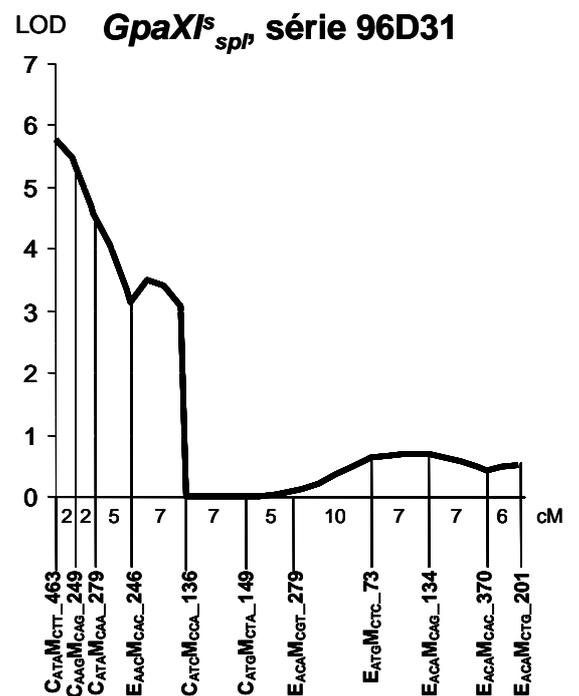
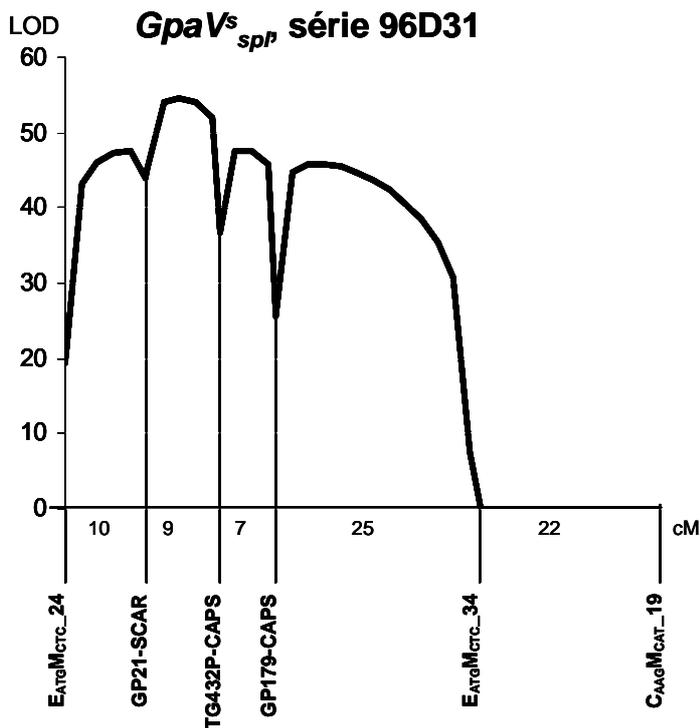
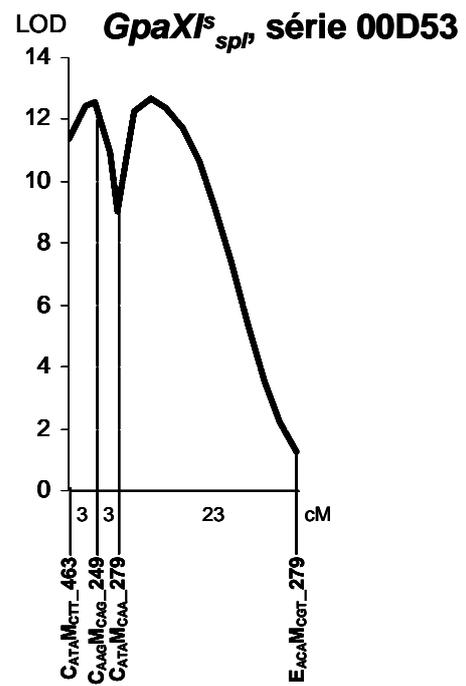
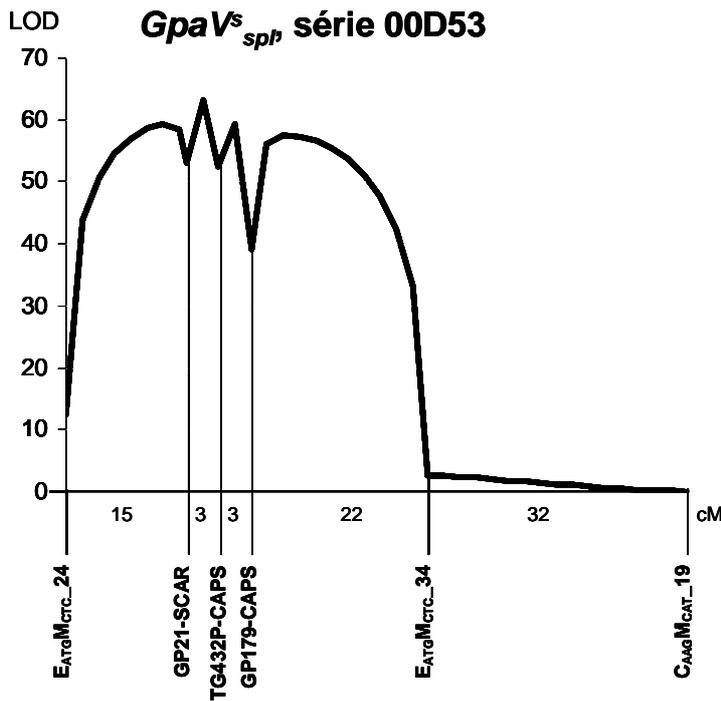


Figure 4.6 : Courbes de LOD des QTL *GpaV^s_{spl}* et *GpaXI^s_{spl}* détectés par CIM dans les deux séries de clones issus de croisements entre Caspar H3 et spl329.18. Les clones des deux séries ont été testés indépendamment pour la résistance à *G. pallida*. Les clones de la série 00D53 ont été semés et multipliés en photopériode de jours courts. Les clones de la série 96D31 ont été semés et multipliés en photopériode de jours longs. Les distances sur l'axe des ordonnées sont indiquées en cM Kosambi. Les échelles des axes des abscisses sont différentes.

La cartographie des QTL nous a permis de démontrer que les clones de la descendance issue du croisement entre Caspar H3 et spl329.18, qui possèdent les allèles de résistance aux deux QTL $GpaV_{spl}^s$ et $GpaXI_{spl}^s$, avaient permis le développement de moins de 5 kystes par plante en moyenne, alors que les clones possédant les allèles de résistance à un seul QTL avaient permis le développement de 2,5 à 368 kystes par plante. Le clone, ayant les deux QTL, utilisé lors de l'analyse de l'effet des QTL sur le cycle de développement de *G. pallida*, a permis le développement de 0,6 kyste par plante en moyenne et a montré un fort effet sur le blocage des nématodes aux stades juvéniles, ainsi que la présence systématique d'une nécrose dans toutes les racines inoculées.

Mugniéry et al. (2001) ont analysé la résistance à *G. pallida* dans des descendances ayant, soit le même parent résistant que notre descendance (spl329.18), soit un clone frère (spl88S329.15), croisés avec des clones dihaploïdes de *S. tuberosum* sensibles. Le déterminisme génétique de la résistance n'était pas connu. Après avoir compté le nombre de kystes développés sur chaque clone, les auteurs ont étudié l'effet d'un ensemble de clones, sur lesquels peu de kystes s'étaient développés, sur le cycle de développement de *G. pallida*. Sur 19 de ces clones, moins de 1,5 kystes par plante en moyenne ont été trouvés. Il est probable que ces 19 clones possèdent les allèles de résistance aux deux QTL $GpaV_{spl}^s$ et $GpaXI_{spl}^s$. Lors de l'analyse de l'effet des clones sur le développement des nématodes, Mugniéry et al. (2001) ont observé un fort effet de blocage des nématodes aux stades juvéniles dans les racines de ces 19 clones. De même, comme dans notre étude, la présence d'une forte nécrose a également été notée dans les racines de ces 19 clones. Il est donc probable que l'effet de blocage des nématodes aux stades juvéniles, ainsi que le développement d'une réaction nécrotique soit lié à la présence des allèles de résistance aux deux QTL, et non à l'influence du fonds génétique.

Chapitre 5

Etude de la résistance à

G. pallida originaire de

S. spegazzinii

5 Etude de la résistance à *G. pallida* originaire de *S. spegazzinii*

5.1 Introduction

Solanum spegazzinii a été décrit depuis de nombreuses années comme une source de résistance à *Globodera pallida* (Ross 1986, Rousselle-Bourgeois and Mugniéry 1995). Des clones de cette espèce ont été utilisés comme géniteurs dans les programmes de sélection de plusieurs pays (Kreike et al. 1994, Ross 1986). Néanmoins, aucune variété de pomme de terre actuelle ne possède le haut niveau de résistance de *S. spegazzinii*. L'objectif de cette étude est de localiser les QTL affectant la résistance à *G. pallida* et d'étudier leur effet sur le cycle de développement de ce nématode.

Une première recherche de QTL, réalisée par Interval Mapping sur une carte partiellement saturée, a fait l'objet d'un article publié dans *Theoretical and Applied Genetics*. Cette analyse QTL a été complétée en utilisant la méthode de Composite Interval Mapping sur une carte couvrant l'essentiel du génome des deux parents de la descendance utilisée. L'effet des QTL sur le cycle de développement de *G. pallida* a été étudié.

5.2 Mapping QTLs for resistance against *Globodera pallida* (Stone) Pa2/3 in a diploid potato progeny originating from *S. spegazzinii*

Article paru dans *Theoretical and Applied Genetics* (2003) 106:1517-1523.

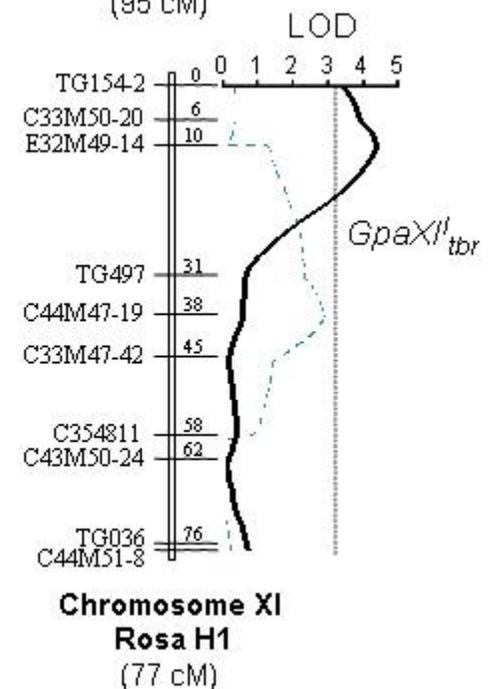
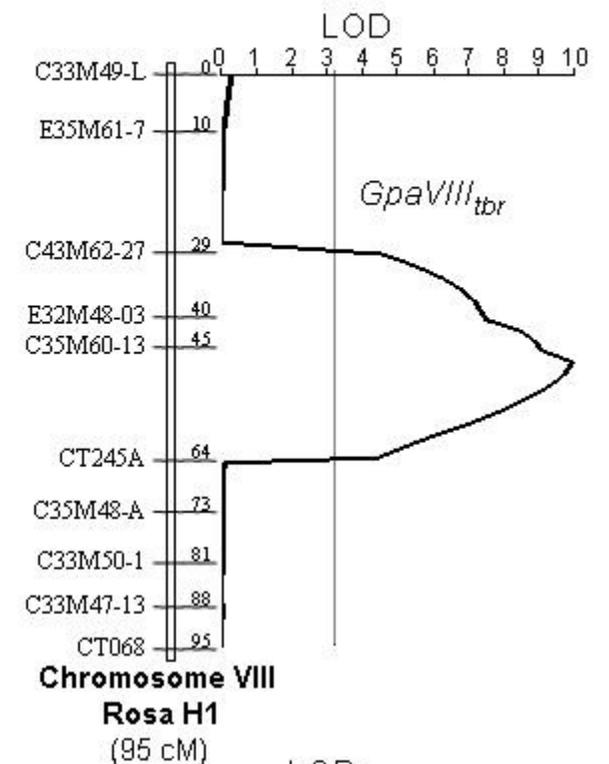
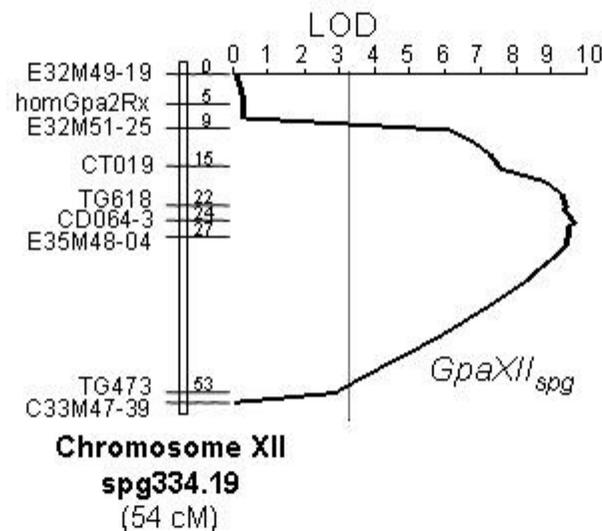
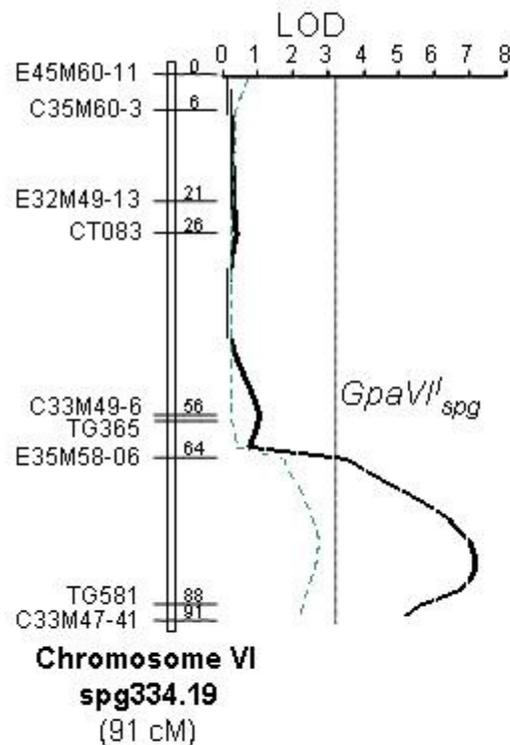
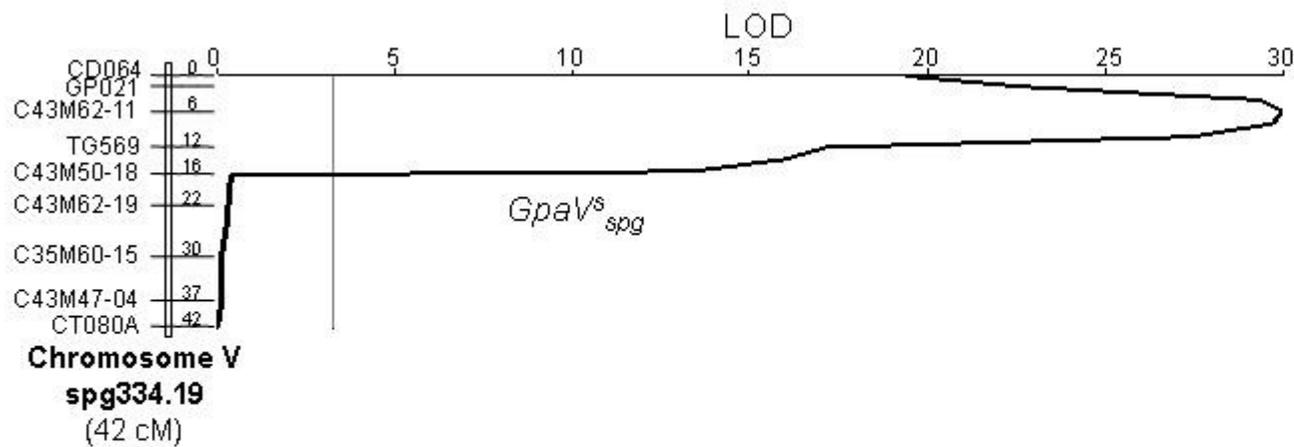


Figure 5.1 : QTL de résistance à *G. pallida* détectés par CIM dans la descendance 96D32. Le LOD score est indiqué sur l'axe des x. La distance est indiquée à droite des chromosomes en cM Kosambi. La courbe noire en trait plein correspond à la courbe de LOD des QTL de résistance. La courbe en trait pointillé sur les chromosomes VI de spg334.19 et XI de Rosa H1 correspond à la courbe de LOD des QTL de poids de racines. La ligne verticale en trait pointillé correspond au LOD score seuil utilisé pour la détection de QTL de résistance.

5.3 Compléments à l'article

Depuis la publication de l'article, les cartes génétiques de Rosa H1 et de spg334.19 ont été saturées (voir chapitre 3.2.1). Une nouvelle recherche de QTL de résistance à *G. pallida* a été effectuée par Composite Interval Mapping (Zeng 1993, 1994) sur un fichier de données intégrant les marqueurs des cartes trames des deux parents. Les 24 chromosomes (12 de Rosa H1, 12 de spg334.19) ont été scannés en prenant en cofacteur l'effet des 5 marqueurs les plus explicatifs du caractère, détectés par régression multiple. Un LOD score seuil de 3,2 a été déterminé après 1000 permutations, correspondant à un risque α de 0,05. Cette analyse apporte des résultats nouveaux par rapport à ceux décrits dans l'article paru en 2003.

5.3.1 Résultats

5.3.1.1 Recherche de QTL de résistance à *G. pallida*

Cinq QTL de résistance à *G. pallida* ont été détectés sur les chromosomes V, VI, et XII de spg334.19, et sur les chromosomes VIII et XI de Rosa H1. Une nomenclature plus informative a été adoptée pour les noms des QTL : les QTL originaires de spg334.19, initialement nommés *GpaM1*, *GpaM2*, et *GpaM3* dans l'article ont été renommés *GpaV^s_{spg}*, *GpaVI^l_{spg}*, et *GpaXII_{spg}*. Les deux QTL originaires de Rosa H1 ont été nommés *GpaVIII_{ibr}* et *GpaXI^l_{ibr}*. Le tableau 5.1 donne leurs principales caractéristiques et leur position est illustrée sur la figure 5.1. Dans un souci d'homogénéité avec les cartes des autres Solanacées, le chromosome XI de Rosa H1 a été orienté dans le sens opposé (bras long en haut et bras court en bas) à celui qu'il devrait avoir selon les études cytologiques les plus récentes (Dong et al. 2000). Le R² global des 5 QTL, estimé par une analyse de variance à 5 facteurs, est de 82 %.

Une recherche d'épistasie a détecté trois interactions significatives à un seuil de 10⁻⁴ entre des zones chromosomiques de Rosa H1. Leur probabilité, leur effet et la moyenne de chaque classe allélique pour le Log₁₀(nombre de kyste + 1), sont mentionnés dans le tableau 5.2. Bien que les R² individuels de ces épistasies soient compris entre 14,5 et 15,5 %, lorsque nous les avons intégrées dans un modèle d'analyse de variance comprenant également les marqueurs des QTL à effet additif, elles n'étaient plus significatives à un seuil de 5 %. Le R² global des cinq QTL à effet additif et des trois épistasies n'est pas supérieur au R² global des cinq QTL à

Tableau 5.1. Caractéristiques des QTL de résistance détectés dans la descendance 96D32, issue du croisement Rosa H1 x spg334.19. Le LOD score et le R² sont issus de l'analyse par Composite Interval Mapping. L'intervalle de confiance a été déterminé à partir de la courbe de LOD obtenue par simple Interval Mapping.

Nom du QTL	Chromosome	Parent d'origine	LOD score	R ²	Intervalle de confiance
<i>GpaV^s_{spg}</i>	V	spg334.19	30,0	48 %	4 cM
<i>GpaVI^l_{spg}</i>	VI	spg334.19	7,1	8,3 %	31 cM
<i>GpaXII_{spg}</i>	XII	spg334.19	9,7	9,8 %	48 cM
<i>GpaVIII_{ibr}</i>	VIII	Rosa H1	9,9	10,8 %	-
<i>GpaXI^l_{ibr}</i>	XI	Rosa H1	4,4	3,9 %	-

Tableau 5.2. Epistasies affectant le Log(nombre de kyste + 1), détectées entre des zones génomiques de Rosa H1 avec un seuil de 10⁻⁴. Les quatre phases alléliques ont été codées m11, m21, m12, m22. Le premier chiffre correspond aux allèles du premier marqueur impliqué dans l'interaction, le second chiffre correspond aux allèles du second marqueur.

Chromosomes		Marqueurs		Probabilités	R ² %	Phases alléliques aux deux marqueurs			
						m11	m21	m12	m22
I	VII	C43M62-18	CT032	4,54. 10 ⁻⁵	14,6	0,971	1,376	1,497	0,746
V	VI	CT225-2	TG221	8,15. 10 ⁻⁵	14,8	0,760	1,283	1,481	0,860
VIII	X	C35M48-A	E32M49-11	3.14. 10 ⁻⁵	15,3	1,363	1,028	0,801	1,582

effet additif seuls. Cela peut être dû à la puissance de notre dispositif expérimental, qui ne permet d'estimer avec précision l'effet des QTL épistatiques. Thabuis et al. (2004b) ont montré que l'effet des QTL épistatiques, détectés dans un dispositif expérimental comprenant un effectif de plantes peu important, étaient souvent surestimés.

5.3.1.2 Recherche de QTL de poids du système racinaire

Le nombre de kystes de nématode néoformés dans une plante sensible est fonction du développement du système racinaire. Le développement du système racinaire des clones de la descendance 96D32 (Rosa H1 x spg334.19) a été évalué par une mesure du poids sec des racines dans trois répétitions. L'héritabilité au sens large de ce caractère a été estimée à 53 %. Une représentation graphique exprimant le logarithme du nombre de kystes néoformés en fonction du poids sec de racine pour l'ensemble des clones de la descendance (Rosa H1 x spg334.19) ne montre pas de corrélation entre les 2 caractères (figure 5.2), indiquant que la mesure de la résistance globale n'est pas influencée par le développement du système racinaire. Des QTL de poids du système racinaire ont été recherchés par CIM dans la descendance 96D32 sur le fichier de cartographie intégrant les cartes des deux parents. Un test effectué avec 1000 permutations a défini un LOD seuil de 3,35 avec un risque α de 0,05. En utilisant ce seuil, deux QTL, nommés $rwII_{spg}^f$ et $rwIV_{ibr}$ (rw pour "root weight") ont été détectés, un sur le chromosome II de spg334.19, et un sur le chromosome IV de Rosa H1. Ces deux QTL expliquent 13,2 % de la variation du caractère. Trois QTL, détectés avec un LOD score inférieur au seuil choisi, montrent également un effet significatif sur le poids sec de racines par analyse de variance. La courbe de LOD des cinq QTL affectant le poids sec de racine est illustrée sur la figure 5.3, et leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau 5.3. Le R^2 global expliqué, par une analyse de variance à cinq facteurs, par les cinq marqueurs les plus proches du pic de la courbe de LOD des cinq QTL affectant le poids sec de racine, est de 32,4 %.

Le QTL $rwVI_{spg}^l$, localisé sur le chromosome VI de spg334.19 explique 9,2 % de la variation du caractère et $rwXI_{ibr}^l$ localisé sur le chromosome XI de Rosa H1 explique 7,2 % de la variation du caractère. La courbe de LOD des QTL de poids du système racinaire situés sur les mêmes chromosomes que les QTL de résistance à *G. pallida* est représentée sur la figure 1. Les courbes de LOD du QTL de résistance à *G. pallida* $GpaVI_{spg}^l$ et du QTL de poids du système racinaire $rwVI_{spg}^l$, localisées sur le chromosome VI de spg334.19, sont

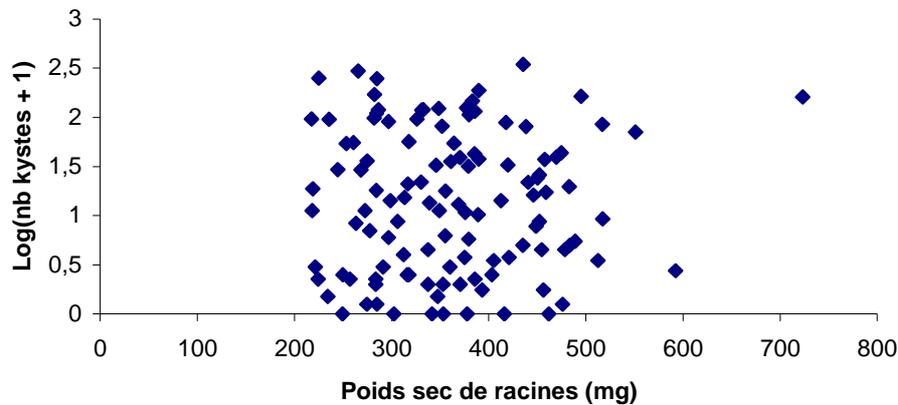


Figure 5.2 : Représentation du critère de résistance en fonction du développement racinaire dans les clones de la descendance 96D32 issue du croisement de Rosa H1 x spg334.19.

Tableau 5.3. Caractéristique des QTL de poids du système racinaire détectés dans la descendance 96D32, issue du croisement Rosa H1 x spg334.19. Le LOD score et le R² sont issus de l'analyse par Composite Interval Mapping.

Nom	Parent d'origine	Chromosome	LOD score	R ²
<i>rwII^s_{spg}</i>	spg334.19	II	4,89	12,5 %
<i>rwIV^l_{spg}</i>	spg334.19	IV	3,19	8,3 %
<i>rwVI^l_{spg}</i>	spg334.19	VI	2,56	9,2 %
<i>rwIV^l_{ibr}</i>	Rosa H1	IV	3,70	11,1 %
<i>rwXI^l_{ibr}</i>	Rosa H1	XI	2,84	7,2 %

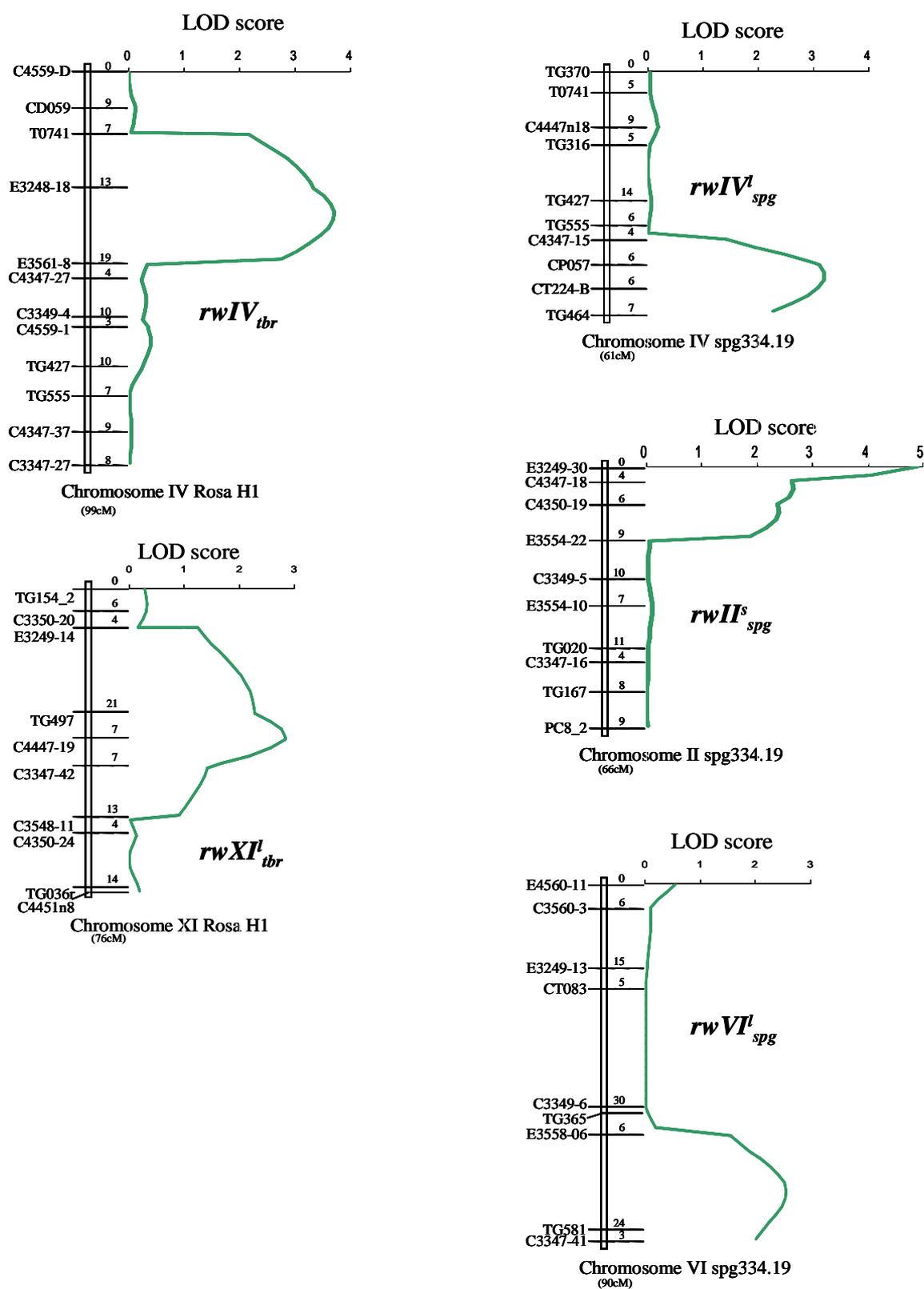


Figure 5.3 : QTL de poids du système racinaire, détectés par CIM dans la descendance 96D32 (Rosa H1 x spg334.19). Le LOD score est donné sur l'axe des x. Les distances sont indiquées à droite des chromosomes en cM Kosambi.

superposées avec des amplitudes différentes. Les courbes de LOD du QTL de résistance à *G. pallida* $GpaXI_{ibr}^I$ et du QTL de poids du système racinaire $rwXI_{ibr}^I$, localisés sur le chromosome XI de Rosa H1, sont chevauchantes. Leur pic est décalé de 30 cM.

5.3.1.3 Effet des QTL de résistance sur le cycle de développement de *G. pallida*

Huit clones de la descendance 96D32 et le parent sensible Rosa H1 ont été choisis en fonction de leurs allèles aux trois QTL de résistance détectés sur le génome de spg334.19. Ce choix a été fait avant la mise en évidence des QTL de résistance sur le génome de Rosa H1 (figure 5.4).

Une analyse de variance a montré un effet hautement significatif du clone sur le stade de développement de *G. pallida* ($P < 2,2 \cdot 10^{-16}$, $R = 28,8 \%$). Les pourcentages de nématodes retrouvés à chaque stade de développement pour les neuf clones étudiés sont illustrés sur la figure 5.4. Les différences entre clones pour le nombre de nématodes retrouvés à chaque stade de développement (J2/J3 non développés, mâles ou femelles) ont été analysées par un test $2\hat{I}$ (Arbonnier 1966). Le clone 96D32.115 ne possède aucun des allèles de résistance aux QTL originaires de spg334.19 mais il possède les allèles de résistance à au moins un des QTL de Rosa H1 ($GpaVIII_{ibr}$, il est recombinant entre les marqueurs flanquant $GpaXI_{ibr}^I$). Pourtant le clone 96D32.115 a un effet significativement supérieur à Rosa H1 sur un des critères de résistance : dans les racines de Rosa H1, 90 % des nématodes arrivent à se développer en femelle, alors qu'ils ne sont que 60 % à y parvenir dans les racines du clone 96D32.115. La différence entre les deux clones pour le nombre de nématodes restant bloqués aux stades juvéniles n'est pas significative. En revanche le nombre de nématodes se développant en mâle est significativement plus important dans les racines du clone 96D32.115 que dans celles de Rosa H1. Le clone 96D32.115 est différent de Rosa H1 sur 50 % de son génome. Les différences observées entre les deux clones sur la masculinisation des nématodes peuvent être attribuées au fonds génétique ou à l'interaction QTL-fonds génétique. Il semblerait donc qu'il y ait un effet favorable du fonds génétique du clone 96D32.115 sur la diminution du nombre de femelles.

Les quatre clones possédant l'allèle de résistance au QTL à effet fort $GpaV_{spg}^s$ montrent un effet significativement différent par rapport aux clones possédant l'allèle de sensibilité à ce QTL, sur l'inversion du sexe-ratio en faveur des mâles. Dans les racines de ces 4 clones, plus de 77 % des nématodes se sont développés en mâle contre 7,86 % dans les racines du parent

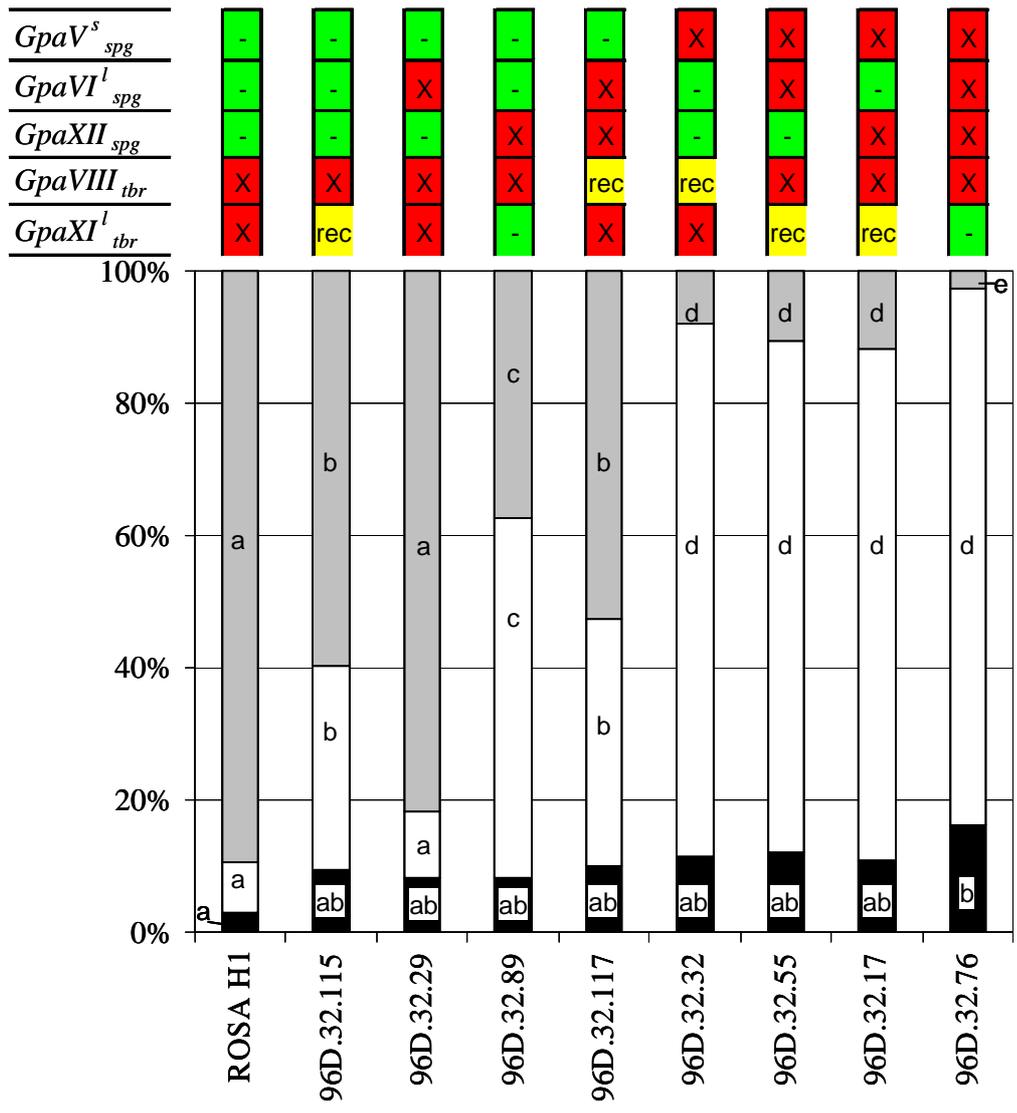


Figure 5.4 : Pourcentage de nématodes retrouvés aux stades J2/J3 non développé, mâle ou femelles, dans 20 racines de clones de pomme de terre possédant différentes combinaisons d'allèles aux QTL *GpaV*^{s_{spg}}, *GpaVI*^{l_{spg}}, *GpaXII*_{spg}, *GpaVIII*_{tbr}, et *GpaXI*^{l_{tbr}}, originaires de spg334.19 et Rosa H1. Pour chaque stade de développement, différentes lettres indiquent les différences significatives entre clones, calculées par un test 2 \hat{I} .

- Pourcentage de nématodes retrouvés au stade J2/J3 non développé
- Pourcentage de nématodes retrouvés au stade mâle
- Pourcentage de nématodes retrouvés au stade femelle
- = allèles de résistance au QTL
- = allèles de sensibilité au QTL
- = recombinaison entre les marqueurs flanquant le QTL

sensible Rosa H1. Le clone 96D32.76 qui possède les allèles de résistance aux trois QTL originaires de spg334.19 et à *GpaVIII_{ibr}*, permet le développement d'un nombre significativement plus faible de femelles (2,69 %) que les huit autres clones. Il a également un effet sur le blocage aux stades juvéniles significativement différent du parent sensible Rosa H1, mais n'est pas significativement différent des autres clones 96D32 pour ce caractère.

5.3.2 Discussion

Le R² global des 5 QTL de résistance à *G. pallida* détectés dans cette étude (82 % contre 72 % pour les 3 QTL de spg334.19 décrits dans l'article) est proche de l'héritabilité au sens large (97 %), indiquant l'essentiel de la variation génétique est expliquée par ces cinq QTL. C'est la première fois qu'autant de QTL sont mis en évidence lors de l'analyse d'une résistance aux nématodes à kyste (Bradshaw et al. 1998, Bryan et al. 2002, Kreike et al. 1993, Kreike et al. 1994, Kreike et al. 1996, Rouppe van der Voort et al. 1998, Rouppe van der Voort et al. 2000). Le nombre relativement important de QTL à effet faible que nous avons détecté explique que, bien que *S. spegazzinii* soit utilisé dans les schémas de sélection depuis plusieurs décennies (Ross 1986), aucun cultivar actuel ne possède de haut niveau de résistance provenant de cette espèce (Didier Mugniéry et Ronald Hutten, communication personnelle). Dans un autre pathosystème, Thabuis et al. (2004a) ont démontré que le nombre de QTL retenus par la sélection phénotypique dépend de la pression de sélection. En appliquant toujours la même pression à chaque cycle de sélection, les QTL à effet faible ont un fort risque d'être perdus car leur effet est masqué par les QTL à effet fort.

L'analyse de l'effet des QTL de résistance sur le cycle de développement de *G. pallida* a montré un fort effet du QTL à effet fort *GpaV^s_{spg}* sur la masculinisation de ce nématode. L'effet de blocage aux stades juvéniles associé à une nécrose, observés dans le clone ayant les 2 QTL originaires de *S. sparsipilum*, n'est pas retrouvé dans le cas de la résistance originaire de *S. spegazzinii*.

Lors de la première recherche de QTL pour la résistance à *G. pallida*, dont les résultats sont présentés dans l'article, les deux QTL provenant de Rosa H1 n'avaient pas été détectés et l'effet individuel des QTL de spg334.19 avait été considérablement surestimé. La somme des R² des cinq QTL (80,8 %), détecté par CIM sur le fichier intégrant les cartes des deux parents, est très proche du R² global estimé par l'analyse de variance à 5 facteurs (82 %), alors que la

somme des R^2 des trois QTL de spg334.19, détectés par CIM sur les cartes séparées des deux parents, était supérieure à 100 % (60 % + 24 % + 20 %, résultats non présentés dans l'article). Ces résultats démontrent qu'il est nécessaire de prendre en compte l'ensemble des facteurs génétiques expliquant la variation du caractère pour avoir une bonne estimation individuelle de leurs effets propres. Pour cela, l'analyse QTL par CIM, réalisée conjointement sur les données de marquage des deux parents, donne des résultats beaucoup plus précis que l'analyse QTL réalisée par simple Interval Mapping ou que l'analyse par CIM réalisée séparément sur la carte de chaque parent.

Le développement des nématodes en femelle est dépendant de la taille du système racinaire de la plante hôte. Dans une plante sensible, plus le système racinaire est important, plus le nombre de nématodes pouvant se développer en femelle est grand. Des QTL de poids du système racinaire colocalisent avec des QTL de résistance à effet faible, $GpaVI_{spg}^I$, sur le chromosome VI de spg334.19, et $GpaXI_{ibr}^I$ sur le chromosome XI de Rosa H1. Un QTL affectant le développement racinaire, originaire de *S. spegazzinii*, a été cartographié précédemment sur le chromosome VI (Kreike et al. 1996). Lors de l'évaluation de l'effet des QTL de résistance sur le cycle de développement de *G. pallida*, aucun effet significatif n'a pu être montré pour $GpaVI_{spg}^I$. Ces différents arguments suggèrent que $GpaVI_{spg}^I$ n'est pas directement impliqué dans un mécanisme de résistance, mais serait dû à l'influence du développement racinaire sur les résultats du test de résistance. Il est cependant difficile d'expliquer pourquoi les QTL qui ont le plus fort effet sur le développement racinaire (sur le chromosome II de spg334.19 et sur le chromosome IV de Rosa H1) ne colocalisent pas avec des QTL de résistance. Cela peut être dû à une mauvaise estimation des effets des QTL de poids du système racinaire, due à la faible part de la variation expliquée par les QTL détectés (R^2 global = 32,4 %).

C'est la première fois que des QTL de résistance à *G. pallida* originaire de *S. tuberosum* sont détectés. La variété tétraploïde Rosa, de laquelle a été extrait le clone dihaploïde Rosa H1, est cultivée en France depuis le début du XX^{ème} siècle au minimum et a été inscrite au catalogue des variétés de pomme de terre en 1935, date de la création du catalogue. Bien que sa généalogie ne soit pas connue, il est peu probable qu'elle ait des espèces sauvages dans son ascendance, car les espèces sauvages n'ont été intégrées dans les programmes de sélection qu'au début du XX^{ème} siècle pour la résistance au mildiou (Rousselle-Bourgeois 1996). Nos

résultats indiquent que des QTL de résistance à *G. pallida* sont présents dans le fonds génétique des variétés actuelles de *S. tuberosum* et peuvent être exploités en sélection.

GpaVIII_{tbr} est localisé au centre du chromosome VIII. Le gène *Ns* (Marczewski et al. 2002), conférant la résistance au virus S de la pomme de terre, et un QTL de résistance à *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* ont été cartographiés dans cette zone génomique (Zimnoch-Guzowska et al. 2000). *GpaXI^t_{tbr}* est localisé dans un cluster de gènes de résistance situé sur le bras long du chromosome XI. Des gènes et des QTL de résistance à des virus, bactéries, champignons, Oomycètes et nématodes à galles y ont été cartographiés (pour revue, voir Gebhardt and Valkonen 2001). Un QTL de résistance à *G. pallida*, originaire de *S. tarijense* (*Gpa3*) a également été cartographié dans cette zone génomique (E. Ritter, communication personnelle). Plusieurs homologues du gène *N*, conférant la résistance au Tobacco Mosaic Virus chez le tabac, ont été cartographiés dans ce cluster (Hamalainen et al. 1998, Leister et al. 1996). Le gène *N* fait partie de la famille des gènes de résistance de type TIR-NBS-LRR (Whitham et al. 1994). Il est possible que *GpaXI^t_{tbr}* appartienne également à la classe des gènes de résistance de type TIR-NBS-LRR.

Chapitre 6

Agressivité

6 Niveau d'agressivité de populations de *G. pallida* sur des clones portant les QTL détectés chez *S. sparsipilum*, *S. spegazzinii*, et *S. tuberosum*

Les résistances polygéniques, encore qualifiées de résistances horizontales, sont supposées ne pas être race ou pathotype-spécifiques et avoir un large spectre d'action (Flor 1971, Lindhout 2002, Parlevliet 2002). Nous avons étudié la résistance conférée par les QTL ou des combinaisons de QTL détectés chez *S. sparsipilum*, *S. spegazzinii*, et *S. tuberosum* (chapitres 5 et 6) face à une population néo-zélandaise de *G. pallida* et sept populations provenant de différents pays d'Europe. Dix kystes de *G. pallida* sont inoculés dans chaque pot où est planté un tubercule. Les plantes sont cultivées pendant trois mois en serre. Quatre répétitions de chaque génotype ont été testés avec les huit populations de *G. pallida*.

6.1 Résultats

6.1.1 Niveau de résistance conféré par les QTL originaires de *S. sparsipilum*

Le niveau de résistance conféré par les combinaisons alléliques aux QTL, à huit populations de *G. pallida*, a été étudié sur neuf clones issus du croisement entre Caspar H3 et spl329.18, et sur une variété témoin sensible tétraploïde, nommée Désirée.

Les nombres de kystes néoformés par plante ont été transformés par une fonction logarithmique pour la suite des analyses ($\text{Logkyste} = \text{Log}_{10}(\text{nombre de kystes} + 1)$). L'effet des différents facteurs influençant la variable "Logkyste" a été estimé par analyse de variance. L'effet de la population de *G. pallida* sur la variable Logkyste est hautement significatif ($p < 2,2 \cdot 10^{-16}$). De même, l'effet de la combinaison allélique aux QTL sur la variable Logkyste est hautement significatif ($p < 2,2 \cdot 10^{-16}$) et on constate une interaction hautement significative entre la combinaison allélique aux QTL et la population de *G. pallida* pour la variable Logkyste ($p = 4 \cdot 10^{-8}$). Les différents clones possédant les mêmes combinaisons alléliques aux QTL ne montrent pas le même niveau de résistance, ce qui révèle un effet du

Tableau 6.1 : Niveau d'agressivité de 8 populations de *G. pallida* sur des clones possédant les différentes combinaisons alléliques aux QTL détectés sur le génome de spl329.18. Les valeurs correspondent au nombre moyen de kystes par plante.

Allèles de résistance aux QTL	Pukekoé	Lufness	Perpignan	chavornay	Audierne	G. East Craig	Rookmaker	Duddingston
Aucun	166	323	235	670	621	349	286	328
<i>GpaXI^s_{spl}</i>	18,33	24,50	69,25	66,92	63,75	89,63	88,25	49,75
<i>GpaV^s_{spl}</i>	1,83	1,92	5,42	8,67	14,38	17,33	24,33	50,50
<i>GpaV^s_{spl}</i> et <i>GpaXI^s_{spl}</i>	0,00	0,38	0,88	3,25	1,13	3,00	3,75	3,75

fonds génétique sur le nombre de kystes néoformés. Ainsi, l'effet du clone sur la variable Logkyste, en prenant en compte l'effet du QTL, est hautement significatif ($p = 1,6 \cdot 10^{-6}$). Néanmoins, l'effet de la combinaison allélique aux QTL est nettement supérieur à l'effet du clone sachant la combinaison allélique aux QTL, indiquant que les QTL ont un effet plus fort que le fonds génétique sur la résistance.

Pour chaque combinaison d'allèles aux QTL, l'effet de la population de *G. pallida* a été estimé par analyse de variance. Cet effet est significatif pour les quatre combinaisons d'allèles aux QTL (aucun allèle de résistance : $p = 3 \cdot 10^{-3}$; allèle de résistance à *GpaXI^s_{spl}* : $p = 7,2 \cdot 10^{-6}$; allèle de résistance à *GpaV^s_{spl}* : $p = 1,4 \cdot 10^{-15}$; allèles de résistance aux deux QTL : $p = 4 \cdot 10^{-4}$). Lorsque l'on compare les deux clones sensibles, 96D31.69 et Désirée, l'effet du clone sur le niveau de multiplication des nématodes est significatif ($p = 0.005$), révélant une multiplication plus importante sur le clone tétraploïde Désirée que sur le clone diploïde. Cette différence de niveau de multiplication entre clones tétraploïdes et diploïdes est fréquemment observée (D. Mugniéry, communication personnelle). Elle peut s'expliquer par une différence de taille du système racinaire (voir chapitre 5), plus développé chez les clones tétraploïdes, ou par l'effet du fonds génétique sur la résistance.

Le niveau d'agressivité des huit populations de *G. pallida*, vis à vis de chaque combinaison d'allèles aux QTL, a été comparé par un test de comparaison de moyenne multiple de Tukey avec un risque α de 0,05. Les différences d'agressivité entre populations de *G. pallida* sont les plus marquées sur les clones possédant les allèles de résistance uniquement au QTL à effet fort *GpaV^s_{spl}*. Les populations de *G. pallida* ont été classées en fonction de leur niveau d'agressivité croissant sur les clones possédant les allèles de résistance uniquement à ce QTL (figure 6.1b, tableau 6.1). Les populations Rookmaker et surtout Duddingston sont les plus agressives et la population Pukekoé la moins agressive sur les clones possédant les allèles de résistance au QTL à effet fort *GpaV^s_{spl}*. Les huit populations de *G. pallida* ont un niveau d'agressivité plus faible sur les clones possédant les allèles de résistance à au moins un QTL que sur les clones sensibles, confirmant l'effet plus ou moins fort des QTL sur les huit populations.

Les clones possédant les allèles de sensibilité aux deux QTL ont permis le développement d'un nombre moyen de kystes par clone variant entre 165 et 670 kystes (tableau 6.1). Les clones possédant les allèles de résistance au QTL à effet faible *GpaXI^s_{spl}* uniquement ont

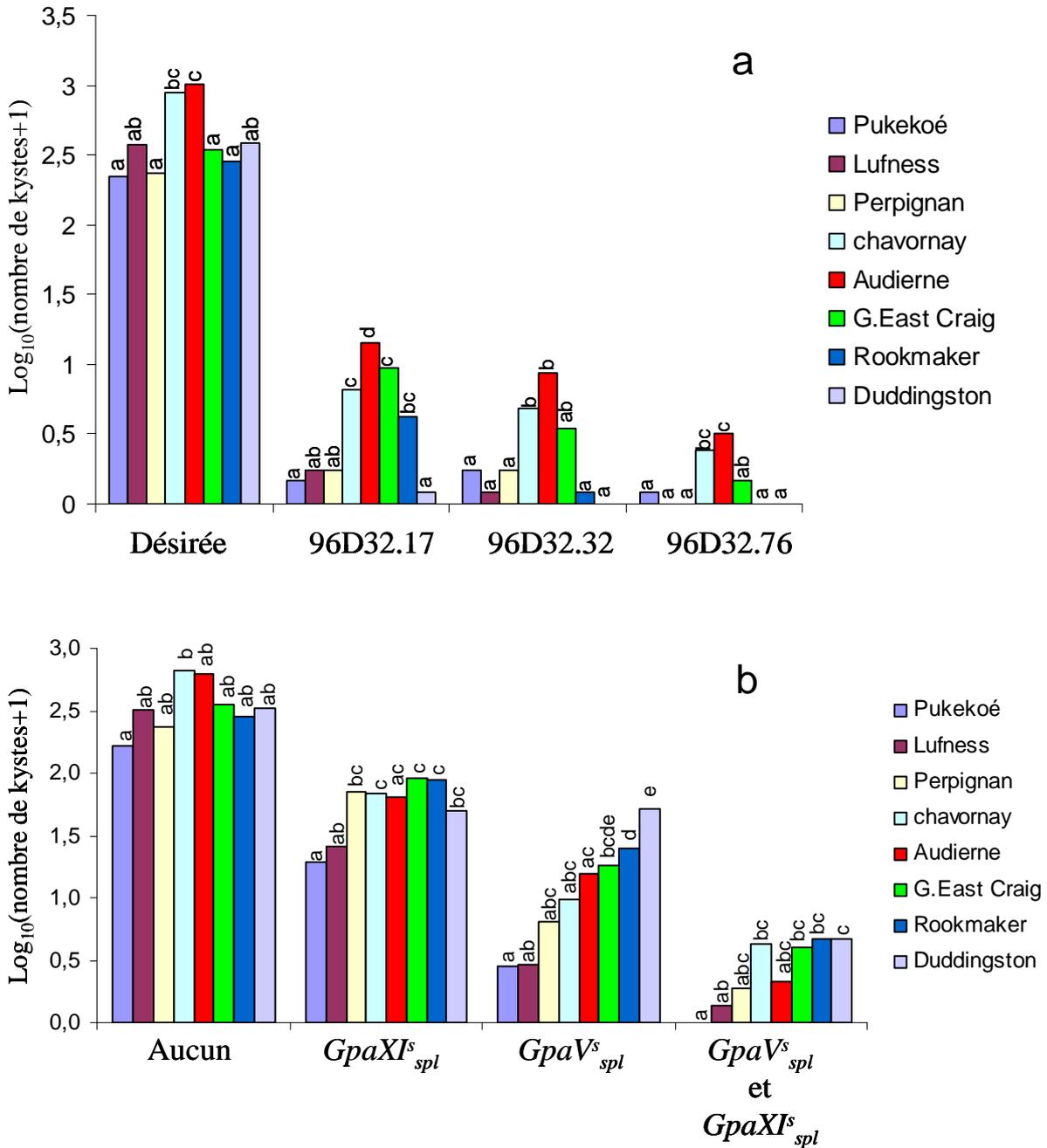


Figure 6.1 : Niveau d'agressivité de 8 populations de *G. pallida* sur des clones de pomme de terre possédant différentes combinaisons alléliques aux QTL de résistance détectés dans les descendance Rosa H1 x spg334.9 et Caspar H3 x spl329.18. Pour chaque combinaison allélique aux QTL, des lettres indiquent les différences significatives entre populations de *G. pallida*, calculées par un test de comparaison de moyennes multiple de Tukey avec un risque α de 0,05. Le niveau d'agressivité des populations de *G. pallida* est exprimé par le $\text{Log}_{10}(\text{nombre de kystes}+1)$.

a : Témoin tétraploïde sensible Désirée et trois clones de la descendance Rosa H1 x spg334.19 possédant le QTL à effet fort *GpaV^s_{spg}* et différentes combinaisons alléliques aux QTL à effet faible.

b : Moyenne des deux clones (aucun, *GpaV^s_{spl}* et *GpaXI^s_{spl}*) ou trois clones (*GpaXI^s_{spl}*, *GpaV^s_{spl}*) possédant les différentes combinaisons alléliques aux QTL originaires de spl329.18.

permis le développement d'un nombre moyen de kystes par clone variant entre 18 et 90 kystes. Les clones possédant les allèles de résistance au QTL à effet fort $GpaV_{spi}^s$ uniquement ont permis le développement d'un nombre moyen de kystes par clone variant entre 1,8 et 50,5. Les clones possédant les allèles de résistance aux deux QTL ont permis le développement d'un nombre moyen de kystes par clone variant entre 0 et 3,8. Ces résultats montrent la supériorité des clones possédant les allèles de résistance aux deux QTL pour contrôler l'agressivité des huit populations de *G. pallida* étudiées, par rapport aux clones ne possédant l'allèle de résistance qu'à un seul QTL.

6.1.2 Niveau de résistance conféré par les QTL originaires de *S. spegazzinii* et *S. tuberosum*

Dans le même test que celui décrit au chapitre précédent, le niveau de résistance conféré par différentes combinaisons alléliques aux QTL, aux huit populations de *G. pallida* a été étudié sur quatre clones issus du croisement entre Rosa H1 et spg334.19. Les analyses statistiques ont été réalisées comme décrit dans ce chapitre. Le génotype aux QTL des quatre clones et la note de résistance obtenue par ces clones face aux 8 populations de *G. pallida* testées sont indiqués dans le tableau 6.2. Les quatre clones possèdent les allèles de résistance au QTL à effet fort $GpaV_{spg}^s$, et à au moins un des QTL à effet faible. L'effet du fonds génétique n'a pas pu être testé car les quatre clones possèdent des combinaisons alléliques différentes aux cinq QTL détectés.

Les nombres de kystes néoformés par plante ont été transformés par une fonction logarithmique pour la suite des analyse ($\text{Logkyste} = \text{Log}_{10}(\text{nombre de kystes} + 1)$). L'effet des différents facteurs influençant la variable Logkyste a été estimé par analyse de variance. L'effet de la population de *G. pallida* sur la variable Logkyste est hautement significatif ($p < 2,2 \cdot 10^{-16}$). De même, l'effet du clone sur la variable Logkyste est hautement significatif ($p < 2,2 \cdot 10^{-16}$) et on constate une interaction hautement significative entre le clone et la population de *G. pallida* pour la variable Logkyste ($p = 3,8 \cdot 10^{-8}$).

Le niveau d'agressivité des huit populations de *G. pallida*, vis à vis des quatre clones de la descendance 96D32 et de la variété témoin Désirée, a été comparé par un test de comparaison de moyenne multiple de Tukey avec un risque α de 0,05. Les résultats de ce test sont illustrés sur la figure 6.1a. Le clone 96D32.82, qui possède les allèles de résistance aux QTL $GpaV_{spg}^s$,

Tableau 6.2 : Combinaisons alléliques aux QTL de résistance à *G. pallida* chez 5 clones de pomme de terre utilisés pour étudier le niveau d'agressivité de huit populations de *G. pallida*.

QTL	Désirée	96D32.17	96D32.32	96D32.76	96D32.82
<i>GpaV^s_{spg}</i>	-	X	X	X	X
<i>GpaVI^l_{spg}</i>	-	-	-	X	-
<i>GpaXII_{spg}</i>	-	X	-	X	X
<i>GpaVIII_{tbr}</i>	-	X	REC	X	-
<i>GpaXI^l_{tbr}</i>	-	REC	X	-	X

-

= allèle de sensibilité au QTL

X

= allèle de résistance au QTL

REC

= recombinaison entre les marqueurs flanquant le QTL

Tableau 6.3 : Niveau d'agressivité de 8 populations de *G. pallida* sur des clones possédant des combinaisons alléliques différentes aux QTL détectés sur les génomes de Rosa H1 et spg334.19. Les valeurs correspondent au nombre de kystes moyen par plante

Clone	Pukekoé	Lufness	Perpignan	chavornay	Audierne	G.East Craig	Rookmaker	Duddingston
Désirée	222	372	235	895	1040	349	286	390
96D. 32. 17	0,50	0,75	0,75	5,75	13,75	8,75	3,25	0,25
96D. 32. 32	0,75	0,25	0,75	4,00	7,75	2,50	0,25	0,00
96D. 32. 76	0,25	0,00	0,00	1,50	2,25	0,50	0,00	0,00
96D. 32. 82	0,75	0,00	0,50	3,00	0,75	0,25	0,00	0,25

GpaXII_{spg}, et *GpaXI^l_{tbr}*, ne montre pas de différences significatives entre les populations. Il n'a pas été représenté sur la figure 6.1. Pour les trois autres clones, nous ne constatons pas de classification différente des populations de *G. pallida* selon les clones. Les populations Chavornay et surtout Audierne sont les plus agressives quelque soit le clone testé. Les populations Duddingston, Lufness, Perpignan, et Pukekoé sont les moins agressives quelque soit le clone testé. La classification des huit populations de *G. pallida*, par niveau d'agressivité croissant, est différente de celle qui avait été établie sur les clones possédant les différentes combinaisons alléliques aux QTL originaires de spl329.18.

Sur le témoin tétraploïde sensible Désirée, les huit populations ont développé entre 222 et 1040 kystes en moyenne (tableau 6.3). Sur le clone 96D32.17, qui possède les allèles de résistance aux QTL *GpaV^s_{spg}*, *GpaXII_{spg}*, *GpaVIII_{tbr}*, et est recombinant pour le QTL *GpaXI^l_{tbr}*, les huit populations ont développé entre 0,25 et 13,75 kystes en moyenne. Sur le clone 96D32.32, qui possède les allèles de résistance aux QTL *GpaV^s_{spg}*, *GpaXI^l_{tbr}*, et est recombinant pour le QTL *GpaVIII_{tbr}*, les huit populations ont développé entre 0 et 7,75 kystes en moyenne. Sur le clone 96D32.76, qui possède les allèles de résistance aux QTL *GpaV^s_{spg}*, *GpaVI^l_{spg}*, *GpaXII_{spg}*, et *GpaVIII_{tbr}*, les huit populations ont développé entre 0 et 2,25 kystes en moyenne. Sur le clone 96D32.82, qui possède les allèles de résistance aux QTL *GpaV^s_{spg}*, *GpaXII_{spg}*, et *GpaXI^l_{tbr}*, les huit populations ont développé entre 0 et 3 kystes en moyenne.

6.2 Discussion

L'effectif important (239 clones) de la descendance issue du croisement entre Caspar H3 et spl329.18, et le faible nombre de QTL de résistance détectés dans cette descendance (deux QTL), ont permis de choisir plusieurs clones possédant les différentes combinaisons alléliques aux QTL. En revanche, dans la descendance 96D32, issue du croisement entre Rosa H1 et spg334.19, l'effectif est plus faible (117 clones), le nombre de QTL impliqués dans la résistance est plus important (cinq QTL), et l'intervalle de confiance de certains QTL à effet faible couvre une distance supérieure à un bras de chromosome. Cet état de fait ne nous a pas permis de choisir des clones possédant les allèles de résistance uniquement à un QTL, ni d'étudier toutes les combinaisons alléliques aux QTL. La descendance 96D32 sert de support à la cartographie de QTL de résistance à d'autres bioagresseurs et à la cartographie de QTL de caractères impliqués dans la qualité du tubercule. Son faible effectif est un facteur limitant pour toutes ces analyses et il est prévu de l'augmenter, ainsi que cela a été fait pour la

descendance issue du croisement entre Caspar H3 et spl329.18. Une nouvelle détection de QTL de résistance à *G. pallida*, sur un effectif de clones plus important, devrait nous permettre de choisir ensuite des clones possédant les différentes combinaisons alléliques aux QTL.

L'étude de plusieurs clones, originaires de spl329.18, possédant les mêmes combinaisons d'allèles aux QTL de résistance, à *G. pallida*, a montré un effet significatif du clone pour chaque combinaison allélique. Les QTL de résistance ont été détectés avec une seule population (Chavornay), et l'effet significatif du clone au sein de chaque combinaison allélique suggère la présence, dans le fonds génétique des clones étudiés, de facteurs génétiques de résistance à effet faible, spécifiques d'autres populations que Chavornay. Cette analyse démontre qu'on ne peut pas généraliser les résultats d'analyses QTL, obtenus avec une population de *G. pallida*, à l'ensemble des populations de cette espèce. Cette constatation va dans le même sens que ce qu'ont décrit Rouppe van der Voort et al. (2000). Lors d'une analyse QTL réalisée avec deux populations différentes de *G. pallida*, les auteurs ont démontré que le QTL à effet faible *Gpa6*, originaire de *S. vernei* et localisé sur le chromosome IX, n'avait aucun effet sur une population de *G. pallida* faiblement agressive (Pa₂-D383) alors qu'il avait un effet significatif sur la population Rookmaker.

Les clones possédant les allèles de résistance uniquement au QTL à effet fort *GpaV^s_{spl}*, développent une réaction de résistance face aux huit populations de *G. pallida* testées, mais ils montrent un niveau de résistance très différent selon la population. Ce QTL a une action spécifique (QTL "spécialiste") sur les différentes populations. En revanche, les clones possédant les allèles de résistance uniquement au QTL à effet faible *GpaXI^s_{spl}* ne montrent pas une résistance spécifique à l'une des populations, les populations les moins agressives sur ces clones étant également les moins agressives sur les témoins sensibles. Ce QTL pourrait être qualifié de "généraliste". Dès lors qu'un clone possède les allèles de résistance à au moins deux QTL, la résistance obtenue est de type généraliste.

Bien que des différences significatives d'agressivité entre populations aient été observées sur les clones possédant conjointement les allèles de résistance aux deux QTL *GpaV^s_{spl}* et *GpaXI^s_{spl}*, et sur les trois clones possédant les allèles de résistance à au moins deux QTL originaires spg334.19 ou de Rosa H1, les huit populations testées ont développé moins de 14 kystes par plantes sur ces clones. Ces résultats démontrent l'intérêt de cumuler plusieurs QTL

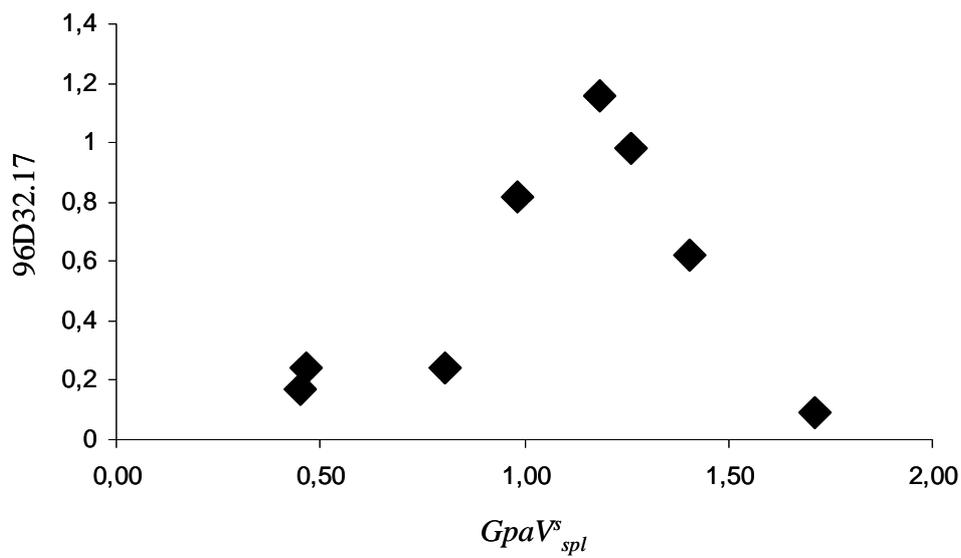


Figure 6.2 : Comparaison du niveau d'agressivité de huit populations de *G. pallida* sur trois clones possédant les allèles de résistance au QTL à effet fort $GpaV^s_{spl}$ et sur le clone 96D32.17 qui possède les allèles de résistance aux QTL $GpaV^s_{spg}$, $GpaXII_{spg}$, $GpaVIII_{ibr}$, et est recombinant pour le QTL $GpaXI^l_{ibr}$. Les échelles sont quantitatives et expriment le $\text{Log}_{10}(\text{nombre de kystes}+1)$.

pour obtenir une résistance de haut niveau et à large spectre d'action. Ils viennent renforcer les hypothèses et les observations indiquant une durabilité plus longue des résistances polygéniques par rapport à la majorité des résistances monogéniques (Lindhout 2002, Parlevliet 2002). Même face à une espèce à faible dispersion géographique comme *G pallida*, on peut supposer qu'une résistance contrôlant l'agressivité d'un grand nombre de populations sera plus durable qu'une résistance ayant un effet population spécifique.

Les populations Pukekoé et Lufness qui sont les moins agressives sur les clones possédant les allèles de résistance aux QTL originaires de *S. sparsipilum*, sont également les moins agressives sur les clones possédant les allèles de résistance aux QTL originaires de *S. spegazzinii* et *S. tuberosum*. En revanche, les populations Audierne et Chavornay qui avaient des valeurs intermédiaires sur les clones possédant les allèles de résistance aux QTL originaires de *S. sparsipilum*, sont les populations qui se développent le mieux sur les clones possédant les allèles de résistance aux QTL originaires de *S. spegazzinii* et *S. tuberosum*. La population Duddingston, qui est la plus agressive sur les clones possédant l'allèle de résistance au QTL à effet fort $GpaV^s_{spl}$, est la moins agressive sur les clones possédant les allèles de résistance aux QTL originaires de *S. spegazzinii* et *S. tuberosum*. Le classement des huit populations de *G. pallida* en fonction de leur niveau d'agressivité est différent sur les deux sources de résistance (figure 6.2). Ces résultats démontrent l'intérêt qu'il peut y avoir à cumuler des QTL originaires de plusieurs sources de résistance pour contrôler l'agressivité d'une large gamme de population de nématodes.

La population Duddingston, originaire de Grande-Bretagne, a été caractérisée comme appartenant au pathotype Pa1 car elle ne se développe pas sur les clones de pomme de terre possédant le gène *H2* originaire de *S. multidissectum* (Mugniéry et al. 1989). Sur la base d'une hypothèse d'interaction du type gène pour gène (Flor 1971) entre les gènes ou QTL de résistance et des gènes d'avirulence de *G. pallida*, nos résultats indiquent que le gène *H2* et le QTL à effet fort $GpaV^s_{spl}$ ne reconnaissent pas les mêmes gènes d'avirulence.

D. Mugniéry et son équipe de l'INRA de Rennes ont étudié des clones tétraploïdes de pomme de terre, dont la résistance était originaire de *S. vernei*, avec les huit populations que nous avons utilisées (Mugniéry et al. 1989 ; D. Mugniéry, résultats non publiés). Les huit populations se classent dans l'ordre suivant par niveau croissant d'agressivité sur les clones possédant la résistance originaire de *S. vernei* : Pukekoé, G. East Craigh, Perpignan,

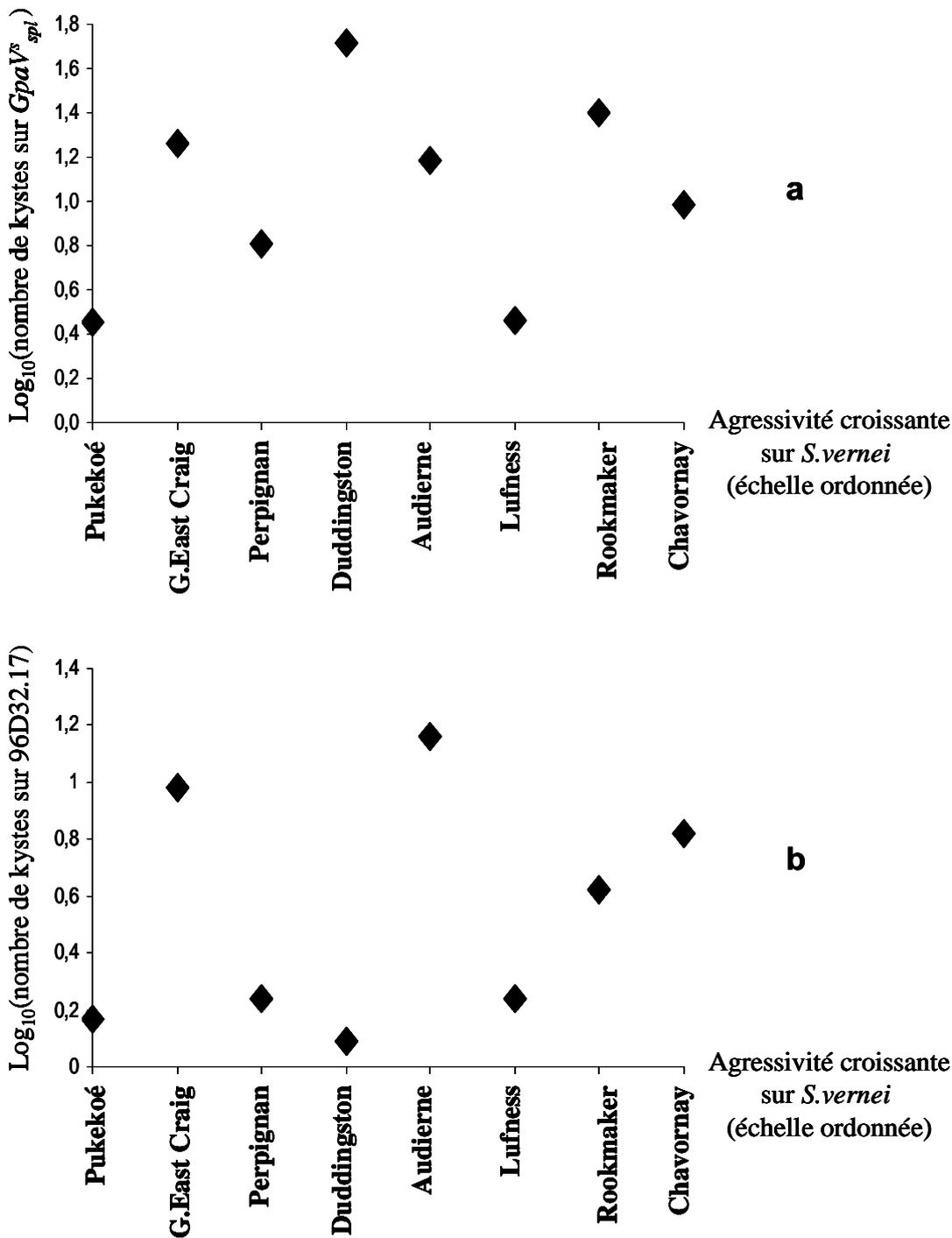


Figure 6.3 : Comparaison du niveau d'agressivité de huit populations de *G. pallida* sur des clones de pomme de terre résistants, originaires de trois espèces apparentées différentes. L'axe des y est une échelle quantitative exprimant le $\text{Log}_{10}(\text{nombre de kystes}+1)$, dénombrés sur 3 clones possédant les allèles de résistance au QTL à effet fort $GpaV^{spl}$ (**a**) ou sur le clone 96D32.17 (**b**) qui possède les allèles de résistance aux QTL $GpaV^{spg}$, $GpaXII_{spg}$, $GpaVIII_{tbr}$, et est recombinant pour le QTL $GpaXI_{tbr}$. L'axe des x est une échelle ordonnée par niveau croissant d'agressivité sur des clones résistants originaires de *S. vernei*.

Duddingston, Audierne, Lufness, Rookmaker, et Chavornay. Il est clair que la hiérarchie établie entre les populations sur ces clones, n'est pas conservée pour les clones possédant les allèles de résistance aux QTL originaires de *S. sparsipilum* et *S. spegazzinii* (figure 6.3). Cela indique l'existence de relations de spécificité entre les populations de nématode et les sources de résistance.

Actuellement, les tests de résistance pour l'inscription des variétés de pomme de terre au catalogue sont réalisés avec une seule population de *G. pallida* (Chavornay). Nos résultats démontrent la nécessité d'utiliser plusieurs populations pour déclarer une variété résistante à *G. pallida*. Les populations Chavornay (la plus agressive sur les clones dont la résistance provient de *S. vernei*), Duddingston (la plus agressive sur les clones dont la résistance provient de *S. sparsipilum*), et Audierne (la plus agressive sur les clones dont la résistance provient de *S. spegazzinii*), pourraient être choisies comme populations de référence pour les tests de résistance officiels.

La résistance originaire de *S. sparsipilum* a été intégrée dans les programmes de sélection depuis plusieurs années et est actuellement présente dans des clones tétraploïdes. Nos résultats mettent en évidence la fragilité potentielle de cette résistance, particulièrement si les allèles de résistance au QTL à effet faible $GpaXI^s_{spl}$ sont perdus au cours du programme de sélection. L'introgession en parallèle de QTL originaires de *S. spegazzinii*, ou l'utilisation d'un fonds génétique de *S. tuberosum* possédant déjà un certain niveau de résistance, permettrait d'élargir le spectre d'action et d'augmenter la durabilité du QTL à effet fort $GpaV^s_{spl}$. Dès lors qu'on introgresse une résistance originaire de *S. sparsipilum*, la population Duddingston devrait être utilisée pour les tests de résistance.

Chapitre 7

Gènes candidats

7 Gènes candidats

7.1 Introduction

La caractérisation moléculaire de gènes ou de QTL impliqués dans la variation d'un caractère d'intérêt peut être envisagée par deux approches : le clonage positionnel et la stratégie gène candidat. Dans le cas des QTL, le clonage positionnel est souvent difficile à mettre en œuvre car l'intervalle de confiance des QTL peut couvrir plusieurs dizaines voire centaines de megabases, et la stratégie gène candidat semble plus prometteuse (Pflieger et al. 2001). Un gène pourra être considéré comme candidat pour la caractérisation moléculaire d'un locus impliqué dans la résistance à un bioagresseur, s'il a une structure analogue à des gènes de résistance précédemment clonés (RGA, pour Resistance Gene Analogue) ou à des gènes impliqués dans les mécanismes de défense, s'il est exprimé différemment dans des plantes résistantes et sensibles en conditions saines et infectées, et/ou s'il coségrège avec la résistance. L'hypothèse sous-jacente est qu'il existe un polymorphisme dans le gène candidat qui peut être responsable de la variation observée dans l'expression de la résistance (Lefebvre et al. 2004). La cartographie permet de rejeter les gènes candidats qui ne coségrègent pas avec la résistance. Des RGA ont été cartographiés chez de nombreuses espèces. Dans la plupart des études, des RGA se cartographient dans des régions génomiques où des gènes ou des QTL de résistance ont déjà été localisés (Chen et al. 1998, Geffroy et al. 1998, Hamalainen et al. 1998, Kanazin et al. 1996, Leister et al. 1996, Leister et al. 1998, Pan et al. 2000, Pflieger et al. 1999).

Nous avons cartographié des homologues du gène *Gpa2* qui était, jusqu'à récemment, le seul gène de résistance aux nématodes cloné chez la pomme de terre (Van der Vossen et al. 2000).

7.2 Les gènes *Gpa2/Rx/Rx2* de la pomme de terre

Les gènes *Rx* conférant la résistance au virus X de la pomme de terre (PVX) et *Gpa2* conférant la résistance à quelques populations de *G. pallida* sont situés dans le même cluster de gènes de résistance sur le chromosome XII de la pomme de terre (Roupe van der Voort et al. 1999a). Bendahmane et al. (1999) et Van der Vossen et al. (2000) ont montré que ces deux gènes avaient une structure très similaire. Ils appartiennent à la famille CC-NBS-LRR de gènes de résistance et présentent 92 % d'identité au niveau de leur séquence en acides aminés.

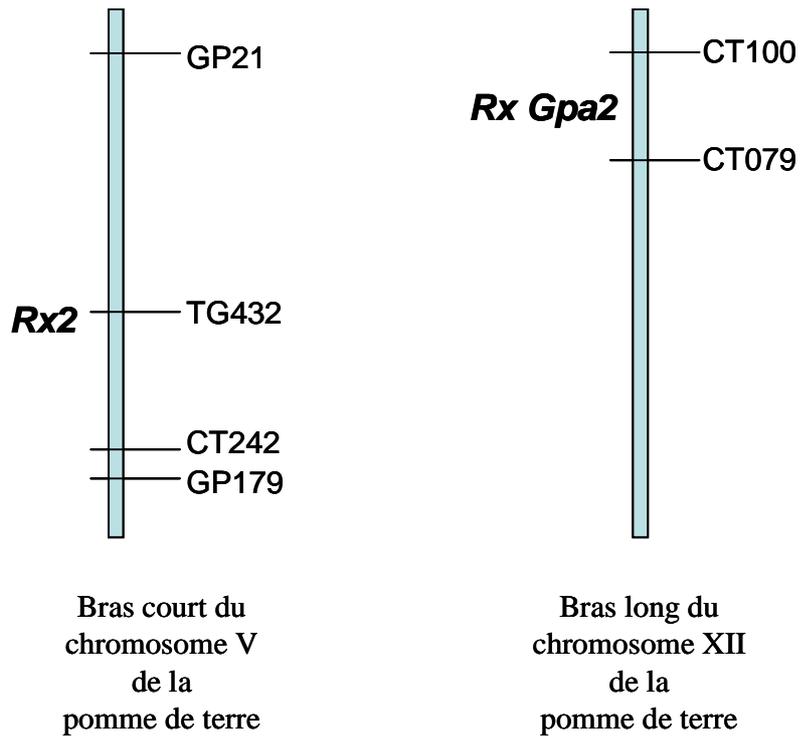


Figure 7.1 : Position des gènes *Rx2*, *Rx* et *Gpa2* sur les chromosomes V et XII de la pomme de terre. Le chromosome XII de la pomme de terre est représenté dans la même orientation que sur les cartes génétiques des autres Solanacées. Cette orientation est inversée par rapport à celle observée en cytologie (Dong et al. 2000).

Un second gène de résistance au PVX, nommé *Rx2*, a été cartographié sur le chromosome V de la pomme de terre, dans le cluster de gènes de résistance compris entre les marqueurs GP21 et GP179 (Ritter et al. 1991). La position des trois gènes sur les chromosomes est illustrée sur la figure 7.1. En définissant des amorces à partir de la séquence nucléotidique de *Rx*, Bendahmane et al. (2000) ont cloné le gène *Rx2* par PCR. *Rx2* et *Rx* présentent une identité de séquence en acides aminés de 95 %. Il est intéressant de constater que *Rx* a plus d'homologie avec *Rx2* qu'avec *Gpa2* dans le domaine LRR de la protéine qui est supposé interagir avec le gène d'avirulence du bioagresseur, alors qu'il a plus d'homologie avec *Gpa2* qu'avec *Rx2* dans le domaine NBS de la protéine, qui est supposé être impliqué dans la transduction de signaux.

La résistance à *G. pallida*, qu'elle provienne de *S. spgazzinii* ou de *S. sparsipilum*, est conférée par un QTL à effet fort situé dans le même cluster de gènes de résistance que *Rx2*, et par des QTL à effet faible situés sur d'autres chromosomes (chapitres 4 et 5). Nous avons voulu voir si des homologues de *Gpa2/Rx/Rx2* pouvaient être localisés sur nos cartes génétiques et si certains de ces homologues se cartographiaient dans le cluster de gènes de résistance du chromosome V. Nous avons utilisé un protocole décrit par Bakker et al. (2003) en redéfinissant des amorces basées sur des portions identiques du domaine LRR chez *Rx*, *Rx2*, et *Gpa2* (tableau 2.3, chapitre 2). Le marqueur AC15, qui a été défini par Bendahmane et al. (2000) pour amplifier les 700 premières paires de bases de *Rx2*, a également été amplifié sur l'ADN des génotypes des descendance 96D32 (Rosa H1 x spg334.19) et 96D31 (Caspar H3 x spl329.18).

Le nombre de fragments cartographiés avec la méthode adaptée de Bakker et al. (2003) est de 10 chez Rosa H1, 11 chez spg334.19, 14 chez Caspar H3, et 8 chez spl329.18 (figure 7.2). Chaque fragment ayant été codé en présence *versus* absence, deux allèles d'un même locus ont parfois été cartographiés comme des marqueurs différents. Le nombre d'homologues présents sur le génome de chaque parent est donc au moins égal à la moitié du nombre de fragments cartographiés. Ce nombre est proche de celui trouvé par Bakker et al. (2003) sur les génomes des deux parents de la carte UHD de la pomme de terre (6 homologues chez SH et 6 homologues chez RH). Les nombres d'homologues différents selon les génotypes peuvent s'expliquer, soit par l'absence de ségrégation à certains locus dans nos descendance, soit par l'évolution rapide des clusters de gènes de résistance de type NBS-LRR, impliquant des duplications et des recombinaisons asymétriques (Michelmore and Meyers 1998).

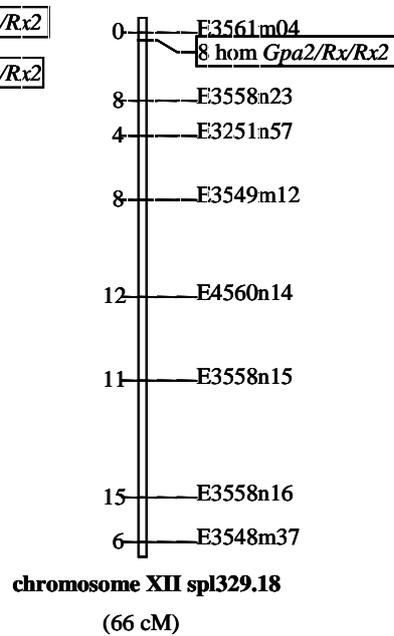
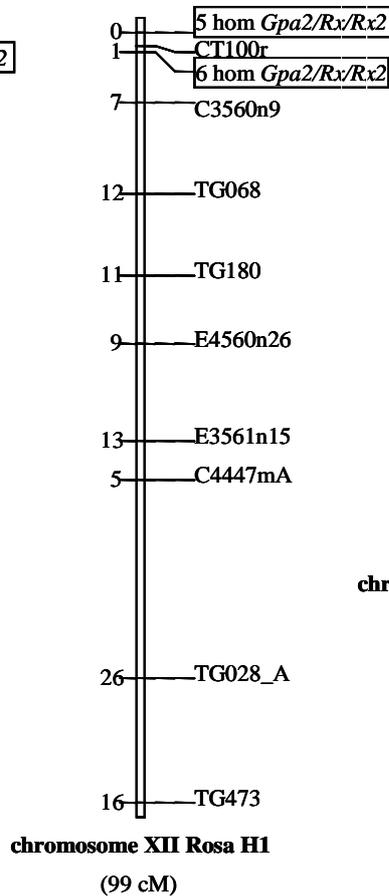
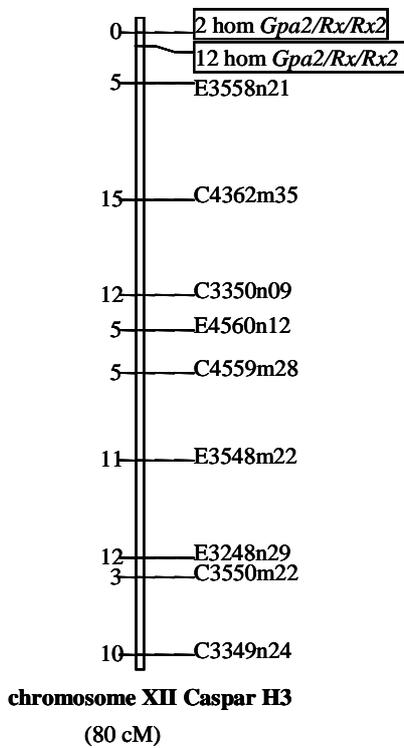
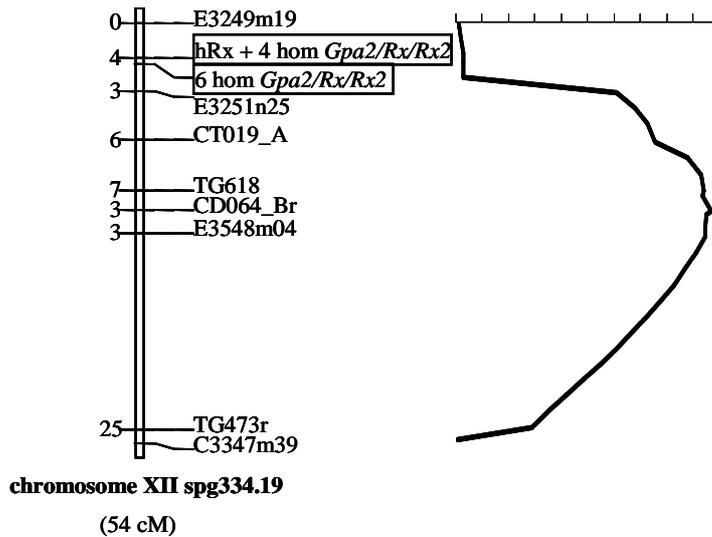


Figure 7.2 : Localisation des homologues des gènes *Gpa2*, *Rx*, et *Rx2* sur les cartes génétiques de Caspar H3, Rosa H1, spl329.18, et spg334.19. La courbe de LOD du QTL *GpaXII_{spg}*, détecté par CIM, est représentée à côté du chromosome XII de spg334.19. Les nombres d'homologues qui coségrègent sont indiqués dans les rectangles sur les cartes génétiques. Les distances sont données en cM Kosambi. Les chromosomes XII de pomme de terre sont représentés dans la même orientation que sur les cartes génétiques des autres Solanacées. Cette orientation est inversée par rapport à celle observée en cytologie (Dong et al. 2000).

Tous les homologues de *Gpa2/Rx/Rx2* se cartographient sur le chromosome XII dans un intervalle compris entre 0 et 2,5 cM selon les cartes génétiques des parents de nos descendances (figure 7.2). Le fragment amplifié avec le marqueur AC15, se cartographie également sur le chromosome XII. Étonnamment, aucun homologue de *Gpa2/Rx/Rx2* ne se cartographie sur les chromosomes V de Rosa H1, Caspar H3, spg334.19, ou spl329.18, alors que nous nous attendions à ce que les amorces de *Gpa2/Rx/Rx2*, ainsi que les amorces AC15, amplifient l'homologue de *Rx2* situé sur ce chromosome. Certains des fragments amplifiés ne ségrégeant pas dans nos descendances pourraient correspondre à un homologue situé sur le chromosome V. Toutefois, Bakker (2003) n'ont également trouvé aucun homologue de *Gpa2/Rx* sur les chromosome V de clones de pomme de terre provenant de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* et *S. tuberosum* ssp. *andigena*, tant par cartographie génétique que par cartographie physique. L'espèce dont est originaire *Rx2*, *S. acaule*, est classée dans la série *Acaulia*, alors que *S. tuberosum* ssp. *tuberosum*, *S. tuberosum* ssp. *andigena*, *S. spgazzinii*, et *S. sparsipilum* sont classées dans la série *Tuberosa* (Hawkes 1990). La présence de *Rx2* sur le chromosome V de *S. acaule* peut s'expliquer par un événement de translocation récent, survenu après la différenciation des deux séries.

Rx2 ne peut donc plus être considéré comme un gène candidat pour identifier une famille de gènes de résistance comportant *GpaV^{spg}* ou *GpaV^{spt}*. Les homologues cartographiés sur le chromosome XII de spg334.19 peuvent cependant être des gènes candidats pour la caractérisation moléculaire du QTL *GpaXII_{spg}* qui n'a pas pu être localisé précisément sur ce chromosome (figure 7.2).

Chapitre 8

Conclusions générales et perspectives

8 Conclusions générales et perspectives

8.1 Implication des résultats de la thèse pour la sélection pour la résistance à *G. pallida* chez la pomme de terre

Suite à l'interdiction des nématicides, programmée dans les pays de Union Européenne pour 2005, la création de variétés de pomme de terre résistante à *G. pallida* devient une priorité de plus en plus importante pour les sélectionneurs. Bien que des programmes de sélection pour la résistance à *G. pallida* aient été entrepris depuis plusieurs décennies, aucune variété actuelle de pomme de terre de consommation ne présente de niveau de résistance suffisant pour être considérée comme résistante selon les critères du CTPS (Comité Technique pour la Protection des Semences). Cet état de fait démontre la faiblesse des méthodes de sélection employées jusqu'à présent pour sélectionner des pommes de terre de bonne valeur agronomique, technologique et gustative, intégrant le caractère de résistance à *G. pallida*. Plusieurs éléments peuvent expliquer les difficultés rencontrées par les sélectionneurs :

- Les sources de résistance à *G. pallida* sont généralement oligo ou polygéniques (Bryan et al. 2002, Rouppe van der Voort et al. 2000, chapitres 4 et 5 de ce manuscrit). La présence dans un même clone des allèles de résistance à plusieurs QTL est nécessaire pour obtenir un haut niveau de résistance à *G. pallida* et la sélection phénotypique, à pression de sélection constante, ne permet pas toujours de retenir les QTL à effet faible (Thabuis et al. 2004a).
- Les sources de résistance à *G. pallida* proviennent d'espèces apparentées caractérisées par un grand nombre de caractères agronomiques défavorables.
- Des biais de ségrégation importants ont été observés au niveau de zones chromosomiques impliquées dans la résistance à *G. pallida*, réduisant le nombre d'individus porteurs des allèles de résistance aux QTL dans les descendances obtenues (Bryan et al. 2002, chapitre 3 de ce manuscrit).
- En raison de la lourdeur des tests de résistance, la sélection phénotypique pour la résistance n'est généralement réalisée qu'après élimination des clones présentant des caractères agronomiques très défavorables (tardiveté de tubérisation, irrégularité de

forme du tubercule). Les QTL de résistance, liés aux gènes impliqués dans ces caractères défavorables sont généralement perdus dès les premiers croisements.

Au cours de ce travail, sept QTL de résistance à *G. pallida* ont été cartographiés. Deux QTL sont originaires du clone de l'espèce cultivée *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* (*GpaVIII_{tbr}* et *GpaXI^l_{tbr}*), trois QTL sont originaire de l'espèce sauvage *S. spgazzinii* (*GpaV^s_{spg}*, *GpaVI^l_{spg}*, et *GpaXII_{spg}*), et deux QTL sont originaires de l'espèce sauvage *S. sparsipilum* (*GpaV^s_{spl}* et *GpaXI^s_{spl}*). Les QTL *GpaV^s_{spl}* ou *GpaV^s_{spg}*, situés sur le bras court des chromosomes V de *S. sparsipilum* ou *S. spgazzinii*, montrent les effets les plus forts sur la résistance. Des marqueurs PCR locus spécifiques ont été définis au cours de cette thèse, afin de pouvoir suivre *GpaV^s_{spl}* et *GpaV^s_{spg}* lors de leur introgression dans différents fonds génétiques de *S. tuberosum*. Ces marqueurs sont en cours d'utilisation pour la cartographie fine de *GpaV^s_{spl}* et *GpaV^s_{spg}* à la station d'amélioration de la pomme de terre de l'INRA de Ploudaniel (collaboration Marie-Claire Kerlan et Laura Chauvin). Des marqueurs PCR locus spécifiques seront définis pour les QTL à effet faible. Certains marqueurs PCR, cartographiés dans les mêmes clusters de gènes de résistance que les QTL à effet faibles et directement utilisables après vérification du polymorphisme, ont été publiés (Hamalainen et al. 1998, Huang et al. 2004, Kanyuka et al. 1999). D'autres peuvent être définis à partir des séquences de sondes RFLP cartographiées dans les mêmes régions chromosomiques chez la pomme de terre ou chez la tomate, grâce à la colinéarité existant entre les génome de ces deux espèces (voir chapitre 1.1.3, et les sites WEB PoMaMo : <http://gabi.rzpd.de/PoMaMo.html> et SGN : <http://www.sgn.cornell.edu/>).

La localisation des QTL à effet faible est plus ou moins précise selon la saturation en marqueurs, l'effectif de la descendance étudiée, le nombre de QTL impliqués dans la résistance, et l'effet de chaque QTL. *GpaXI^s_{spl}* a été détecté dans une descendance de 239 individus où ne ségrégeait qu'un seul autre QTL. Sa localisation est relativement précise (10 cM). En revanche, les quatre autres QTL à effet faible ont été détectés à partir des 117 individus de la descendance 96D32 et leur localisation est beaucoup plus imprécise. La cartographie de QTL par Composite Interval Mapping ne permet pas de définir des intervalles de confiance et les QTL cartographiés sur le génome de Rosa H1 n'ont pas été détectés par simple Interval Mapping. Leur intervalle de confiance n'a pas été déterminé. Les QTL à effet faible originaires de spg334.19, *GpaVI^l_{spg}* et *GpaXII_{spg}*, ont des intervalles de confiance de 31 et 48 cM. Il est parfois difficile de dire sur quel bras de chromosome se trouvent certains de ces QTL, tant leur localisation reste imprécise. Dans le cadre d'un schéma de Sélection

Assistée par Marqueurs (SAM), il est indispensable de choisir des intervalles de confiance suffisamment larges autour des QTL afin de ne pas sélectionner pour une zone chromosomique située à côté de la position réelle du QTL. Afin de ne pas introgresser des chromosomes entiers de *S. spegazzinii*, probablement porteurs de caractères défavorables, il sera nécessaire de préciser la localisation de *GpaVI*^{spg}, et *GpaXII*^{spg} pour qu'ils soient utilisés en sélection.

La détection de QTL de résistance à effet faible sur le génome de *S. tuberosum*, met en évidence la possibilité de compléter l'effet des QTL à effet fort *GpaV*^{spl} ou *GpaV*^{spg} par des QTL présents dans le fonds génétique de l'espèce cultivée. Les sélectionneurs ont remarqué que le niveau de résistance à *G. pallida*, transmis à la descendance dans des croisements impliquant des clones de *S. vernei* (résistants) et différents clones de *S. tuberosum* (sensibles), variait en fonction du parent sensible (D. Mugniéry, communication personnelle). Une recherche de QTL de résistance, réalisée dans une descendance ayant comme géniteurs les meilleurs des parents sensibles (ou des clones dihaploïdes dérivés de ceux-ci), permettrait d'identifier un ensemble de QTL de résistance à *G. pallida* originaires de *S. tuberosum*. L'utilisation de ces QTL pour compléter *GpaV*^{spl} ou *GpaV*^{spg} permettrait de limiter la part du génome de l'espèce sauvage à introgresser dans le génome de *S. tuberosum* pour obtenir un haut niveau de résistance, et de limiter ainsi l'introgression subséquente de caractères défavorables d'un point de vue agronomique. Les marqueurs cartographiés sur l'ensemble du génome (chapitre 3), peuvent aider à contre-sélectionner les allèles provenant de l'espèce sauvage pour les portions du génome qui ne sont pas impliqués dans la résistance, afin d'obtenir plus rapidement des clones de pomme de terre de bonne valeur agronomique (Thabuis et al. 2004b).

Les variétés de pomme de terre cultivées sont hétérozygotes et tétraploïdes, et un retour à ce niveau de ploïdie est indispensable à l'obtention d'une variété de bon niveau agronomique (Chapitre 1.1.2.2.1). Il est donc possible de cumuler dans une variété de pomme de terre plusieurs allèles d'un même gène. Même si les QTL à effet fort détectés sur le chromosome V (*GpaV*^{spl} et *GpaV*^{spg}) sont allèles, il sera intéressant d'étudier le niveau de résistance conféré par leur présence simultanée dans une variété et d'étudier le niveau de résistance conféré par le dosage de chaque allèle à ce locus. Le niveau de résistance et le spectre d'action, conférés par l'association de *GpaV*^{spl} et *GpaV*^{spg} dans un même clone, pourront être comparés au niveau de résistance et au spectre d'action conféré par un seul des QTL à effet fort, complété par certains des QTL à effet faibles cartographiés sur d'autres chromosomes. Le

suivi de l'introgression des QTL au niveau tétraploïde nécessite la mise au point de marqueurs permettant d'identifier sans ambiguïté la présence de chaque allèle de résistance parmi les quatre allèles possibles à un locus donné (Rickert et al. 2002).

La durabilité potentielle des facteurs génétiques déterminant une résistance est un élément important à prendre en compte lors de l'introgression de ces facteurs de résistance dans une variété. Bien que la durabilité d'une résistance ne puisse être évaluée qu'*a posteriori*, l'étude du comportement de clones de pomme de terre possédant les allèles de résistance à différents QTL, face à une large gamme de population de *G. pallida*, peut apporter un premier élément de réponse. Nos résultats démontrent que la présence des allèles de résistance à plusieurs QTL est indispensable à l'expression d'une résistance de haut niveau face à une gamme variée de populations de *G. pallida* (Chapitre 6). Etant donné la lourdeur des tests à mettre en place pour détecter les QTL conférant une résistance, il est difficile de réaliser une telle analyse avec un grand nombre de populations. Nous n'avons pas d'information sur la présence de facteurs génétiques spécifiques d'autres populations que Chavornay dans nos descendance. Néanmoins, nos résultats indiquent que la résistance déterminée à la fois par des QTL de Rosa H1 et de spg334.19 confère un haut niveau de résistance face à une gamme plus large de populations de *G. pallida* que la résistance impliquant les QTL de spl329.18.

8.2 Caractérisation moléculaire de $GpaV^s_{spl}$ et $GpaV^s_{spg}$

La cartographie fine des deux QTL à effet fort, $GpaV^s_{spl}$ et $GpaV^s_{spg}$ est en cours de réalisation (collaboration M.-C. Kerlan et L. Chauvin, INRA Ploudaniel). Des individus recombinants entre les marqueurs flanquant les QTL sont recherchés dans des descendance de plus de 1000 plantes. Ces individus recombinants seront génotypés avec des marqueurs cartographiés dans l'intervalle de confiance des QTL et testés pour leur résistance à *G. pallida*. Ces marqueurs sont en cours de développement.

La construction d'une banque BAC comportant les allèles de résistance des QTL $GpaV^s_{spl}$ et $GpaV^s_{spg}$ sera nécessaire. Des croisements entre des clones des deux descendance de cartographie ont été réalisés afin d'obtenir des individus porteurs des allèles de résistance à la fois à $GpaV^s_{spl}$ et à $GpaV^s_{spg}$ et aux QTL à effet faible. Un de ces clones sera choisi pour la construction de la banque BAC. Les marqueurs les plus étroitement liés à la résistance seront utilisés pour cribler la banque BAC. Si deux marqueur sont localisés sur le même clone BAC, ce clone sera séquencé et annoté. De nouveaux marqueurs seront défini à partir de la séquence

du BAC et cartographiés dans les descendances de cartographie fine afin de réduire les intervalles de confiance des locus de résistance. Les gènes situés dans ces nouveaux intervalles de confiance seront des candidats pour la caractérisation moléculaire des QTL $GpaV_{spl}^s$ et $GpaV_{spg}^s$.

Il est probable que plusieurs gènes coségrègent encore après une cartographie sur plus de 1000 individus. Seule la complémentation fonctionnelle par transformation génétique peut apporter la preuve formelle que le gène candidat est bien celui qui confère la résistance au locus étudié. La transformation d'un clone de pomme de terre sensible avec un fragment d'ADN correspondant à l'allèle (gène et promoteur) du gène candidat en couplage avec la résistance sera réalisée. Si une plante résistante est régénérée, elle apportera la preuve que le (les) gène(s) candidat(s) est bien le gène conférant la résistance au locus $GpaV_{spl}^s$ ou $GpaV_{spg}^s$.

8.3 Deux QTL de résistance sont nécessaires au déclenchement d'une réaction nécrotique

Des réactions de résistance par hypersensibilité (HR) chez les plantes ont été décrites dans des pathosystèmes impliquant aussi bien des virus (Whitham et al. 1994), des bactéries (Pedley and Martin 2003), des Oomycètes (Ballvora et al. 2002), des champignons (Geffroy et al. 1999) ou des nématodes (Milligan et al. 1998). Dans certains cas, l'implication nécessaire de deux gènes pour l'expression d'une résistance induisant une HR a été démontrée. C'est le cas en particulier dans l'interaction tomate-*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* impliquant les gènes *Pto* et *Prf* (Salmeron et al. 1996). Cependant, dans ce modèle, aucun niveau de résistance, conféré par l'un des deux gènes en l'absence du second, n'a été décrit. La réaction nécrotique que nous avons observée dans un clone possédant les allèles de résistance aux deux QTL $GpaV_{spl}^s$ et $GpaXI_{spl}^s$ est originale dans le sens où chaque QTL a également un effet propre sur le développement du nématode. C'est la première fois, à notre connaissance, qu'un tel phénomène est décrit.

Afin d'avancer dans la compréhension des mécanismes conduisant au développement de la réaction nécrotique, des études complémentaires vont être initiées. Dans un premier temps, nous allons vérifier si la présence des allèles de résistance aux deux QTL $GpaV_{spl}^s$ et $GpaXI_{spl}^s$ est nécessaire et suffisante pour déclencher la réaction nécrotique. Des analyses moléculaires seront envisagées dans un deuxième temps.

Afin de vérifier que la présence des allèles de résistance aux deux QTL est indispensable à l'expression de la réaction nécrotique, la liaison entre le développement de la réaction nécrotique et la présence simultanée des allèles de résistance aux deux QTL *GpaV^s_{spl}* et *GpaXI^s_{spl}* va être vérifiée sur l'ensemble de la descendance utilisée pour la cartographie des QTL (collaboration Didier Mugniéry, UMR BiO3P, Le Rheu). Une étude de la cinétique d'expression de la réaction nécrotique va être réalisée, sur deux semaines pour les clones possédant les allèles de résistance aux deux QTL et sur toute la durée du cycle de développement du nématode pour les clones ne possédant l'allèle de résistance qu'à un seul QTL, afin de vérifier en particulier si aucune nécrose tardive n'est déclenchée dans les racines des clones de pomme de terre possédant l'allèle de résistance à un seul des deux QTL.

Des observations cytologiques en microscopie électronique vont être réalisées par M. Sobczak, de l'université de Varsovie en Pologne. Ces observations, effectuées sur des coupes de racines de plantes infectées possédant les allèles de résistance aux QTL *GpaV^s_{spl}*, *GpaXI^s_{spl}*, isolés ou en combinaison, permettront de déterminer si la forte réaction de nécrose observée dans nos conditions expérimentales sur le clone possédant les allèles de résistance aux deux QTL, est totalement absente dans les racines des clones ne possédant l'allèle de résistance qu'à un seul QTL, ou si cette réaction s'exprime à un niveau plus faible, indétectable dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées.

La réaction de résistance par hypersensibilité (HR) est caractérisée par l'augmentation de l'expression de certains gènes tels que les gènes codant des protéines PR (pour Pathogenesis-Related proteins) ou des MAP kinases (Romeis 2001). L'expression de ces gènes dans les racines, infectées et non infectées, de clones de pomme de terre possédant les allèles de résistance aux deux QTL va être étudiée afin de déterminer si la réaction nécrotique que nous avons observée est une HR typique ou une "HR-like".

Si la présence conjointe des allèles de résistance aux deux QTL, *GpaV^s_{spl}* et *GpaXI^s_{spl}*, est réellement nécessaire à l'expression de la réaction nécrotique, la caractérisation moléculaire de ces QTL pourrait apporter des éléments permettant d'avancer dans la compréhension des mécanismes contrôlant cette réaction. La caractérisation moléculaire de *GpaV^s_{spl}* va être entreprise (voir ci-dessus). En revanche, la caractérisation moléculaire d'un QTL à effet faible tel que *GpaXI^s_{spl}* risque de s'avérer plus difficile et plus longue.

On peut néanmoins imaginer une stratégie permettant d'isoler le gène conférant la résistance à *G. pallida* au locus $GpaXI^s_{spl}$. Une première étape serait d'identifier une population de *G. pallida* peu agressive face à $GpaXI^s_{spl}$. La seconde étape serait de croiser un clone de pomme de terre ne possédant que l'allèle de résistance au QTL $GpaXI^s_{spl}$ avec un clone de pomme de terre n'exprimant aucune résistance face à cette population peu agressive. La descendance obtenue permettrait de cartographier la résistance conférée par $GpaXI^s_{spl}$ comme un caractère qualitatif. $GpaXI^s_{spl}$ colocalise avec un cluster de gènes de résistance de type NBS-LRR. Une dissection génétique fine de ce cluster a été réalisée lors du clonage des gènes *I2* de la tomate (Simons et al. 1998) et *R3* de la pomme de terre (Huang et al. 2004 ; Herman van Eck, communication personnelle). Six autres gènes ayant une structure de type NBS-LRR ont été identifiés au voisinage de *I2* (Simons et al. 1998). La cartographie fine du locus marqueur $GpaXI^s_{spl}$ dans une descendance de grand effectif, grâce à la population de *G. pallida* peu agressive, permettrait de le localiser plus précisément dans le cluster. Les marqueurs développés pour le clonage de *R3* et de *I2* devraient permettre d'identifier, dans une banque de clone BAC construite avec un clone de pomme de terre possédant l'allèle de résistance au QTL $GpaXI^s_{spl}$, tous les clones BAC situés dans ce cluster et contenant des séquences de type NBS-LRR. L'isolement de l'ADN des différents membres de cette famille de gène et la transformation d'une plante de pomme de terre sensible avec l'ADN de chacun des membres de la famille, devrait permettre d'identifier celui qui confère la résistance à *G. pallida* au locus $GpaXI^s_{spl}$.

8.4 Perspectives à court terme

Ce travail va être poursuivi conjointement dans les trois unités INRA GAFL-Avignon, APBV-Ploudaniel et BiO3P-Le Rheu. Il impliquera une collaboration étroite des trois unités. La cartographie fine des QTL de résistance $GpaV^s_{spl}$ et $GpaV^s_{spg}$ est actuellement en cours. L'association de différentes combinaisons alléliques aux QTL de résistance a déjà été initiée à Ploudaniel et sera poursuivie au printemps prochain, en vue de l'étude de la durabilité de ces QTL. L'étude de la cinétique du déclenchement de la réaction nécrotique dans les racines des clones possédant les allèles de résistance aux QTL $GpaV^s_{spl}$ et $GpaXI^s_{spl}$ sera entreprise au Rheu d'ici la fin de l'année 2004.

Références Bibliographiques

9 Références bibliographiques

- Adams, M. D., Kelley, J. M., Gocayne, J. D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M. H., Xiao, H., Merril, C. R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R. F., Kerlavage, A. R., McCombie, R. W. and Venter, J. C. 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252: 1651-1656.
- Allard, R. W. 1960. *Principles of Plant Breeding*. John Wiley and Sons, Inc, London.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E. W. and Lipman, D. J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. mol. Biol.* 215: 403-410.
- Ammati, M., Thomason, I. J. and Roberts, P. A. 1985. Screening *Lycopersicon* spp. for new genes imparting resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Plant Dis.* 69: 112-115.
- Ammiraju, J. S. S., Veremis, J. C., Huang, X., Roberts, P. A. and Kaloshian, I. 2003. The heat-stable root-knot nematode resistance gene Mi-9 from *Lycopersicon peruvianum* is localized on the short arm of chromosome 6. *Theor. Appl. Genet.* 106: 478-484.
- Arbonnier, P. 1966. L'analyse de l'information. Aperçu théorique et application à la loi multinomiale. *Ann. Sci. for.* 23: 951-1017.
- Arntzen, F. K., Visser, J. H. M. and Hoogendoorn, J. 1993. Hatching of *Globodera pallida* juveniles by diffusate of potato genotypes, differing in tolerance to *G. pallida*. *Ann. appl. Biol.* 123: 83-91.
- Bakker, E., Butterbach, P., Voort, J. R. v. d., Vossen, E. v. d., Vliet, J. v., Bakker, J. and Goverse, A. 2003. Genetic and physical mapping of homologues of the virus resistance gene *Rx1* and the cyst nematode resistance gene *Gpa2* in potato. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1524-1531.
- Bakker, E. H. 2003. Molecular and genetic analyses of potato cyst nematode resistance loci. Ph.D. Thesis. Wageningen Agricultural University. (The Netherlands)
- Ballvora, A., Schornack, S., Baker, B. J., Ganai, M., Bonas, U. and Lahaye, T. 2001. Chromosome landing at the tomato *Bs4* locus. *Mol. Genet. Genomics* 266: 639-645.
- Ballvora, A., Ercolano, M. R., Weiss, J., Meksem, K., Bormann, C. A., Oberhagemann, P., Salamini, F. and Gebhardt, C. 2002. The *RI* gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *Plant Journal* 30: 361-371.
- Bantignies, B., Seguin, J., Muzac, I., Dedaldechamp, F., Gulick, P. and Ibrahim, R. 2000. Direct evidence for ribonucleolytic activity of a PR-10-like protein from white lupin roots. *Plant mol. Biol.* 42: 871-881.
- Barker, H. and Solomon, R. M. 1990. Evidence of simple genetic control in potato of ability to restrict potato leafroll virus concentration in leaves. *Theor. Appl. Genet.* 80: 188-192.
- Barker, K. R. 1998. Introduction and Synopsis of Advancements in Nematologie. 1-20. in: *Plant and Nematode Interactions*. Barker, K. R., Pederson, G. L. and Windham, G. L., eds. American Society Of Agronomy, Madison, USA.
- Barone, A., Ritter, E., Schachtschabel, U., Debener, T., Salamini, F. and Gebhardt, C. 1990. Localization by restriction fragment length polymorphism mapping in potato of a major dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol. gen. Genet.* 224: 177-182.

- Basten, C. J., Weir, B. S. and Zeng, Z. B. 1997. QTL cartographer. A reference manual and tutorial for QTL mapping. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Bedin, P. 1996. Le rhizoctone brun de la pomme de terre. 291-296. in: La pomme de terre. Rousselle, P., Robert, Y. and Crosnier, J. C., eds. INRA Editions. Paris
- Bekal, S., Niblack, T. L. and Lambert, K. N. 2003. A chorismate mutase from the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* shows polymorphisms that correlate with virulence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 439-446.
- Bendahmane, A., Kanyuka, K. and Baulcombe, D. C. 1997. High-resolution genetical and physical mapping of the *Rx* gene for extreme resistance to potato virus X in tetraploid potato. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 153-162.
- Bendahmane, A., Kanyuka, K. and Baulcombe, D. C. 1999. The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* 11: 781-791.
- Bendahmane, A., Querci, M., Kanyuka, K. and Baulcombe, D. C. 2000. *Agrobacterium* transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the *Rx2* locus in potato. *Plant Journal* 21: 73-81.
- Beniers, A., Mulder, A. and Schouten, H. J. 1995. Selection for virulence of *Globodera pallida* by potato cultivars. *Fundam. appl. Nematol.* 18: 497-500.
- Bernatzky, R. and Tanksley, S. D. 1986. Genetics of actin-related sequences in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 72: 314-321.
- Berthou, F., Kouassi, A., Bossis, M., Dantec, J. P., Eddaoudi, M., Ferji, Z., Pelle, R., Taghzouti, M., Ellisseche, D. and Mugniery, D. 2003a. Enhancing the resistance of the potato to Southern Root-knot Nematodes by using *Solanum sparsipilum* germplasm. *Euphytica* 132: 57-65.
- Berthou, F., Palloix, A. and Mugniery, D. 2003b. Characterisation of virulence in populations of *Meloidogyne chitwoodi* and evidence for a resistance gene in pepper *Capsicum annuum* L. line PM 217. *Nematology* 5: 383-390.
- Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Liu, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J. R., Mackey, L. Y., Dorris, M., Frisse, L. M., Vida, J. T. and Thomas, W. K. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum *Nematoda*. *Nature* 392: 71-75.
- Bleve-Zacheo, T., Bongiovanni, M., Melillo, M. T. and Castagnone-Sereno, P. 1998. The pepper resistance genes *Me1* and *Me3* induce differential penetration rates and temporal sequences of root cell ultrastructural changes upon nematode infection. *Plant Sci.* 133: 79-90.
- Blok, V. C., Ehwaeti, M., Fargette, M., Kumar, A., Phillips, M. S., Robertson, W. M. and Trudgill, D. L. 1997. Evolution of resistance and virulence in relation to the management of nematodes with different biology, origins and reproductive strategies. *Nematologica* 43: 1-13.
- Bonierbale, M. W., Plaisted, R. L. and Tanksley, S. D. 1988. RFLP maps based on common set of clones reveal modes on chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120: 1095-1103.
- Bonierbale, M. W., Plaisted, R. L., Pineda, O. and Tanksley, S. D. 1994. QTL analysis of trichome-mediated insect resistance in potato. *Theor. Appl. Genet.* 87: 973-987.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. and Davis, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. hum. Genet* 32: 314-331.
- Boyes, D. C., Nam, J. and Dangl, J. L. 1998. The *Arabidopsis thaliana* *RPMI* disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response. *Proc. natl Acad. Sci. USA* 95: 15849-15854.

- Bradshaw, J. E., Hackett, C. A., Meyer, R. C., Milbourne, D., McNicol, J. W., Phillips, M. S. and Waugh, R. 1998. Identification of AFLP and SSR markers associated with quantitative resistance to *Globodera pallida* (Stone) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) with a view to marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 97: 202-210
- Brodie, B. B. and Plaisted, R. L. 1976. Resistance to root-knot nematodes in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *J. Nematol.* 8: 280-281.
- Brown, C. R., Mojtahedi, H. and Santo, G. S. 1989. Comparison of reproductive efficiency of *Meloidogyne chitwoodi* on *Solanum bulbocastanum* in soil and in vitro tests. *Plant Dis.* 73: 957-959
- Brown, C. R., Mojtahedi, H. and Santo, G. S. 1991. Resistance to Columbia root-knot nematode in *Solanum* ssp. and in hybrids of *S. hougasii* with tetraploid cultivated potato. *Am. Potato J.* 68: 445-452.
- Brown, C. R., Mojtahedi, H. and Santo, G. S. 1995. Introgression of resistance to Columbia and Northern root-knot nematodes from *Solanum bulbocastanum* into cultivated potato. *Euphytica* 83: 71-78.
- Brown, C. R., Mojtahedi, H. and Santo, G. S. 1999. Genetic analysis of resistance to *Meloidogyne chitwoodi* introgressed from *Solanum hougasii* into cultivated potato. *J. Nematol.* 31: 264-271.
- Brown, E. B. and Sykes, G. B. 1983. Assessment of the losses caused to potatoes by the potato cyst nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Ann. appl. Biol.* 103: 271-276.
- Bryan, G. J., McLean, K., Bradshaw, J. E., Jong, W. S. d., Phillips, M., Castelli, L. and Waugh, R. 2002. Mapping QTLs for resistance to the cyst nematode *Globodera pallida* derived from the wild potato species *Solanum vernei*. *Theor. Appl. Genet.* 105: 68-77.
- Cai, D., Kleine, M., Kifle, S., Harloff, H. J., Sandal, N. N., Marcker, K. A., Klein-Lankhorst, R. M., Salentijn, E. M. J., Lange, W., Stiekema, W. J., Wyss, U., Grundler, F. M. W. and Jung, C. 1997. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* 275: 832-834.
- Caromel, B., Mugniery, D., Lefebvre, V., Andrzejewski, S., Ellisseche, D., Kerlan, M. C., Rousselle, P. and Rousselle-Bourgeois, F. 2003. Mapping QTLs for resistance against *Globodera pallida* (Stone) Pa2/3 in a diploid potato progeny originating from *Solanum spegazzinii*. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1517-1523.
- Castagnone-Sereno, P., Bongiovanni, M., Palloix, A. and Dalmaso, A. 1996. Selection for *Meloidogyne incognita* virulence against resistance genes from tomato and pepper and specificity of the virulence/resistance determinants. *Europ. J. Plant Pathol.* 102: 585-590
- Castagnone-Sereno, P. 2002. Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes? *Euphytica* 124: 193-199.
- Castelli, L., Ramsay, G., Bryan, G., Neilson, S. J. and Phillips, M. S. 2003. New sources of resistance to the potato cyst nematodes *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* in the Commonwealth Potato Collection. *Euphytica* 129: 377-386.
- Causse, M., Fulton, T. M., Cho, Y. G., Ahn, S. N., Chunwongse, J., Wu, K., Xiao, J., Yu, Z., Ronald, P. C., Harrington, S. E., Second, G., McCouch, S. R. and Tanksley, S. D. 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics* 138: 1251-1274.
- Chen, X., Salamini, F. and Gebhardt, C. 2001. A potato molecular-function map for carbohydrate metabolism and transport. *Theor. Appl. Genet.* 102: 284-295.
- Chen, X. M., Line, R. F. and Leung, H. 1998. Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis. *Theor. Appl. Genet.* 97: 345-355.

- Dangl, J. L. and Jones, J. D. G. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833.
- Daunay, M. C. and Dalmasso, A. 1985. Multiplication of *Meloidogyne javanica*, *M. incognita* and *M. arenaria* on several *Solanum* species. *Rev. Nematol.* 8: 31-34.
- Davis, E. L., Hussey, R. S., Baum, T. J., Bakker, J., Schots, A., Rosso, M. N. and Abad, P. 2000. Nematode parasitism genes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 38: 365-396.
- De Almeida Engler, J. D., De Vleeschauwer, V., Burssens, S., Celenza, J. L., Inze, D., Van Montagu, M., Engler, G. and Gheysen, G. 1999. Molecular markers and cell cycle inhibitors show the importance of cell cycle progression in nematode-induced galls and syncytia. *Plant Cell* 11: 793-807.
- De Jong, W., Forsyth, A., Leister, D., Gebhardt, C. and Baulcombe, D. C. 1997. A potato hypersensitive resistance gene against potato virus X maps to a resistance gene cluster on chromosome 5. *Theor. Appl. Genet.* 95: 246-252.
- De Maine, M. J. and Fantes, J. A. 1983. The results of colchicine treatment of dihaploids and their implications regarding efficiency of chromosomes doubling and potato histogeny. *Potato Res.* 26: 289-294.
- de Vicente, M. C. and Tanksley, S. D. 1991. Genome-wide reduction in recombination of backcross progeny derived from male *versus* female gametes in an interspecific cross of tomato. *Theor. Appl. Genet.* 83: 173-178.
- de Vienne, D. 1998. Etablissement de cartes de liaisons génétiques. 49-79. in: Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. de Vienne, D., ed. INRA Editions (Paris).
- Dellaert, L. M. W. and Hoekstra, R. 1987. Resistance of potato cyst nematodes, *Globodera* spp., in wild and primitive *Solanum* species. *Potato Res.* 30: 579-587.
- di Vito, M., Zacheo, G. and Catalano, F. 1992a. Source for resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in eggplant. *Capsicum Newsl.* 301-303.
- di Vito, M., Zacheo, G. and Catalano, F. 1992b. Source for resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in eggplant. *Capsicum Newsl.* 301-303.
- di Vito, M., Saccardo, F., Errico, A., Zema, V. and Zaccheo, G. 1993. Genetics of resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in *Capsicum chacoense*, *C. chinense* and *C. frutescens*. *J. Genet. Breed.* 47: 23-26.
- Djian-Caporalino, C., Pijarowski, L., Fazari, A., Samson, M., Gaveau, L., O'Byrne, C., Lefebvre, V., Caranta, C., Palloix, A. and Abad, P. 2001. High-resolution genetic mapping of the pepper (*Capsicum annuum* L.) resistance loci *Me3* and *Me4* conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Theor. Appl. Genet.* 103: 592-600.
- Doganlar, S., Frary, A., Daunay, M.-C., Lester, R. N. and Tanksley, S. D. 2002. A Comparative Genetic Linkage Map of Eggplant (*Solanum melongena*) and Its Implications for Genome Evolution in the *Solanaceae*. *Genetics* 161: 1697-1711.
- Dong, F., Song, J., Naess, S. K., Helgeson, J. P., Gebhardt, C. and Jiang, J. 2000. Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theor. Appl. Genet.* 101: 1001-1007.
- Doyle, E. A. and Lambert, K. N. 2003. *Meloidogyne javanica* chorismate mutase 1 alters plant cell development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 123-131.
- Dropkin, V. H. 1969. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. *Phytopathology* 59: 1632-1637.

- Duvauchelle, S. and Andrivon, D. 1996. Le mildiou et son agent *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. 283-291. in: La pomme de terre. Rousselle, P., Robert, Y. and Crosnier, J. C., eds. INRA Editions. Paris
- Eisenback, J. D. 1998. Morphology and Systematics. 37-64. in: Plant and Nematode Interactions. Barker, K. R., Pederson, G. L. and Windham, G. L., eds. American Society Of Agronomy, Madison, USA.
- Elimane, R. 1996. La gale argentée de la pomme de terre. 296-299. in: La pomme de terre. Rousselle, P., Robert, Y. and Crosnier, J. C., eds. INRA Editions. Paris
- El-Kharbotly, A., Leonards-Schippers, C., Huigen, D. J., Jacobsen, E., Pereira, A., Stiekema, W. J., Salamini, F. and Gebhardt, C. 1994. Segregation analysis and RFLP mapping of the *R1* and *R3* alleles conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in progeny of dihaploid potato parents. Mol. gen. Genet. 242: 749-754.
- El-Kharbotly, A., Palomino-Sanchez, C., Salamini, F., Jacobsen, E. and Gebhardt, C. 1996. *R6* and *R7* alleles of potato conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary identified genetic loci clustering with the *R3* locus on chromosome XI. Theor. Appl. Genet. 92: 880-884
- Ellenby, C. 1954. Tuber-forming species and varieties of the genus *Solanum* tested for resistance to the potato root eelworm *Heterodera rostochiensis* Wollenberg. Euphytica 3: 195-202.
- Ellis, J. G., Lawrence, G. J., Luck, J. E. and Dodds, P. N. 1999. Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene *L* that determine differences in gene-for-gene specificity. Plant Cell 11: 495-506.
- Ellis, P. R. 1968. Resistance to the potato cyst-nematode, *Heterodera rostochiensis*, in the plant genus *Lycopersicon*. Ann. appl. Biol. 61: 151-160.
- Ellissèche, D. 1996. Aspects physiologiques de la croissance et du développement. 71-121. in: La pomme de terre. Rousselle, P., Robert, Y. and Crosnier, J. C., eds. INRA Editions (Paris).
- Elphinstone, J. G. 1994. Inheritance of Resistance to Bacterial Diseases. 429-446. in: Potato Genetics. Bradshaw, J. E. and Mackay, G. R., eds. CAB International. Wallingford, UK
- Ernst, K., Kumar, A., Kriseleit, D., Kloos, D. U., Phillips, M. S. and Ganai, M. W. 2002. The broad-spectrum potato cyst nematode resistance gene (*Hero*) from tomato is the only member of a large gene family of NBS-LRR genes with an unusual amino acid repeat in the LRR region. Plant Journal 31: 127-136.
- Ewing, E. E., Simko, I., Smart, C. D., Bonierbale, M. W., Mizubuti, E. S. G., May, G. D. and Fry, W. E. 2000. Genetic mapping from field tests of qualitative and quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in a population derived from *Solanum tuberosum* and *Solanum berthaultii*. Mol. Breed. 6: 25-36.
- Fassuliotis, G. 1973. Susceptibility of eggplant, *Solanum melongena*, to root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Plant Dis. Rep. 57: 606-608.
- Favery, B., Complainville, A., Vinardell, J. M., Lecomte, P., Vaubert, D., Mergaert, P., Kondorosi, A., Kondorosi, E., Crespi, M. and Abad, P. 2002. The endosymbiosis-induced genes *ENOD40* and *CCS52a* are involved in endoparasitic-nematode interactions in *Medicago truncatula*. Mol. Plant-Microbe Interact. 15: 1008-1013.
- Ferris, J. M. and Ferris, V. R. 1998. Biology of plant-parasitic nematodes. 21-35. in: Plant and Nematode Interactions. Barker, K. R., Pederson, G. L. and Windham, G. L., eds. American Society Of Agronomy, Madison, USA.
- Flor 1971. Current status of the gene-for-gene concept. Ann. Rev. Phytopathol. 9: 275-296.
- Fulton, T. M., Chunwongse, J. and Tanksley, S. D. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. Plant Molecular Biology Reporter 13: 207-209.

- Fulton, T. M., Van der Hoeven, R., Eannetta, N. T. and Tanksley, S. D. 2002. Identification, analysis, and utilization of conserved ortholog set markers for comparative genomics in higher plants. *Plant Cell* 14: 1457-1467.
- Gallais 1990. *Théorie de la sélection en amélioration des plantes*. Masson, France,.
- Ganal, M. W., Simon, R., Brommonschenkel, S., Arndt, M., Phillips, M. S., Tanksley, S. D. and Kumar, A. 1995. Genetic mapping of a wide spectrum nematode resistance gene (*Hero*) against *Globodera rostochiensis* in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 886-891.
- Ganal, M. W., Czihal, R., Hannappel, U., Kloos, D. U., Polley, A. and Ling, H. Q. 1998. Sequencing of cDNA clones from the genetic map of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Genome Res.* 8: 842-847.
- Gebhardt, C., Ritter, E., Debener, I., Schachtschabel, U., Walkemeier, B., Uhrig, H. and Salamini, F. 1989. RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. *Theor. Appl. Genet.* 78: 65-75.
- Gebhardt, C., Ritter, E., Barone, A., Debener, T., Walkemeier, B., Schachtschabel, U., Kaufmann, H., Thompson, R. D., Bonierbale, M. W., Ganal, M. W., Tanksley, S. D. and Salamini, F. 1991. RFLP maps of potato and their alignment with the homoeologous tomato genome. *Theor. Appl. Genet.* 83: 49-57.
- Gebhardt, C., Mugniéry, D., Ritter, E., Salamini, F. and Bonnel, E. 1993. Identification of RFLP markers closely linked to the *HI* gene conferring resistance to *Globodera rostochiensis* in potato. *Theor. Appl. Genet.* 85: 541-544.
- Gebhardt, C. and Valkonen, J. P. T. 2001. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Ann. Rev. Phytopathol.* 39: 79-102.
- Gebhardt, C., Walkemeier, B., Henselewski, H., Barakat, A., Delseny, M. and Stuber, K. 2003. Comparative mapping between potato (*Solanum tuberosum*) and *Arabidopsis thaliana* reveals structurally conserved domains and ancient duplications in the potato genome. *Plant Journal* 34: 529-541.
- Geffroy, V., Creusot, F., Falquet, J., Seignac, M., Adam-Blondon, A. F., Bannerot, H., Gepts, P. and Dron, M. 1998. A family of LRR sequences in the vicinity of the *Co-2* locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 96: 494-502.
- Geffroy, V., Sicard, D., de Oliveira, J. C. F., Seignac, M., Cohen, S., Gepts, P., Neema, C., Langin, T. and Dron, M. 1999. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 774-784.
- Gheysen, G. and Fenoll, C. 2002. Gene expression in nematode feeding sites. *Ann. Rev. Phytopathol.* 40: 191-219.
- Goellner, M., Smant, G., De Boer, J. M., Baum, T. J. and Davis, E. L. 2000. Isolation of beta-1,4-endoglucanase genes from *Globodera tabacum* and their expression during parasitism. *J. Nematol.* 32: 154-165.
- Goellner, M., Wang, X. H. and Davis, E. L. 2001. *Endo-beta-1,4-glucanase* expression in compatible plant-nematode interactions. *Plant Cell* 13: 2241-2255.

- Goff, S. A., Ricke, D., Lan, T. H., Presting, G., Wang, R. L., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchinson, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B. M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J. P., Miguel, T., Paszkowski, U., Zhang, S. P., Colbert, M., Sun, W. L., Chen, L. L., Cooper, B., Park, S., Wood, T. C., Mao, L., Quail, P., Wing, R., Dean, R., Yu, Y. S., Zharkikh, A., Shen, R., Sahasrabudhe, S., Thomas, A., Cannings, R., Gutin, A., Pruss, D., Reid, J., Tavtigian, S., Mitchell, J., Eldredge, G., Scholl, T., Miller, R. M., Bhatnagar, S., Adey, N., Rubano, T., Tusneem, N., Robinson, R., Feldhaus, J., Macalma, T., Oliphant, A. and Briggs, S. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp *japonica*). *Science* 296: 92-100.
- Goverse, A., Engler, J. D., Verhees, J., van der Krol, S., Helder, J. and Gheysen, G. 2000a. Cell cycle activation by plant parasitic nematodes. *Plant mol. Biol.* 43: 747-761.
- Goverse, A., Overmars, H., Engelbertink, J., Schots, A., Bakker, J. and Helder, J. 2000b. Both induction and morphogenesis of cyst nematode feeding cells are mediated by auxin. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 1121-1129.
- Grattapaglia, D. and Sederoff, R. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137: 1121-1137.
- Greco, N., di Vito, M., Brandonisio, A., Giordano, I. and De Marinis, G. 1982. The effect of *Globodera pallida* and *G. rostochiensis* on potato yield. *Nematologica* 28: 379-386.
- Greco, N., Brandonisio, A. and Bultrini, A. 1984. Control of *Globodera rostochiensis* on potato with fumigant and non fumigant nematicides. *Nematologie Mediterranea* 12: 7-13.
- Grube, R. C., Radwanski, E. R. and Jahn, M. 2000. Comparative genetics of disease resistance within the *Solanaceae*. *Genetics* 155: 873-887.
- Grundler, F., Betka, M. and Wyss, U. 1991. Influence of changes in the nurse cell system (syncytium) on sex determination and development of the cyst nematode *Heterodera schachtii*: Total amounts of proteins and amino acids. *Phytopathology* 81: 70-74.
- Hackett, C. A., Bradshaw, J. E., Meyer, R. C., McNicol, J. W., Milbourne, D. and Waugh, R. 1998. Linkage analysis in tetraploid species : a simulation study. *Genet. Res.* 71: 143-154.
- Hackett, C. A., Pande, B. and Bryan, G. J. 2003. Constructing linkage maps in autotetraploid species using simulated annealing. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1107-1115.
- Hamalainen, J. H., Sorri, V. A., Watanabe, K. N., Gebhardt, C. and Valkonen, J. P. T. 1998. Molecular examination of a chromosome region that controls resistance to potato Y and A potyviruses in potato. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1036-1043.
- Hannemann, R. E. and Peloquin, S. J. 1967. Crossability of 24-chromosome potato hybrids with 48-chromosome cultivars. *Eur Potato J* 10:
- Hawkes, J. G. 1978. Biosystematics of the potato. 730 p. in: *The Potato crop*. Harris, P. M., eds. Chapman & Hall. London
- Hawkes, J. G. 1990. *The Potato, Evolution, Biodiversity and Genetic Resources*. Belhaven Press, London.
- Hehl, R., Faurie, E., Hesselbach, J., Salamini, F., Whitham, S., Baker, B. and Gebhardt, C. 1999. TMV resistance gene *N* homologues are linked to *Synchytrium endobioticum* resistance in potato. *Theor. Appl. Genet.* 98: 379-386.
- Helentjaris, T., Slocum, M., Wright, S., Schaefer, A. and Nienhuis, J. 1986. Construction of a genetic linkage map in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 72: 761-769.
- Hendy, H., Pochard, E. and Dalmasso, A. 1983. Identification of two new sources of resistance to nematodes of the genus *Meloidogyne* in pepper, *Capsicum annuum* L. *Comptes Rendus des Seances de l'Academie d'Agriculture de France* 69: 817-822.

- Hendy, H., Pochard, E. and Dalmasso, A. 1985. Inheritance of resistance to Meloidogyne Chitwood (Tylenchida) in two lines of Capsicum annum L.: study of homozygous progenies obtained by anther culture. Agronomie 5: 93-99.
- Hougas, R. W., Peloquin, S. J. and Ross, R. W. 1958. Haploids of the common potato. J. Hered. 49: 103-106.
- Huang, S. W., Vleeshouwers, V., Werij, J. S., Hutten, R. C. B., van Eck, H. J., Visser, R. G. F. and Jacobsen, E. 2004. The R3 resistance to *Phytophthora infestans* in potato is conferred by two closely linked R genes with distinct specificities. Mol. Plant-Microbe Interact. 17: 428.
- Hugo, K. 2000 Mécanismes de défense des plantes et acquisition de résistance aux champignons pathogènes : caractérisation d'effecteurs apoplastiques et étude du mode d'action de la RNase NE. Ph.D thesis. Nice-Sophia Antipolis.
- Hugot, K., Ponchet, M., Marais, A., Ricci, P. and Galiana, E. 2002. A tobacco S-like RNase inhibits hyphal elongation of plant pathogens. Mol. Plant-Microbe Interact. 15: 243-250.
- Ihaka, R. and Gentleman, R. 1996. R: A language for data analysis and graphics. J. comput. graph. Stat. 5: 299-314.
- Isidore, E., van Os, H., Andrzejewski, S., Bakker, J., Barrena, I., Bryan, G. J., Caromel, B., van Eck, H., Ghareeb, B., de Jong, W., van Koert, P., Lefebvre, V., Milbourne, D., Ritter, E., van der Voort, J. R., Rousselle-Bourgeois, F., van Vliet, J. and Waugh, R. 2003. Toward a Marker-Dense Meiotic Map of the Potato Genome: Lessons From Linkage Group I. Genetics 165: 2107-2116.
- Jacobs, J. M. E., van Eck, H. J., Arens, P., Verkerk-Bakker, B., Bastiaanssen, H. J. M., El-Kharbotly, A., Pereira, A., Jacobsen, E., Stiekema, W. J. and Te Lintel Hekkert, B. 1995. A genetic map of potato (*Solanum tuberosum*) integrating molecular markers including transposons and classical markers. Theor. Appl. Genet. 91: 289-300.
- Jacobs, J. M. E., van Eck, H. J., Horsman, K., Arens, P. F. P., Verkerk-Bakker, B., Jacobsen, E., Pereira, A. and Stiekema, W. J. 1996. Mapping of resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* from the wild potato species *Solanum vernei*. Mol. Breed. 2: 51-60.
- Janssen, G. J. W., Norel, A. v., Verkerk-Bakker, B. and Janssen, R. 1996. Resistance to Meloidogyne chitwoodi, M. fallax and M. hapla in wild tuber-bearing Solanum spp. Euphytica 92: 287-294.
- Janssen, G. J. W., Norel, A. v., Verkerk-Bakker, B., Janssen, R. and Hoogendoorn, J. 1997. Introgression of resistance to root-knot nematodes from wild Central American Solanum species into S. tuberosum ssp. tuberosum. Theor. Appl. Genet. 95: 490-496.
- Jasmer, D. P., Goverse, A. and Smant, G. 2003. Parasitic nematode interactions with mammals and plants. Ann. Rev. Phytopathol. 41: 245-270.
- Jatala, P. and Rowe, P. R. 1976. Reaction of 62 tuber-bearing Solanum species to the root-knot nematode, Meloidogyne incognita acrita. J. Nematol. 8: 290.
- Jaubert, S., Laffaire, J. B., Abad, P. and Rosso, M. N. 2002. A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode Meloidogyne incognita. FEBS Lett. 522: 109-112.
- Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P. and Valent, B. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. Embo Journal 19: 4004-4014.
- Jimenez, N., Crozzoli, R. and Greco, N. 2000. Effect of Globodera rostochiensis on the yield of potato in Venezuela. Nematol. mediterr. 28: 295-299.
- Jones, J. D. G. 2001. Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. Curr. Opin. Plant Biol. 4: 281-287.

- Jongedijk, E. and Ramanna, M. S. 1989. Synaptic mutants in potato, *Solanum tuberosum* L. II. Concurrent reduction of chiasma frequencies in male and female meiosis of ds-1 (desynapsis) mutants. *Genome* 32: 1054-1062.
- Jorde, L. B. 2000. Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes. *Genome Res.* 10: 1435-1444.
- Kaeppler, S. 1997. Power analysis for quantitative trait locus mapping in populations derived by multiple backcrosses. *Theor. Appl. Genet.* 95: 618-621.
- Kanazin, V., Marek, L. F. and Shoemaker, R. C. 1996. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc. natl Acad. Sci. USA* 93: 370-375.
- Kanyuka, K., Bendahmane, A., Rouppe van der Voort, J. N. A. M., van der Vossen, E. A. G. and Baulcombe, D. C. 1999. Mapping of intra-locus duplications and introgressed DNA : aids to map-based cloning of genes from complex genomes illustrated by physical analysis of the Rx locus in tetraploid potato. *Theor. Appl. Genet.* 98: 679-689.
- Kao, T. H. and Tsukamoto, T. 2004. The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell* 16: S72-S83.
- Kariu, T., Sano, K., Shimokawa, H., Itoh, R., Yamasaki, N. and Kimura, M. 1998. Isolation and characterization of a wound-inducible ribonuclease from *Nicotiana glutinosa* leaves. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 62: 1144-1151.
- Kasai, K., Morikawa, Y., Sorri, V. A., Valkonen, J. P. T., Gebhardt, C. and Watanabe, K. N. 2000. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene Ry(adg) based on a common feature of plant disease resistance genes. *Genome* 43: 1-8.
- Kaul, S., Koo, H. L., Jenkins, J., Rizzo, M., Rooney, T., Tallon, L. J., Feldblyum, T., Nierman, W., Benito, M. I., Lin, X. Y., Town, C. D., Venter, J. C., Fraser, C. M., Tabata, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Kotani, H., Sasamoto, S., Ecker, J. R., Theologis, A., Federspiel, N. A., Palm, C. J., Osborne, B. I., Shinn, P., Conway, A. B., Vysotskaia, V. S., Dewar, K., Conn, L., Lenz, C. A., Kim, C. J., Hansen, N. F., Liu, S. X., Buehler, E., Altafi, H., Sakano, H., Dunn, P., Lam, B., Pham, P. K., Chao, Q. M., Nguyen, M., Yu, G. X., Chen, H. M., Southwick, A., Lee, J. M., Miranda, M., Toriumi, M. J., Davis, R. W., Wambutt, R., Murphy, G., Dusterhoft, A., Stiekema, W., Pohl, T., Entian, K. D., Terryn, N., Volckaert, G., Choisne, N., Rieger, M., Ansoerge, W., Unseld, M., Fartmann, B., Valle, G., Artiguenave, F., Weissenbach, J., Quetier, F., Wilson, R. K., de la Bastide, M., Sekhon, M., Huang, E., Spiegel, L., Gnoj, L., Pepin, K., Murray, J., Johnson, D., Habermann, K., Dedhia, N., Parnell, L., Preston, R., Hillier, L., Chen, E., Marra, M., Martienssen, R., McCombie, W. R., Mayer, K., White, O., Bevan, M., Lemcke, K., Creasy, T. H., Bielke, C., Haas, B., Haase, D., Maiti, R., Rudd, S., Peterson, J., Schoof, H., Frishman, D., Morgenstern, B., Zaccaria, P., Ermolaeva, M., Perteua, M., Quackenbush, J., Volfovsky, N., Wu, D. Y., Lowe, T. M., Salzberg, S. L., Mewes, H. W., Rounsley, S., Bush, D., Subramaniam, S., Levin, I., Norris, S., Schmidt, R., Acarkan, A., Bancroft, I., Brennicke, A., Eisen, J. A., Bureau, T., Legault, B. A., Le, Q. H., Agrawal, N., Yu, Z., Copenhaver, G. P., Luo, S., Pikaard, C. S., Preuss, D., Paulsen, I. T., Sussman, M., Britt, A. B., Selinger, D. A., Pandey, R., Mount, D. W., Chandler, V. L., Jorgensen, R. A., Pikaard, C., Juergens, G., Meyerowitz, E. M., Dangl, J., Jones, J. D. G., Chen, M., Chory, J., Somerville, C. and Arabidopsis Genome, I. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Kerlan, C. 1996. Maladies à virus. 232-260. in: La pomme de terre. Rousselle, P., Robert, Y. and Crosnier, J. C., eds. INRA Editions (Paris).
- Köck, M., Löffler, A., Abel, S. and Glund, K. 1995. cDNA structure and regulatory properties of a family of starvation-induced ribonucleases from tomato. *Plant mol. Biol.* 27: 477-485.
- Köck, M., Gross, N., Stenzel, I. and Hause, G. 2004. Phloem-specific expression of the wound-inducible ribonuclease LE from tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus). *Planta* 219: 233-242.

- Koltai, H., Dhandaydham, M., Opperman, C., Thomas, J. and Bird, D. 2001. Overlapping plant signal transduction pathways induced by a parasitic nematode and a rhizobial endosymbiont. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 1168-1177.
- Konieczny, A. and Ausubel, F. M. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* 4: 403-410.
- Kort, J., Ross, H., Rumpfenhorst, J. H. and Stone, A. R. 1977. An international scheme for classifying pathotypes of potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Nematologica* 23: 333-339.
- Kosambi, D. D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12: 172-175.
- Kouassi, A., Kerlan, M. C., Sobczak, M., Dantec, J. P., Rouaux, C., Ellisèche, D. and Mugniery, D. 2004. Resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne fallax* in *Solanum sparsipilum*: Inheritance and mechanism. *Nematology* sous presse.
- Kreike, C. M., de Koning, J. R. A., Vinke, J. H., van Ooijen, J. W., Gebhardt, C. and Stiekema, W. 1993. Mapping of loci involved in quantitatively inherited resistance to the potato cyst-nematode *Globodera rostochiensis* pathotype Ro1. *Theor. Appl. Genet.* 87: 464-470.
- Kreike, C. M., de Koning, J. R. A., Vinke, J. H., van Ooijen, J. W. and Stiekema, W. J. 1994. Quantitatively-inherited resistance to *Globodera pallida* is dominated by one major locus in *Solanum spagazzinii*. *Theor. Appl. Genet.* 88: 764-769.
- Kreike, C. M., Kok-Westeneng, A. A., Vinke, J. H. and Stiekema, W. J. 1996. Mapping of QTLs involved in nematode resistance, tuber yield, and root development in *Solanum* sp. *Theor. Appl. Genet.* 92: 463-470.
- Ku, H. M., Vision, T., Liu, J. P. and Tanksley, S. D. 2000. Comparing sequenced segments of the tomato and *Arabidopsis* genomes: Large-scale duplication followed by selective gene loss creates a network of synteny. *Proc. natl Acad. Sci. USA* 97: 9121-9126.
- Kullback, S. 1959. *Information theory and statistics*. John Willey and Sons.
- Lambert, K. N., Ferrie, B. J., Nombela, G., Brenner, E. D. and Williamson, V. M. 1999. Identification of genes whose transcripts accumulate rapidly in tomato after root-knot nematode infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55: 341-348.
- Lander, E., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daley, M., Lincoln, S. and Newburg, L. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Lander, E. S. and Botstein, D. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.
- LeBrasseur, N. D., MacIntosh, G. C., Perez-Amador, M. A., Saitoh, M. and Green, P. J. 2002. Local and systemic wound-induction of RNase and nuclease activities in *Arabidopsis*: RNS1 as a marker for a JA-independent systemic signaling pathway. *Plant Journal* 29: 393-403.
- Lefebvre, V., Palloix, A. and Rives, M. 1993. Nuclear RFLP between pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). *Euphytica* 71: 189-199.
- Lefebvre, V., Palloix, A., Caranta, C. and Pochard, E. 1995. Construction of an intraspecific integrated linkage map of pepper using molecular markers and doubled-haploid progenies. *Genome* 38: 112-121.
- Lefebvre, V., Pflieger, S., Thabuis, A., Caranta, C., Blattes, A., Chauvet, J. C., Daubeze, A. M. and Palloix, A. 2002. Towards the saturation of the pepper linkage map by alignment of three intraspecific maps including known-function genes. *Genome* 45: 839-854.

- Lefebvre, V. 2004. Development and use of molecular markers in pepper (*Capsicum spp.*) for genetics and breeding. in press. in: Molecular markers in plant breeding and crop improvement. eds. Springer Verlag. Heidelberg
- Lefebvre, V., Bendahmane, A. and Causse, M. 2004. Génomique, caractérisation de gènes majeurs et de QTL. 403-425. in: La génomique en biologie végétale. Morot-Gaudry, J.-F. and Briat, J.-F., eds. INRA Editions. Paris
- Lehmann, K., Hause, B., Altmann, D. and Köck, M. 2001. Tomato ribonuclease LX with the functional endoplasmic reticulum retention motif HDEF is expressed during programmed cell death processes, including xylem differentiation, germination, and senescence. *Plant Physiol.* 127: 436-449.
- Leister, D., Ballvora, A., Salamini, F. and Gebhardt, C. 1996. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nat. Genet.* 14: 421-429.
- Leister, D., Kurth, J., Laurie, D. A., Yano, M., Sasaki, T., Devos, K., Graner, A. and Schulze-Lefert, P. 1998. Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes. *Proc. natl Acad. Sci. USA* 95: 370-375.
- Leonards-Schippers, C., Gieffers, W., Schafer-Pregl, R., Ritter, E., Knapp, S. J., Salamini, F. and Gebhardt, C. 1994. Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato – a case study for QTL mapping in an allogamous plant species. *Genetics* 137: 67-77.
- Li, X., van Eck, H. J., Roupe van der Voort, J. N. A. M., Huigen, D. J., Stam, P. and Jacobsen, E. 1998. Autotetraploids and genetic mapping using common AFLP markers : the *R2* allele conferring resistance to *Phytophthora infestans* mapped on potato chromosome 4. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1121-1128.
- Lindhout, P. 2002. The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica* 124: 217-226.
- Livingstone, K. D., Lackney, V. K., Blauth, J. R., van Vijkt, R. and Molly Kyle, J. 1999. Genome mapping in *capsicum* and the evolution of genome structure in the *Solanaceae*. *Genetics* 152: 1183-1202.
- Lorieux, M., Goffinet, B., Perrier, X., González de León, D. and Lanaud, C. 1995. Maximum-likelihood models for mapping genetic markers showing segregation distortion. 1. Backcross populations. *Theor. Appl. Genet.* 90: 73-80.
- Luedders, V. D. 1987. Selection against *Heterodera glycines* males by soybean lines with genes for resistance. *J. Nematol.* 19: 459-462.
- Mahalingam, R., Wang, G. J. and Knap, H. T. 1999. Polygalacturonase and polygalacturonase inhibitor protein: Gene isolation and transcription in *Glycine max* - *Heterodera glycines* interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 490-498.
- Marano, M. R., Malcuit, I., Jong, W. d. and Baulcombe, D. C. 2002. High-resolution genetic map of *Nb*, a gene that confers hypersensitive resistance to potato virus X in *Solanum tuberosum*. *Theor. Appl. Genet.* 105: 192-200.
- Marczewski, W., Hennig, J. and Gebhardt, C. 2002. The Potato virus S resistance gene *Ns* maps to potato chromosome VIII. *Theor. Appl. Genet.* 105: 564-567.
- Meksem, K., Leister, D., Peleman, J., Zabeau, M., Salamini, F. and Gebhardt, C. 1995. A high-resolution map of the vicinity of the *R1* locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Mol. gen. Genet.* 249: 74-81.
- Merlet, J., Le Hingrat, Y., Ellissèche, D., Crouau, G. and Langlade, P. 1996. Production du Plant. 415-448. in: La pomme de terre. Rousselle, P., Robert, Y. and Crosnier, J. C., eds. INRA Editions (Paris).

- Messeguer, R., Ganal, M., de Vicente, M. C., Young, N. D., Bolkan, H. and Tanksley, S. D. 1991. High resolution RFLP map around the root knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 82: 529-536.
- Meyer, R. C., Milbourne, D., Hackett, C. A., Bradshaw, J. E., McNichol, J. W. and Waugh, R. 1998. Linkage analysis in tetraploid potato and association of markers with quantitative resistance to late blight (*Phytophthora infestans*). *Mol. gen. Genet.* 259: 150-160.
- Michelmore, R. W. and Meyers, B. C. 1998. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Res.* 8: 1113-1130.
- Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J. E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W. and Waugh, R. 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Mol. Breed.* 3: 127-136.
- Milbourne, D., Meyer, R. C., Collins, A. J., Ramsay, L. D., Gebhardt, C. and Waugh, R. 1998. Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Molecular & General Genetics* 259: 233-245.
- Milligan, S. B., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Zabel, P. and Williamson, V. M. 1998. The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* 10: 1307-1319.
- Moiseyev, G. P., Fedoreyeva, L. I., Zhuravlev, Y. N., Yasnetskaya, E., Jekel, P. A. and Beintema, J. J. 1997. Primary structures of two ribonucleases from ginseng calluses. New members of the PR-10 family of intracellular pathogenesis-related plant proteins. *FEBS Lett.* 407: 207-210.
- Mok, D. W. S. and Peloquin, S. J. 1975. The inheritance of three mechanisms of diplandroid (2n pollen) formation in diploid potatoes. *Heredity* 35: 295-302.
- Mugniery, D. and Balandras, C. 1986. Test of resistance to *Globodera rostochiensis* Woll. in potato progeny. *Potato Res.* 29: 131-140.
- Mugniéry, D. and Person, F. 1976. Methode d'élevage de quelques espèces de nématodes à kyste du genre *Heterodera*. *Sciences agronomiques Rennes* 217-220.
- Mugniéry, D. and Fayet, G. 1981. Détermination du sexe chez *Globodera pallida* Stone. *Rev. Nematol.* 4: 41-45.
- Mugniéry, D. and Fayet, G. 1984. Détermination du sexe de *Globodera rostochiensis* Woll. et influence des niveaux d'infestation sur la pénétration, le développement et le sexe de ce nématode. *Rev. Nematol.* 7: 233-238.
- Mugniéry, D., Phillips, M. S., Rumpfenhorst, H. J., Stone, A. R., Treur, A. and Trudgill, D. L. 1989. Assesment of partial resistance of potato to, and pathotype and virulence differences in potato cyst nematodes. *Bull OEPP* 19: 7-25
- Mugniéry, D. 1996. Nématodes. 164-171. in: La pomme de terre. Rousselle, P., Robert, Y. and Crosnier, J. C., eds. INRA Editions (Paris).
- Mugniéry, D., Fouville, D., Dantec, J. P., Pellé, R., Rousselle-Bourgeois, F. and Ellissèche, D. 2001. Résistance à *Globodera pallida* Pa2/3 chez *Solanum sparsipilum*. *Nematology* 3: 619-626.
- Naess, S. K., Bradeen, J. M., Wielgus, S. M., Haberlach, G. T., McGrath, J. M. and Helgeson, J. P. 2000. Resistance to late blight in *Solanum bulbocastanum* is mapped to chromosome 8. *Theor. Appl. Genet.* 101: 697-704.
- Niewohner, J., Salamini, F. and Gebhardt, C. 1995. Development of PCR assays diagnostic for RFLP marker alleles closely linked to alleles Gro1 and H1, conferring resistance to the root cyst nematode *Globodera rostochiensis* in potato. *Mol. Breed.* 1: 65-78.
- Nimchuk, Z., Rohmer, L., Chang, J. H. and Dangl, J. L. 2001. Knowing the dancer from the dance: R-gene products and their interactions with other proteins from host and pathogen. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 288-294.

- Nombela, G., Williamson, V. M. and Muniz, M. 2003. The root-knot nematode resistance gene Mi-1.2 of tomato is responsible for resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 645-649.
- Oberhagemann, P., Chatot-Balandras, C., Schafer-Pregl, R., Wegener, D., Palomino, C., Salamini, F., Bonnel, E. and Gebhardt, C. 1999. A genetic analysis of quantitative resistance to late blight in potato: towards marker-assisted selection. *Mol. Breed.* 5: 399-415.
- Oerke, E. C., Dehne, H. W., Schonbeck, F. and Weber, A. 1994. Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops. 808 pp. Elsevier Science Publishers. Amsterdam Netherlands
- Oh, K., Hardeman, K., Ivanchenko, M., Ellard-Ivey, M., Nebenfuhr, A., White, T. and Lomax, T. 2002. Fine mapping in tomato using microsynteny with the *Arabidopsis* genome: the Diageotropica (Dgt) locus. *Genome Biology* 3: research0049.1 - research0049.11.
- Ortiz, R., Iwanaga, M., Raman, K. V. and Palacios, M. 1990. Breeding for resistance to potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller), in diploid potatoes. *Euphytica* 50: 119-126.
- Paal, J., Henselewski, H., Muth, J., Meksem, K., Menendez, C. M., Salamini, F., Ballvora, A. and Gebhardt, C. 2004. Molecular cloning of the potato *Gro1-4* gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach. *Plant Journal* 38: 285-297
- Pan, Q., Liu, Y., Budai-Hadrian, O., Sela, M., Carmel-Goren, L., Zamir, D. and Fluhr, R. 2000. Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: tomato and *Arabidopsis*. *Genetics* 155: 309-322.
- Paran, I. and Michelmore, R. W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85: 985-993.
- Park, C. J., Kim, K. J., Shin, R., Park, J. M., Shin, Y. C. and Paek, K. H. 2004. Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant Journal* 37: 186-198.
- Parlevliet, J. E. 2002. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica* 124: 147-156.
- Parrella, G., Ruffel, S., Moretti, A., Morel, C., Palloix, A. and Caranta, C. 2002. Recessive resistance genes against potyviruses are localized in colinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon* spp.) and pepper (*Capsicum* spp.) genomes. *Theor. Appl. Genet.* 105: 855-861.
- Pasco, C. and Jouan, B. 1996. Gale commune de la pomme de terre (*Streptomyces scabies* ; *Streptomyces* sp.). 265-269. in: La pomme de terre. Rousselle, P., Robert, Y. and Crosnier, J. C., eds. INRA Editions (Paris).
- Paulson, R. E. and Webster, J. M. 1972. Ultrastructure of the hypersensitive reaction in roots of tomato, *Lycopersicon esculentum* L., to infection by root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Physiol. Plant Pathol.* 2: 227-234.
- Pavek, J. J. and Corsini, D. L. 1994. Inheritance of resistance to warm-growing-season fungal diseases. 403-409. in: Potato Genetics. Bradshaw, J.E. and Mackay, G.R., eds. CAB International. Wallingford, UK
- Pedley, K. F. and Martin, G. B. 2003. Molecular basis of *Pto*-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Ann. Rev. Phytopathol.* 41: 215-243.
- Pflieger, S., Lefebvre, V., Caranta, C., Blattes, A., Goffinet, B. and Palloix, A. 1999. Disease resistance gene analogs as candidates for QTLs involved in pepper-pathogen interactions. *Genome* 42: 1100-1110.

- Pflieger, S., Lefebvre, V. and Causse, M. 2001. The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Mol. Breed.* 7: 275-291.
- Pineda, O., Bonierbale, M. W., Plaisted, R. L., Brodie, B. B. and Tanksley, S. D. 1993. Identification of RFLP markers linked to the *HI* gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Genome* 36: 152-156.
- Popeijus, H., Overmars, H., Jones, J., Blok, V., Goverse, A., Helder, J., Schots, A., Bakker, J. and Smant, G. 2000. Degradation of plant cell walls by a nematode. *Nature* 406: 36-37.
- Prior, P. and Samson, R. 1996. Flétrissement des Solanacées et pourriture brune des tubercules : *Pseudomonas solanacearum*. 270-274. in: *La pomme de terre*. Rousselle, P., Robert, Y. and Crosnier, J. C., eds. INRA Editions (Paris).
- Priou, S. and Jouan, B. 1996. Les maladies provoquées par les bactéries pathogènes du genre *Erwinia*. 260-265. in: *La pomme de terre*. Rousselle, P., Robert, Y. and Crosnier, J. C., eds. INRA Editions (Paris).
- Qin, L., Kudla, U., Roze, E. H. A., Goverse, A., Popeijus, H., Nieuwland, J., Overmars, H., Jones, J. T., Schots, A., Smant, G., Bakker, J. and Helder, J. 2004. A nematode expansin acting on plants. *Nature* 427: 30-30.
- Rafalski, A. 2002a. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 94-100.
- Rafalski, J. A. 2002b. Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. *Plant Sci.* 162: 329-333.
- Rice, S. L., Leadbeater, B. S. C. and Stone, A. R. 1985. Changes in cell structure in roots of resistant potatoes parasitized by potato cyst-nematodes. I. Potatoes with resistance gene *HI* derived from *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Physiol. Plant Pathol.* 27: 219-234.
- Rice, S. L., Stone, A. R. and Leadbeater, B. S. C. 1987. Observation in cell structure in roots of resistant potatoes parasitized by potato cyst-nematodes. II. Potatoes with resistance derived from *Solanum vernei*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 31: 1-14.
- Rickert, A. M., Premstaller, A., Gebhardt, C. and Oefner, P. J. 2002. Genotyping of SNPs in a polyploid genome by pyrosequencing (TM). *BioTechniques* 32: 592-603
- Rickert, A. M., Kim, J. H., Meyer, S., Nagel, A., Ballvora, A., Oefner, P. J. and Gebhardt, C. 2003. First-generation SNP/InDel markers tagging loci for pathogen resistance in the potato genome. *Plant Biotechnology Journal* 1: 399-410.
- Ritter, E., Debener, T., Barone, A., Salamini, F. and Gebhardt, C. 1991. RFLP mapping on potato chromosomes of two genes controlling extreme resistance to potato virus X (PVX). *Mol. gen. Genet.* 227: 81-85.
- Robert, Y. 1996. Insectes. 185-229. in: *La pomme de terre*. Rousselle, P., Robert, Y. and Crosnier, J. C., eds. INRA Editions (Paris).
- Roberts, P. A. and Stone, A. R. 1981. Host ranges of *Globodera* species within *Solanum* subgenus *Leptostemonum*. *Nematologica* 27: 172-189.
- Roberts, P. A. and Stone, A. R. 1983. Comparisons of invasion and development of *Globodera* spp. and European potato cyst-nematode pathotypes in roots of resistant *Solanum* sg. *Leptostemonum* spp. *Nematologica* 29: 95-108.
- Robertson, W. M. 1996. Plant cell modifications by parasitic nematodes. 237-244. in: *Histology, ultrastructure and molecular cytology of plant-microorganism interactions*. Nicole, M. and Gianinazzi-Pearson, V., eds. Kluwer Academic Publishers.
- Romeis, T. 2001. Protein kinases in the plant defence response. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 407-414.

- Ronning, C. M., Stegalkina, S. S., Ascenzi, R. A., Bougri, O., Hart, A. L., Utterbach, T. R., Vanaken, S. E., Riedmuller, S. B., White, J. A., Cho, J., Perte, G. M., Lee, Y., Karamycheva, S., Sultana, R., Tsai, J., Quackenbush, J., Griffiths, H. M., Restrepo, S., Smart, C. D., Fry, W. E., van der Hoeven, R., Tanksley, S., Zhang, P. F., Jin, H. L., Yamamoto, M. L., Baker, B. J. and Buell, C. R. 2003. Comparative analyses of potato expressed sequence tag libraries. *Plant Physiol.* 131: 419-429.
- Ross, H. 1986. Potato breeding - Problems and perspectives. V. P. Parey, Berlin-Hambourg.
- Rossi, M., Goggin, F. L., Milligan, S. B., Kaloshian, I., Ullman, D. E. and Williamson, V. M. 1998. The nematode resistance *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proc natl Acad Sci USA* 95: 9750-9754.
- Rosso, M. N., Favery, B., Piotte, C., Arthaud, L., De Boer, J. M., Hussey, R. S., Bakker, J., Baum, T. J. and Abad, P. 1999. Isolation of a cDNA encoding a beta-1,4-endoglucanase in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and expression analysis during plant parasitism. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 585-591.
- Roupe van der Voort, J., Wolters, P., Folkerstma, R., Hutten, R., van Zanvoort, P., Vinke, H., Kanyuka, K., Bendahmane, A., Jacobsen, E., Janssen, R. and Bakker, J. 1997a. Mapping of the cyst nematode resistance locus *Gpa2* in potato using a strategy based on co-migrating AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 874-880.
- Roupe van der Voort, J., Kanyuka, K., van der Vossen, E., Bendahmane, A., Mooijman, P., Klein-Lankhorst, R., Stiekema, W., Baulcombe, D. and Bakker, J. 1999a. Tight physical linkage of the nematode resistance gene *Gpa2* and the virus resistance gene *Rx* on a single segment introgressed from the wild species *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* CPC 1673 into cultivated potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 197-206.
- Roupe van der Voort, J. N. A. M., van Zandvoort, P., van Eck, H. J., Folkertsma, R., Hutten, R. C. B., Draaistra, J., Gommers, F. J., Jacobsen, E., Helder, J. and Bakker, J. 1997b. Use of allele specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes. *Mol. Gen. Genet.* 255: 438-447.
- Roupe van der Voort, J. N. A. M., Lindeman, W., Folkertsma, R., Hutten, R. C. B., Overmars, H., Van der Vossen, E., Jacobsen, E. and Bakker, J. 1998. A QTL for broad-spectrum resistance to cyst nematode species (*Globodera* spp.) maps to a resistance gene cluster in potato. *Theor. Appl. Genet.* 96: 654-661.
- Roupe van der Voort, J. N. A. M., Janssen, G. J. W., Overmars, H., van Zandvoort, P. M., van Norel, A., Scholten, O. E., Janssen, R. and Bakker, J. 1999b. Development of a PCR-based selection assay for root-knot nematode resistance (*Rmcl*) by a comparative analysis of the *Solanum bulbocastanum* and *S. tuberosum* genome. *Euphytica* 106: 187-195.
- Roupe van der Voort, J. N. A. M., van der Vossen, E., Bakker, E., Overmars, H., van Zandvoort, P., Hutten, R., Klein Lankhorst, R. and Bakker, J. 2000. Two additive QTLs conferring broad-spectrum resistance in potato to *Globodera pallida* are localized on resistance gene clusters. *Theor. Appl. Genet.* 101: 1122-1130.
- Rousselle, P., Rousselle-Bourgeois, F. and François, J. 1989 Application de la culture in vitro au doublement chromosomique chez la Pomme de terre. p321-323. in:
- Rousselle-Bourgeois, F. and Rousselle, P. 1992. Création et sélection de populations diploïdes de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). *Agronomie* 12: 59-67.
- Rousselle-Bourgeois, F. and Mugniéry, D. 1995. Screening tuber-bearing *Solanum* spp. for resistance to *Globodera rostochiensis* Ro1 Woll. and *Globodera pallida* Pa2/3 Stone. *Potato Res.* 38: 241-249.
- Rousselle-Bourgeois, F. 1996. Amélioration génétique. 125-154. in: La pomme de terre. Rousselle, P., Robert, Y. and Crosnier, J. C., eds. INRA Editions (Paris).

- Ruffel, S., Dussault, M. H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C. and Caranta, C. 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.
- Ruiz De Galarreta, J. I., Carrasco, A., Salazar, A., Barrena, I., Iturritxa, E., Marquinez, R., Legorburu, F. J. and Ritter, E. 1998. Wild *Solanum* species as resistance sources against different pathogens of potato. *Potato Res.* 41: 57-68.
- Salmeron, J. M., Oldroyd, G. E. D., Rommens, C. M. T., Scofield, S. R., Kim, H. S., Lavelle, D. T., Dahlbeck, D. and Staskawicz, B. J. 1996. Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. *Cell (Cambridge)* 86: 123-133.
- Sasser, J. N. 1980. Root-knot nematodes: a global menace to crop production. *Plant Dis.* 64: 36-41.
- Schluter, K. 1976. The potato cyst eelworm *Heterodera rostochiensis* Woll. in Morocco: its distribution and economic importance. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 83: 401-406.
- Schorneck, S., Ballvora, A., Gurlebeck, D., Peart, J., Ganal, M., Baker, B., Bonas, U. and Lahaye, T. 2004. The tomato resistance protein Bs4 is a predicted non-nuclear TIR-NB-LRR protein that mediates defense responses to severely truncated derivatives of *AvrBs4* and overexpressed *AvrBs3*. *Plant Journal* 37: 46-60.
- Schouten, H. J. and Beniers, J. E. 1997. Durability of resistance to *Globodera pallida* I. Changes in pathogenicity, virulence, and aggressiveness during reproduction on partially resistant potato cultivars. *Phytopathology* 87: 862-867.
- Shapiro, S. S. and Wilk, M. B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52: 591-611.
- Shirasu, K. and Schulze-Lefert, P. 2003. Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease-resistance pathways. *Trends Plant Sci.* 8: 252-258.
- Sijmons, P. C., Atkinson, H. J. and Wyss, U. 1994. Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32: 235-259.
- Simons, G., Groenendijk, J., Wijbrandi, J., Reijans, M., Groenen, J., Diergaarde, P., Van der Lee, T., Bleeker, M., Onstenk, J., de Both, M., Haring, M., Mes, J., Cornelissen, B., Zabeau, M. and Vos, P. 1998. Dissection of the *Fusarium I2* gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *Plant Cell* 10: 1055.
- Smant, G., Stokkermans, J., Yan, Y. T., de Boer, J. M., Baum, T. J., Wang, X. H., Hussey, R. S., Gommers, F. J., Henrissat, B., Davis, E. L., Helder, J., Schots, A. and Bakker, J. 1998. Endogenous cellulases in animals: Isolation of beta-1,4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. *Proc. natl Acad. Sci. USA* 95: 4906-4911.
- Smith, P. G. 1944. Embryo culture of a tomato species hybrid. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci* 44: 413-416.
- Solomon-Blackburn, R. M. and Barker, H. 2001. Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches. *Heredity* 86: 17-35.
- Song, J. Q., Bradeen, J. M., Naess, S. K., Raasch, J. A., Wielgus, S. M., Haberlach, G. T., Liu, J., Kuang, H. H., Austin-Phillips, S., Buell, C. R., Helgeson, J. P. and Jiang, J. M. 2003. Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proc. natl Acad. Sci. USA* 100: 9128-9133.
- Spire, D. and Rousselle, P. 1996. Origine socio-historique. 25-48. in: *La pomme de terre*. Rousselle, P., Robert, Y. and Crosnier, J. C., eds. INRA Editions (Paris).
- Stone, A. R. 1972. *Heterodera pallida* n.sp. (*Nematoda* : *Heteroderidae*), a second species of potato cyst nematode. *Nematologica* 18: 591-606.

- Stone, L. E. W., Webley, D. P., Lewis, S. and Evans, E. B. 1973. The persistence of potato cyst eelworm (*Heterodera pallida* Stone) under different non-host regimes. *Plant Pathol.* 22: 181-183.
- Swiezynski, K. M. 1994. Inheritance of Resistance to Viruses. 339-363. in: *Potato Genetics*. Bradshaw, J.E. and Mackay, G.R., eds. CAB International, Wallingford, UK.
- Tameling, W. I. L., Elzinga, S. D. J., Darmin, P. S., Vossen, J. H., Takken, F. L. W., Haring, M. A. and Cornelissen, B. J. C. 2002. The tomato R gene products *I-2* and *Mi-1* are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *Plant Cell* 14: 2929-2939.
- Tanksley, S. D., Ganai, M. W., Prince, J. P., de Vicente, M. C., Bonierbale, M. W., Broun, P., Fulton, T. M., Giovannoni, J. J., Grandillo, S., Martin, G. B., Messeguer, R., Miller, J. C., Miller, L., Paterson, A. H., Pineda, O., Röder, M. S., Wing, R. A., Wu, W. and Young, N. D. 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132: 1141-1160.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Acids. Res.* 17: 6463-6471.
- Thabuis, A., Palloix, A., Pflieger, S., Daubèze, A. M., Caranta, C. and Lefebvre, V. 2003. Comparative mapping of *Phytophthora* resistance loci in pepper germplasm: evidence for conserved resistance loci across *Solanaceae* and for a large genetic diversity. *Theor. Appl. Genet.* 1006: 1473-1485.
- Thabuis, A., Lefebvre, V., Bernard, G., Daubèze, A. M., Pochard, E. and Palloix, A. 2004a. Phenotypic and molecular evaluation of a recurrent selection program for a polygenic resistance to *Phytophthora capsici* in pepper. *Theor. Appl. Genet.* 109: 342-351.
- Thabuis, A., Palloix, A., Servin, B., Daubèze, A. M., Signoret, P., Hospital, F. and Lefebvre, V. 2004b. Marker-assisted introgression of 4 *Phytophthora capsici* resistance QTL alleles into a bell pepper line: validation of additive and epistatic effects. *Mol. Breed.* 14: 9-20
- Thiery, M. 1996 Etude du polymorphisme biologique et moléculaire des nématodes à kyste des Solanacées. Thèse de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes.
- Tivoli, B. 1996a. Les pourritures sèches des tubercules en conservation : les fusarioses et la gangrène. 299-304. in: *La pomme de terre*. Rousselle, P., Robert, Y. and Crosnier, J. C., eds. INRA Editions (Paris).
- Tivoli, B. 1996b. Les flétrissement fongiques en végétation. 304-308. in: *La pomme de terre*. Rousselle, P., Robert, Y. and Crosnier, J. C., eds. INRA Editions (Paris).
- Trudgill, D. L. 1967. The effect of environment on sex determination in *Heterodera rostochiensis*. *Nematologica* 13: 263 - 272.
- Trudgill, D. L. 1991. Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 29: 167-192.
- Turner, S. J., Stone, A. R. and Perry, J. N. 1983. Selection of potato cyst-nematodes on resistant *Solanum vernei* hybrids. *Euphytica* 32: 911-917.
- Turner, S. J. 1989. New sources of resistance to potato cyst-nematodes in the Commonwealth Potato Collection. *Euphytica* 42: 145-153.
- Turner, S. J. and Fleming, C. C. 2000 The durability of resistant potato clones to potato cyst nematodes. p26. in: *Durable Disease Resistance Symposium*. Ede, Wageningen, The Netherlands. Nov. 28-Dec. 1, 2000.
- Turner, S. J. and Fleming, C. C. 2002. Multiple selection of potato cyst nematode *Globodera pallida* virulence on a range of potato species. I. Serial selection on *Solanum*-hybrids. *Europ. J. Plant Pathol.* 108: 461-467.

- Vaghchhipawala, Z., Bassuner, R., Clayton, K., Lewers, K., Shoemaker, R. and Mackenzie, S. 2001. Modulations in gene expression and mapping of genes associated with cyst nematode infection of soybean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 42-54.
- Van den Berg, J. H., Ewing, E. E., Plaisted, R. L., McMurry, S. and Bonierbale, M. W. 1996. QTL analysis of potato tuberisation. *Theor. Appl. Genet.* 93: 307-316.
- van der Biezen, E. A. and Jones, J. D. G. 1998. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends biochem. Sci.* 23: 454-456.
- Van der Hoeven, R., Ronning, C., Giovannoni, J., Martin, G. and Tanksley, S. 2002. Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant Cell* 14: 1441-1456.
- Van der Vossen, E. A. G., Rouppe van der Voort, J. N. A. M., Kanyuka, K., Bendahmane, A., Sandbrink, H., Baulcombe, D. C., Bakker, J., Stiekema, W. J. and Klein-Lankhorst, R. M. 2000. Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *Plant Journal* 23: 567-576.
- Van Eck, H. J., Rouppe van der Voort, J., Draaistra, J., van Zandvoort, P., van Enckevort, E., Segers, B., Peleman, J., Jacobsen, E., Helder, J. and Bakker, J. 1995. The inheritance and chromosomal localisation of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Mol. Breed.* 1: 397-410.
- Vercauteren, I., Van Der Schueren, E., Van Montagu, M. and Gheysen, G. 2001. *Arabidopsis thaliana* genes expressed in the early compatible interaction with root-knot nematodes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 288-299.
- Vercauteren, I., Engler, J. D., De Groot, R. and Gheysen, G. 2002. An *Arabidopsis thaliana* pectin acetyltransferase gene is upregulated in nematode feeding sites induced by root-knot and cyst nematodes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 404-407.
- Veremis, J. C. and Roberts, P. A. 1996a. Differentiation of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria* novel resistance phenotypes in *Lycopersicon peruvianum* and derived bridge-lines. *Theor. Appl. Genet.* 93: 960-967.
- Veremis, J. C. and Roberts, P. A. 1996b. Relationships between *Meloidogyne incognita* resistance genes in *Lycopersicon peruvianum* differentiated by heat sensitivity and nematode virulence. *Theor. Appl. Genet.* 93: 950-959.
- Veremis, J. C. and Roberts, P. A. 1996c. Identification of resistance to *Meloidogyne javanica* in the *Lycopersicon peruvianum* complex. *Theor. Appl. Genet.* 93: 894-901.
- Veremis, J. C., Heusden, A. W. v. and Roberts, P. A. 1999. Mapping a novel heat-stable resistance to *Meloidogyne* in *Lycopersicon peruvianum*. *Theor. Appl. Genet.* 98: 274-280.
- Veremis, J. C. and Roberts, P. A. 2000. Diversity of heat-stable genotype specific resistance to *Meloidogyne* in Maranon races of *Lycopersicon peruvianum* complex. *Euphytica* 111: 9-16.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids. Res.* 23: 4407-4414.
- Vos, P., Simons, G., Jesse, T., Wijbrandi, J., Heinen, L., Hogers, R., Frijters, A., Groenendijk, J., Diergaarde, P., Reijans, M., Fierens-Onstenk, J., de Both, M., Peleman, J., Liharska, T., Hontelez, J. and Zabeau, M. 1998. The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Nat. Biotechnol.* 16: 1365-1369.
- Wang, Z. H., Potter, R. H. and Jones, M. G. K. 2003. Differential display analysis of gene expression in the cytoplasm of giant cells induced in tomato roots by *Meloidogyne javanica*. *Mol. Plant Pathol.* 4: 361-371.

- Wenzel, G., Schieder, O., Przewozny, T., Sopory, S. K. and Melchers, G. 1979. Comparison of single cell culture derived *Solanum tuberosum* L. plants and a model for their application in breeding programs. *Theor. Appl. Genet.* 55: 49-55.
- Wenzel, G. and Uhrig, H. 1981. Breeding for nematode and virus resistance in potato via anther culture. *Theor. Appl. Genet.* 59: 333-340.
- Whitehead, A. G. 1991. Selection for virulence in the potato cyst-nematode, *Globodera pallida*. *Ann. appl. Biol.* 118: 395-402.
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. and Baker, B. 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to Toll and the interleukin-1 receptor. *Cell (Cambridge)* 78: 1101-1115.
- Williamson, V. M. and Hussey, R. S. 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell* 8: 1735-1745.
- Williamson, V. M. 1998. Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. *Ann. Rev. Phytopathol.* 36: 277-293.
- Williamson, V. M. and Gleason, C. A. 2003. Plant-nematode interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 327-333.
- Wollenweber, H. W. 1923. Krankheiten und Beschädigungen der Kartoffel. Arb Forschungsinst f Kartoffelbau Heft 7 Berlin.
- Wolters, P., Vinke, H., Bontjer, I., Rouppe van der Voort, J., Colon, L. and Hoogendoorn, C. 1999. Mapping of major genes for resistance to *Globodera pallida* in wild *Solanum* species. p362. in: *Plant & Animal Genome VII Conference*. San Diego, U.S.A. January 17-21, 1999.
- Wubben, M. J. E., Su, H., Rodermeil, S. R. and Baum, T. J. 2001. Susceptibility to the sugar beet cyst nematode is modulated by ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 1206-1212.
- Wyss, U., Grundler, F. M. W. and Munch, A. 1992. The parasitic behaviour of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica* 38: 98-111.
- Xie, C. and Xu, S. 2000. Mapping quantitative trait loci in tetraploid populations. *Genet. Res.* 76: 105-115.
- Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Wen, Y. and Williamson, V. M. 1995. Mapping a new nematode resistance locus in *Lycopersicon peruvianum*. *Theor. Appl. Genet.* 91: 457-464.
- Ye, Z. and Droste, D. L. 1996. Isolation and characterization of cDNAs encoding xylogenesis-associated and wounding-induced ribonucleases in *Zinnia elegans*. *Plant mol. Biol.* 30: 697-709.
- Yu, J., Hu, S. N., Wang, J., Wong, G. K. S., Li, S. G., Liu, B., Deng, Y. J., Dai, L., Zhou, Y., Zhang, X. Q., Cao, M. L., Liu, J., Sun, J. D., Tang, J. B., Chen, Y. J., Huang, X. B., Lin, W., Ye, C., Tong, W., Cong, L. J., Geng, J. N., Han, Y. J., Li, L., Li, W., Hu, G. Q., Huang, X. G., Li, W. J., Li, J., Liu, Z. W., Liu, J. P., Qi, Q. H., Liu, J. S., Li, T., Wang, X. G., Lu, H., Wu, T. T., Zhu, M., Ni, P. X., Han, H., Dong, W., Ren, X. Y., Feng, X. L., Cui, P., Li, X. R., Wang, H., Xu, X., Zhai, W. X., Xu, Z., Zhang, J. S., He, S. J., Zhang, J. G., Xu, J. C., Zhang, K. L., Zheng, X. W., Dong, J. H., Zeng, W. Y., Tao, L., Ye, J., Tan, J., Ren, X. D., Chen, X. W., He, J., Liu, D. F., Tian, W., Tian, C. G., Xia, H. G., Bao, Q. Y., Li, G., Gao, H., Cao, T., Zhao, W. M., Li, P., Chen, W., Wang, X. D., Zhang, Y., Hu, J. F., Liu, S., Yang, J., Zhang, G. Y., Xiong, Y. Q., Li, Z. J., Mao, L., Zhou, C. S., Zhu, Z., Chen, R. S., Hao, B. L., Zheng, W. M., Chen, S. Y., Guo, W., Li, G. J., Liu, S. Q., Tao, M., Zhu, L. H., Yuan, L. P. and Yang, H. M. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp *indica*). *Science* 296: 79-92.
- Zeng, Z. B. 1993. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10972-10976.

- Zeng, Z. B. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136: 1457-1468.
- Zimnoch-Guzowska, E. and Dziejowska, M. A. 1989. Breeding potato at diploid level. 163-171. in: Parental line breeding and selection in potato breeding. Louwes, K.M. ed. Pudoc. Wageningen (NL)
- Zimnoch-Guzowska, E., Marczewski, W., Lebecka, R., Flis, B., Schafer-Pregl, R., Salamini, F. and Gebhardt, C. 2000. QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* in potato done by AFLP, RFLP, and resistance-gene-like markers. *Crop Sci.* 40: 1156-1167.

Thèse Bernard Caromel (2004)

Cartographie génétique et étude fonctionnelle de QTL conférant la résistance au nématode à kyste *Globodera pallida* (Stone) chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L.)

Le nématode à kyste *Globodera pallida* est un parasite de la pomme de terre dont la prolifération est difficile à contrôler dans les conditions européennes de culture. Il n'existe pas de sources de résistance de niveau satisfaisant dans l'espèce cultivée *Solanum tuberosum*, et la plupart des sources de résistance connues, originaires d'espèces sauvages de *Solanum* tubéreuses, sont à déterminisme oligogénique ou polygénique. L'objectif de ce travail est de cartographier les facteurs génétiques de résistance à *G. pallida* originaires de deux espèces sauvages, d'évaluer le mode d'action et la participation de chaque facteur génétique à l'expression de la résistance globale, et d'évaluer le spectre d'action conféré par l'association des différents facteurs génétiques.

Le déterminisme génétique de la résistance à *G. pallida* a été étudié dans deux descendance diploïdes de pomme de terre comportant 117 et 239 d'individus. Les parents sensibles sont des clones dihaploïdes de *S. tuberosum* (*tbr*). Les parents résistants sont des clones des espèces sauvages *S. spgazzinii* (*spg*) et *S. sparsipilum* (*spl*). Une carte de liaisons génétiques de chaque parent a été construite, et tous les clones de chaque descendance ont été testés pour leur résistance à *G. pallida*. Une analyse QTL (Quantitative Trait Loci) a permis de disséquer la résistance globale en facteurs génétiques individuels, localisés sur le génome de chaque parent. Sept QTL de résistance ont été cartographiés : deux sur les chromosomes V et XI de *spl*, trois sur les chromosomes V, VI, et XII de *spg*, et deux sur les chromosomes VIII et XI de *tbr*. Les deux QTL cartographiés sur les chromosomes V de *spl* et *spg* montrent un effet majeur ($R^2 = 76\%$ et 48%), les cinq autres QTL détectés montrent un effet mineur (R^2 compris entre 4 et 13 %).

Le mode d'action des QTL de résistance sur le développement des juvéniles d'une population de *G. pallida*, ainsi que leur efficacité face à sept autres populations, ont été évalués sur un ensemble de clones de pomme de terre, choisis dans les descendance de cartographie en fonction de leurs combinaisons alléliques aux QTL. Une plante est considérée comme résistante, si elle diminue le potentiel de reproduction (les femelles) du nématode. La résistance conférée par tous les QTL provoque une inversion du sexe-ratio dans la population de *G. pallida* en faveur des mâles. Quand les deux QTL originaires de *spl* sont présents ensemble dans un même clone, ils présentent la particularité d'induire une nécrose autour des nématodes, et un arrêt du développement de la majorité d'entre eux, les autres ne formant que des mâles. Le QTL à effet majeur originaire de *spl* confère un niveau de résistance différent selon la population de *G. pallida* étudiée. Le QTL mineur originaire de *spl*, et l'association d'au moins deux QTL, ne montrent pas d'effet "population-spécifique".

Les QTL de résistance à *G. pallida* vont être pris en compte dans les programmes de sélection grâce aux marqueurs PCR développés au cours de cette thèse. Le choix des QTL à associer sera fait en fonction du niveau de résistance qu'ils confèrent à différentes populations de *G. pallida*. Les outils et les informations résultant de cette thèse permettront de créer des variétés de pomme de terre possédant une résistance durable à *G. pallida*.

Mots-clés : pomme de terre, *Solanum tuberosum*, nématode à kyste, *Globodera pallida*, cartographie génétique, QTL, résistance.