



HAL
open science

Recherche et validation de résistances génétiques au dépérissement bactérien causé par *Pseudomonas syringae* chez l'abricotier (*Prunus armeniaca* Linné)

Morgane Roth

► **To cite this version:**

Morgane Roth. Recherche et validation de résistances génétiques au dépérissement bactérien causé par *Pseudomonas syringae* chez l'abricotier (*Prunus armeniaca* Linné). Sciences agricoles. 2013. dumas-00906721

HAL Id: dumas-00906721

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00906721v1>

Submitted on 20 Nov 2013

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.



AGROCAMPUS OUEST
Centre de Rennes
64 rue de Saint Briec
35 042 Rennes Cedex



**INRA - Unité de Recherche en
Génétique et Amélioration des
Fruits et Légumes**
Domaine Saint Maurice
67, Allée des chênes
CS 60094
F-84143 Montfavet cedex

Mémoire de Fin d'Études

**Diplôme d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences
Agronomiques, Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage**

Année universitaire : 2012-2013

Spécialité : Productions végétales

Spécialisation ou option : Amélioration des plantes

**Recherche et validation de résistances génétiques au dépérissement
bactérien causé par *Pseudomonas syringae* chez l'abricotier (*Prunus
armeniaca* Linné)**

Par : **Morgane ROTH**

volet à renseigner par l'enseignant responsable de l'option/spécialisation*
définitive)

ou son représentant

Date : .../.../... Signature

Oui Non

Bon pour dépôt (version

Autorisation de diffusion :

Devant le jury :

Soutenu à Rennes, le 12/09/2013

Sous la présidence de : Maria Manzanares-Dauleux

Maître de stage : **Jean-Marc Audergon**

Enseignant référent : Maria Manzanares-Dauleux

Autres membres du jury (Nom, Qualité) : Mélanie Jubault (maître de conférence à Agrocampus Ouest, centre de Rennes), Anne Laperche (maître de conférence Agrocampus Ouest, centre de Rennes)

*"Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent
que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST".*

Fiche de confidentialité et de diffusion du mémoire

Cadre lié à la confidentialité :

Aucune confidentialité ne sera prise en compte si la durée n'en est pas précisée.

Préciser les limites de la confidentialité ⁽²⁾ :

➤ Confidentialité absolue : oui non

(ni consultation, ni prêt)

Si oui

1 an 5 ans 10 ans

Le maître de stage⁽⁴⁾,

Cadre lié à la diffusion du mémoire :

A l'issue de la période de confidentialité et/ou si le mémoire est validé diffusable sur la page de couverture, il sera diffusé sur les bases de données documentaires nationales et internationales selon les règles définies ci-dessous :

Diffusion de la version numérique **du mémoire** : oui non

Référence bibliographique diffusable⁽³⁾ : oui non

Résumé diffusable : oui non

Mémoire papier consultable sur place : oui non

Reproduction autorisée du mémoire : oui non

Prêt autorisé du mémoire papier : oui non

.....
Diffusion de la version numérique **du résumé** : oui non

☞ Si oui, l'auteur⁽¹⁾ complète l'autorisation suivante :

Je soussigné(e) _____, propriétaire des droits de reproduction dudit résumé, autorise toutes les sources bibliographiques à le signaler et le publier.

Date :

Signature :

Rennes/Angers, le

L'auteur⁽¹⁾,

L'enseignant référent
ou son représentant

(1) auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études

(2) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation d'AGROCAMPUS OUEST s'engagent à respecter cette confidentialité.

(3) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option)) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé.

(4) Signature et cachet de l'organisme

Remerciements

C'est avec grand plaisir que j'adresse mes remerciements aux personnes qui m'ont soutenue et aidée pendant ce travail. Tout d'abord un grand merci à Jean Marc AUDERGON, pour son accueil, sa disponibilité, sa bienveillance et ses innombrables qualités humaines qui ont fait de stage une réelle formation scientifique et professionnelle. J'ai eu grand plaisir à travailler avec Guillaume ROCH qui m'a conseillée et appuyée dans l'ensemble de mes démarches (tout en sifflotant, même les jours de pluie). Guy CLAUZEL et Alain BLANC, hommes de terrain, ont largement contribué à ce travail par leur grande expérience et leur recul sur la culture de l'abricotier, sa sélection et sa diversité, et la grande pédagogie avec laquelle ils la partagent. Merci à Lucia pour son regard porté sur mon travail et sa participation aux inoculations et aux lectures (et son accent chantant), ainsi qu'à Eric (pour son accent local), Jean (pour les blagues), Martin (pour le café philo), Laurent, Simon et Anne-Marie. Merci à Solenne et Marion pour leur aide sur le terrain et leur gentillesse.

Ce travail n'aurait pas été aussi riche sans une profonde coopération avec l'équipe de phytopathologie d'Avignon, en particulier grâce aux conseils de Cindy MORRIS et Jay Ram LAMICHHANE, et à l'appui technique de Charlotte CHANDEYSSON. Côté bioinformatique, merci à Fabienne WONG et Jean Paul BOUCHET pour leur aide au traitement des données surabondantes de génotypage. Enfin, je souhaite remercier tout particulièrement Christopher SAUVAGE pour s'être rendu disponible à maintes reprises, pour sa patience et ses conseils en or massif en matière de génétique d'association et d'orientation scientifique.

Un grand merci à toute l'équipe pédagogique de la spécialité amélioration des plantes d'Agrocampus Ouest, en particulier Maria MANZANARES-DAULEUX, Anne LAPERCHE et Mélanie JUBAULT qui ensemble animent un master très bien conçu, intense, et ouvrant de belles opportunités pour la suite.

De manière plus personnelle, je tiens à te remercier, Darko, car tu t'es joint à ma passion tout au long de mon stage, et tu t'es familiarisé à un domaine qui n'était pas le tien !

Les amis de l'agro de Rennes, qui certes dispersés et dissipés parviennent toujours à se réunir, comme une loi physique. Les amis d'Avignon, Charlotte, Severin, Romain, Sam, à la réplique fine, et mes très chers colocataires Cyril et Arthur qui ont fait du quotidien un petit bonheur !

Et pour la fin, je reconnais auprès de mes parents et de mes frères tout l'amour que je leur dois. Ils m'ont permis d'étudier, de m'épanouir et de trouver ma voie dans l'amélioration des plantes. A mon père, qui sans le vouloir nous a transmis à tous les trois une vocation dans l'agriculture et la foi dans l'innovation scientifique. A ma mère, par sa sagesse, au centre de tout !

Sans oublier les cigales.

Table des matières

Glossaire et liste des acronymes.....	0
I. Contexte, problématique et objectifs du travail mené.....	2
I.1. Description de l'espèce <i>Prunus armeniaca</i> , l'abricotier.....	2
I.1.1. Caractérisation taxonomique et génétique.....	2
I.1.2. Origines.....	2
I.1.3. Biologie, contraintes biotiques et abiotiques en culture.....	3
I.2. Le chancre bactérien, un facteur limitant de la production d'abricots en France.....	3
I.2.1. La production française d'abricots.....	3
I.2.2. Des dégâts économiquement importants causés par le dépérissement bactérien.....	3
I.2.3. Vers une réorientation des objectifs de sélection.....	4
I.3. <i>Pseudomonas syringae</i> , l'agent responsable du chancre bactérien.....	4
I.3.1. Premières observations, situation mondiale, et symptômes.....	4
I.3.2. Caractérisation de l'agent pathogène : <i>Pseudomonas syringae</i>	5
I.3.3. Epidémiologie du dépérissement bactérien.....	5
I.3.4. Mécanismes impliqués dans le pouvoir pathogène de <i>P. syringae</i>	6
I.4. Facteurs influençant les symptômes et les dégâts.....	7
I.5. Objectifs de travail.....	8
II. Matériels et méthodes.....	9
II.1. Matériel végétal.....	9
II.2. Dispositif expérimental.....	9
II.3. Inoculations.....	10
II.4. Notations.....	10
II.5. Génotypage.....	11
II.6. Traitement statistique des données.....	11
III. Résultats.....	13
III.1. Analyse de la résistance à <i>Pseudomonas syringae</i> des rameaux et feuilles des populations d'abricotier à l'aide des données de phénotypage.....	13
III.1.1. Analyse des réactions aux inoculations sur rameaux.....	13
III.1.2. Analyse des réactions aux inoculations sur feuilles.....	14
III.1.3. Lien entre les réactions observées sur les rameaux et les feuilles dans le panel de ressources génétiques constitué de 76 accessions.....	15
III.2. Analyse des données de génotypage et détection de zones d'intérêt pour la résistance à <i>Pseudomonas syringae</i>	15
III.2.1. Analyse de liaison sur les variables observées sur rameaux et feuilles dans deux populations biparentales.....	15
III.2.2. Analyse d'association sur les variables observées sur rameaux et feuilles dans le panel de RG constitué de 76 accessions re-séq.uencées.....	16
IV. Discussion.....	18
IV.1. Réponses aux objectifs de travail initiaux.....	18
IV.2. Connaissance apportées sur les mécanismes de résistance au dépérissement bactérien de l'abricotier.....	19
IV.3. Complémentarité des résultats des populations hybrides et du panel de diversité.....	21
IV.4. Analyse critique des dispositifs expérimentaux mobilisés et pistes d'amélioration.....	22
IV.5. Stratégie à mettre en place pour lutter contre la maladie et contribuer à l'amélioration variétale de l'abricotier.....	23
Index bibliographique.....	26

Glossaire et liste des acronymes

ABRIWG : projet ANR de génomique comparative et fonctionnelle de la résistance à la sharka et des besoins en froid chez les arbres fruitiers à noyaux

ACP : Analyse en Composantes Principales

Agressivité : Quantification de la capacité de l'agent pathogène à causer des dégâts sur son hôte

ANR : Agence Nationale de la Recherche

BerBa : population biparentale Bergeron x Bakour

bi : mesure de brunissement interne des rameaux (code couleur conservé dans le rapport)

bs : mesure de brunissement superficiel des rameaux (code couleur conservé dans le rapport)

Charpentières : branches principales qui constituent structurent l'arbre

DL : Déséquilibre de Liaison : association non aléatoire entre des allèles à des loci différents

FDR : False Discovery Rate – Taux de fausses découvertes

GAFL : Unité de Recherche Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes de l'INRA, Institut National de Recherche Agronomique

GoMo : population biparentale Goldrich x Moniqui

GBS : Genotyping By Sequencing : méthode de séquençage permettant de réduire la complexité du génome par l'emploi d'enzymes de restriction

GLM : Generalized Linear Model – Modèle linéaire généralisé

Intéactions G×E : interactions entre génotype et environnement

lgc : longueur de chancre apparente (code couleur conservé dans le rapport)

lge : longueur de la blessure ouverte issue de l'entaille. Mesure la lésion corticale ouverte à l'extérieur (code couleur conservé dans le rapport)

Méplat : symptôme de dépérissement bactérien provoqué par la destruction locale des tissus cambiaux d'un rameau, formant une zone d'aplatissement caractéristique

Pseudo-F1 : 1^{ère} génération issue de parents qui ne sont pas des lignées pures

Pss : bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

Pathogénicité : capacité d'un organisme à provoquer une maladie, quantifiée par la virulence

SAM : Sélection Assistée par Marqueurs

Semis : arbre sur ses propres racines, autrement dit variété non greffée

sevmoy : Note de sévérité moyenne des symptômes observés sur feuilles, obtenue à partir des notations de 0 à 5 sur feuilles, chaque note reflétant une gamme de pourcentage de nécrose observé

sevméd : Note de sévérité des symptômes observés sur feuilles reflétant le pourcentage de nécrose réel, basé sur une moyenne de la médiane des classes représentées par les notes de sévérité de 0 à 5

sevreglog : Note de sévérité des symptômes observés sur feuilles obtenue à l'aide du modèle de régression logistique multinomiale basé sur les notes de sévérité de 0 à 5

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SSR : Single Sequence Repeat, type de marqueur à motif répétitif

RG : Ressources génétiques

RLM : modèle de régression logistique multinomiale

Virulence : capacité d'un agent pathogène à attaquer un certain nombre d'hôtes, à s'y multiplier et à entraîner des symptômes

UFC : Unité Formant Colonie, unité de quantification des bactéries en suspension titrée

UMR : Unité Mixte de Recherche

UR : Unité de Recherche

Liste des figures :

Figure 1 : Distributions de l'intensité des symptômes de sensibilité suite à une inoculation bactérienne (méthode Prunier, Pss, souche 41A), mesurés sur rameaux au sein de la population hybride Bergeron × Bakour (224 individus) en 2012 et en 2013.	1
Figure 2 : Représentations synthétiques des données de sensibilité tissulaire mesurées sur rameaux suite à une inoculation bactérienne (méthode Prunier, Pss, souche 41A) - ACP des variables mesurées en 2012 et 2013 sur rameaux au sein de la population Bergeron × Bakour.	13
Figure 3 : Distributions de l'intensité des symptômes mesurés après inoculation tissulaire sur rameaux (méthode Prunier, Pss, souche 41A) au sein de la collection (587 accessions).....	13
Figure 4 : Distributions des notes de sévérité des symptômes sur feuilles observés après inoculation au sein de la population hybride Goldrich × Moniqui de 196 individus (Pss, souche 41A).	13
Figure 5 : Distributions des notes de sévérité des symptômes sur feuilles observées après inoculation dans le panel des Ressources Génétiques reséquencées, (76 accessions) de la souche 41A (Pss).....	13
Figure 6 : Représentation synthétique des données de sensibilités bactérienne sur rameaux et feuilles - ACP sur l'ensemble des variables mesurées sur feuilles et rameaux sur 76 accessions du panel de Ressources Génétiques reséquencées.	13
Figure 7 : Représentation graphique des valeurs de LOD score obtenues par détection de QTL sur la carte génétique du parent Goldrich pour les symptômes de sensibilité bactérienne sur feuilles dans la population hybride Goldrich × Moniqui de 196 individus.	14
Figure 8 : Structure populationnelle de 76 accessions d'abricotier et lien avec les variables de résistance à <i>P. syringae</i> mesurées après inoculation (Pss, souche 41A).	14
Figure 9 : Résultats de l'analyse d'association pour la variable Igc au sein d'un panel de 76 accessions et de 7939 SNPs A: QQ plot représentant la distribution des pvaleurs obtenues selon les 3 modèles testés et permettant de comparer les différents modèles testés	14
Figure 10 : Motif du déséquilibre de liaison (DL) et des valeurs de P autour de deux marqueurs SNPs présentant chacun une forte association avec les variables mesurées sur rameaux et feuilles inoculés..	14

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Synthèse du dispositif expérimental visant à caractériser les réactions après inoculation de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> (isolat K41) sur rameaux et sur feuilles dans différents types de population d'abricotier.	10
Tableau 2 : Synthèse des analyses statistiques effectuées suite aux inoculations des rameaux au sein de la population hybride Bergeron × Bakour (méthode Prunier, 5 répétitions, 224 individus)	1
Tableau 3 : Synthèse des analyses statistiques effectuées suite aux inoculations de <i>Pseudomonas syringae</i> sur rameaux au sein de la collection (586 individus) de ressources génétiques.	14
Tableau 4 : Caractéristiques du jeu de SNPs obtenu après un filtre sur le polymorphisme et la position des marqueurs au sein des gènes.	14
Tableau 5 : Déséquilibre de liaison moyen marqueurs deux à deux (r^2) et écart-type sur l'ensemble des chromosomes calculé pour 76 accessions à l'aide de 7939 SNPs par Plink!.....	17

Introduction

L'abricotier appartient au genre *Prunus*, regroupant de nombreuses espèces d'importance économique pour la production de fruits à noyau, telles que le pêcher, le prunier, le cerisier et l'amandier. La production française bénéficie à la fois d'une forte identité régionale et d'une bonne commercialisation à l'étranger. La sélection de l'abricotier amorcée dans les années 1960 par l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) s'est dans un premier temps focalisée sur l'allongement du calendrier de production, sur la régularité des rendements et sur la qualité. Mais face aux dégâts importants causés par les bioagresseurs et dans un souci de sécuriser et de pérenniser la filière, elle se tourne aujourd'hui davantage vers l'amélioration de la résistance aux maladies. Parmi celles qui touchent l'abricotier, le dépérissement bactérien causé par la bactérie *Pseudomonas syringae* (aussi appelé chancre bactérien ou bactériose), est la première cause de mortalité en vallée du Rhône et plus largement dans l'ensemble des pays aux conditions hivernales humides et froides. Dans ce contexte la modernité des cultivars français, perçue comme un atout devient une faiblesse pour la filière, car la majeure partie d'entre eux sont sensibles à cette maladie. En causant le dessèchement des rameaux, voire de l'arbre entier, une année peut suffire à *Pseudomonas syringae* pour détruire un jeune verger. L'absence de solution phytosanitaire, le caractère cyclique et imprévisible des dégâts ainsi que l'importance des zones à risques pour la production se traduit par une demande de la filière basée sur la création de variétés résistantes et de leur exploitation dans des programmes d'innovation appropriés. Pour créer des variétés résistantes, un préalable réside dans l'identification et la caractérisation de composantes génétiques liées à la résistance chez l'abricotier, donc dans l'étude de leur hérédité et dans l'identification et la localisation de marqueurs liés à la résistance à la maladie au sein du génome de l'hôte. Nous nous proposons d'aborder cette étude à travers deux mécanismes potentiels de résistance à la bactérie préalablement identifiés par des pathologistes et impliqués dans sa vascularisation et dans l'induction de réaction locales dans deux types d'organes que sont les rameaux et les feuilles. Des populations de cartographie et un large panel de ressources génétiques génotypées seront inoculées par *Pseudomonas syringae* et leur réaction sera phénotypée. Elles seront génotypées à l'aide de marqueurs moléculaires de type SSR (Single Sequence Repeat) ou SNP (Single Nucleotide Polymorphism) et constitueront ainsi le support d'analyses de liaison et d'association ou Genome Wide Association Study (GWAS) permettant la découverte de Quantitative Trait Loci (QTLs) sous-jacents à l'architecture génétique des mécanismes de résistance ou sensibilité à la maladie. Ces deux approches sont complémentaires et nous permettront pour la première fois de valider l'hérédité du caractère de résistance, d'apprécier sa diversité et d'en disséquer les supports génétiques. Nous étudierons également pour la première fois le déséquilibre de liaison à l'échelle du génome chez cette espèce. Une discussion au terme de ce travail permettra d'évaluer les retombées en termes d'innovation variétale.

Mots-clés : *Prunus* – Abricotier – Dépérissement bactérien – *Pseudomonas syringae* – Vascularisation - Inoculation - Single Sequence Repeat – Single Nucleotide Polymorphism - QTL – Génétique d'association – Déséquilibre de liaison – Génomique.

I. Contexte, problématique et objectifs du travail mené

I.1. Description de l'espèce *Prunus armeniaca*, l'abricotier

I.1.1. Caractérisation taxonomique et génétique

L'abricotier (*Prunus armeniaca* L.) appartient à la famille des Rosaceae (Prunoideae), au genre *Prunus* L. (*Prunophora* (Neck) Focke) et à la section *Armeniaca* (Lam.) Koch (Rehder, 1949). Les Rosaceae sont la famille la plus importante pour la production de fruits et le genre *Prunus* regroupe les fruits à noyaux tels que l'amandier (*P. dulcis*), le cerisier (*P. avium* et *P. cerasus*), le pêcher (*P. persica* L. Batsch) et le prunier (*P. domestica* et *P. salicina*). Les abricotiers sont regroupés dans la section *Armeniaca* qui compte à ce jour cinq espèces, dont ***Prunus armeniaca***, l'abricotier commun. D'origine **allogame**, l'abricotier est une espèce fortement hétérozygote. Il est **diploïde** avec (**2n=16**) et possède un génome de petite taille, caractéristique des Rosaceae, de **295 mégabases** (Mb) (Arumuganathan, Earle 1991). Les génomes diploïdes au sein du genre *Prunus* sont très colinéaires et ce dernier peut être considéré du point de vue génétique commune une seule entité (Dirlewanger 2004). Au plan génétique, le génome du pêcher est le mieux caractérisé à ce jour parmi les *Prunus* et l'un des mieux connus de tous les arbres feuillus ; sa séquence a récemment été publiée (Verde et al. 2013, http://www.rosaceae.org/species/prunus_persica/genome_v1.0). Les hybridations à l'intérieur des sous-genres se font facilement, et donnent la plupart du temps des matériels fertiles, sauf entre pêcher et abricotier. Elles ont notamment conduit à l'émergence de nouveaux types de fruits comme les plumcot, pluot et aprium (Gomez, Ledbetter 1993) et/ou ces croisements ont été réalisés pour l'étude et le transfert de caractères d'intérêt tels que la résistance aux nématodes (Dirlewanger 2004; Lecouls et al. 2004). Les caractères d'auto-fertilité et de résistance à la Sharka (maladie virale) ont ainsi été cartographiés chez l'abricotier et commencent à être contrôlés par sélection assistée par marqueurs (Hurtado et al. 2002; Lambert et al. 2006; Pinar et al. 2013; Vilanova et al. 2003). L'espèce la plus proche de l'abricotier reste *Prunus mume* Sieb et Zucc, arbre ornemental populaire et très étudié en Asie, dont la séquence a récemment été assemblée (Zhang et al. 2012).

I.1.2. Origines

Par son nom latin *P. armeniaca*, il a longtemps été suggéré en Europe que l'abricotier était d'origine arménienne. C'est certainement une région impliquée dans l'introduction des abricots en Europe mais l'origine même de l'espèce est à chercher plus loin. Vavilov (1951) fut le premier à donner les motifs de diversification des plantes cultivées, en indiquant trois centres d'origine principaux : la Chine centrale, l'Asie centrale et le Proche-Orient. Jusqu'à aujourd'hui, l'abricotier ne se soustrait pas à cette hypothèse. Des écrits chinois cités par De Candolle (1886) font référence à la culture de l'Abricotier à la fin du troisième millénaire av. JC. Celui-ci aurait été introduit mille ans plus tard en Asie centrale (Zhebentyayeva et al. 2012). Yilmaz et Gurcan (2012) donnent une synthèse des travaux réalisés sur la diversité de l'abricotier jusqu'à aujourd'hui, permettant de distinguer 6 à 8 groupes éco-géographiques : Asie Centrale, région Irano-Caucasienne, Dzunggar-Zailig, Chine du Nord, Chine de l'Est, Tibet et Nord Est de la Chine (Bailey et Hough 1975; Kostina 1969). Les variétés françaises sont pour la plupart issues soit d'Afrique du Nord, soit d'Europe de l'Est (Hagen et al. 2002; Bourguiba et al. 2012).

I.1.3. Biologie, contraintes biotiques et abiotiques en culture

L'abricotier est un arbre entomophile et allogame. L'allogamie est engendrée par un mécanisme d'auto-incompatibilité d'ordre gamétophytique (Szabo et Nyéki 1991). Toutefois, la proximité des organes mâle et femelle et l'existence de mutations dans le gène contrôlant l'auto-incompatibilité ont probablement contribué à sélectionner des génotypes auto-compatibles (Halász et al, 2005). Ceci permet d'assurer la fécondation lorsque les conditions sont défavorables aux insectes, et contribue à stabiliser la production de certaines régions. Il existe à la fois une très forte dépendance des cultivars aux conditions de températures et une très forte variabilité des besoins en froid et en chaleur, ce qui fait qu'à l'échelle d'un pays comme la France, chaque variété est souvent inféodée à une zone pédo-climatique restreinte. Dans la production arboricole, les cultivars sont greffés sur des porte-greffes de type *Prunus* permettant bien souvent d'étendre l'aire de culture de l'abricotier à différents types de sols, d'apporter des sources de résistance aux stress et d'homogénéiser la vigueur en verger (Lichou et Jay 2012). Les principaux stress biotiques touchant l'abricotier sont **les maladies d'origine bactériennes** comme le chancre ou dépérissement bactérien et les maladies à *Xanthomonas*, **les maladies à virus et mycoplasmes**, principalement l'ECA (Enroulement Chlorotique de l'abricotier) et la Sharka, (maladie de quarantaine), et **les maladies cryptogamiques**, telles que le monilia, la verticilliose et l'oïdium. Actuellement, les principaux bioagresseurs limitant de la production en France sont le dépérissement bactérien causé par *Pseudomonas syringae* et le monilia causé par *Monilia laxa* (Lichou et Jay 2012).

I.2. Le dépérissement bactérien, un facteur limitant de la production d'abricots

I.2.1. La production d'abricots en France et dans le monde

La production d'abricots est localisée en zone tempérée et particulièrement bien développée en Asie. Les principaux producteurs mondiaux d'abricots sont la Turquie, l'Iran, l'Ouzbékistan, l'Algérie et le Pakistan, avec une production supérieure à 200 000 tonnes par an (FAOSTAT 2012). A titre de comparaison, l'Europe entière produit actuellement près de 650 000 tonnes par an, dont 93% dans six pays : l'Italie, la France, l'Espagne, la Grèce, la Roumanie et la Hongrie (FranceAgriMer, 2011). La particularité de l'Europe est la large part des échanges pour ce produit, constituant deux tiers des échanges mondiaux. C'est ainsi que la France se place au premier rang mondial des exportations d'abricots frais. En 2012, la production d'abricots s'étalait sur 14 000 hectares concentrés dans quatre bassins que sont le Languedoc-Roussillon, la Provence, les Pyrénées Orientales et la vallée du Rhône. La récolte se fait successivement dans ces quatre régions, de fin juin à début août, et s'appuie sur une trentaine de variétés.

I.2.2. Des dégâts économiquement importants causés par le dépérissement bactérien

La France pratique un renouvellement variétal supérieur à ses voisins avec 27% de vergers de moins de 5 ans. L'apport de nouvelles variétés et de nouvelles méthodes culturales a permis une extension continue de la zone de culture d'abricotier depuis les années 1960. Cependant, ce développement s'est accompagné de l'aggravation (Prunier et al. 2005) ou de l'apparition de nouvelles maladies telles que le dépérissement bactérien (Scortichini 2010). Ces dernières années, des procédures de soutien d'urgence ont été sollicitées pour les calamités agricoles causées par cette maladie, en lien notamment avec des conditions climatiques favorables (hivers froids et humides). Dans de telles conditions, la maladie peut entraîner la perte de vergers entiers comme cela a été le cas pour les années 1996, 97 et 99 ainsi que 2000, 04, 05, 08, 09, et 2010 en Vallée du Rhône.

I.2.3. Vers une réorientation des objectifs de sélection

Dès les années 1980, l'amélioration variétale de l'abricotier entreprise par l'INRA se focalisa d'abord sur la stabilisation de la production et sur les attentes du consommateur (Audergon et Clauzel, communication personnelle) :

- **En allongeant le calendrier de production** pour faire de l'abricot un fruit présent plus longtemps sur les étals, ayant aussi pour effet auprès des arboriculteurs de pouvoir diversifier et sécuriser leur production,
- **En régularisant la production**, en limitant effets des aléas climatiques en incorporant l'autofertilité des cultivars et en sélectionnant sur une floribondité plus faible,
- **En favorisant la sélection de variétés de bonne qualité** organoleptique et technologique.

Aujourd'hui, l'activité de création variétale initiée par l'INRA se tourne davantage vers la sécurité et la durabilité de la production en donnant une priorité à la rusticité des variétés, et en particulier à la résistance aux maladies. La période des années 1990 à aujourd'hui a été marquée par la lutte contre la Sharka, virus de quarantaine, pendant laquelle l'amélioration approche génétique a été mobilisée. Cependant, d'autres maladies mettent en péril la filière, comme c'est le cas du dépérissement bactérien dans la Vallée du Rhône, ce qui justifie son intégration dans les programmes de sélection. Les variétés actuelles sont largement sensibles à la maladie et peu de sources de résistance sont connues. D'autre part, le caractère cyclique et imprévisible des dégâts vient complexifier l'observation des comportements variétaux. Pour pouvoir envisager de sélectionner efficacement contre l'agent pathogène en question il faut :

- **le caractériser** le plus précisément possible et évaluer sa diversité,
- **identifier les facteurs de risque** de la maladie pour les contrôler,
- **caractériser la résistance variétale et sa variabilité**,
- **évaluer l'hérédité de ce caractère** et maîtriser sa transmission.

Nous allons maintenant faire la synthèse des connaissances acquises sur chacun de ces points.

I.3. *Pseudomonas syringae*, l'agent responsable du dépérissement bactérien

I.3.1. Premières observations, situation mondiale, et symptômes

P. syringae est à l'origine de différentes maladies d'arbres fruitiers dont l'une des plus notoires est le chancre bactérien sur les *Prunus* (Kennelly et al. 2007). La maladie a été caractérisée dès le début du XXe siècle, et déjà citée comme la première cause de mortalité des abricotiers en Rhône Alpes par Chabrolin en 1922, tandis qu'elle sévit à cette même époque sur de nombreux *Prunus* dans les vergers californiens (English et al. 1977) et dès 1954 en Nouvelle Zélande (Young 1987). Chez le pêcher, la première observation en France date de 1967 (Luisetti 1983) tandis que chez le prunier, des pertes majeures sont enregistrées en Allemagne depuis les années 1990 (Hinrichs-Berger, 2004). L'ensemble des organes aériens de l'arbre peuvent présenter des symptômes liés au dépérissement bactérien tels que :

- **Sur rameaux et charpentières** (tiges) : des tâches noires et huileuses qui apparaissent en hiver suivies de la formation au printemps d'un méplat (zone d'aplatissement) qui peuvent évoluer en blessure ouverte. A l'intérieur, les vaisseaux sont dégradés et brunissent en longueur à partir de la zone infectée.
- **Sur feuilles** : des tâches liégeuses et des criblures qui apparaissent au printemps, allant du brun clair au brun foncé et pouvant être entourées d'un halo jaunâtre. Le tissu nécrosé peut alors se séparer de l'organe, phénomène appelé « shot-hole ».

Les symptômes sur rameaux et charpentières sont les plus courants et les plus préoccupants en termes de production. Ils sont fréquemment accompagnés d'une exsudation de gomme qui, même si elle peut être impressionnante, n'est pas caractéristique de la maladie. Lorsque les

tiges sont touchées, soit la croissance de l'arbre entraînera la cicatrisation et donc la limitation de la zone touchée, maintenant la vascularisation (Erikson 1945), soit un dessèchement complet fera suite à un flétrissement des parties supérieures à la zone endommagée. Dans ce dernier cas, deux scénarii sont envisageables à l'échelle de l'arbre :

- Dans le cas où les charpentières sont touchées, on peut s'attendre à une mort rapide de l'arbre dès la réactivation des tissus au printemps,
- Les rameaux de l'année précédente se desséchant complètement, les rameaux de l'année peuvent prendre la relève s'ils sont assez vigoureux.

I.3.2. Caractérisation de l'agent pathogène : *Pseudomonas syringae*

Les agents pathogènes responsables de la maladie chez l'abricotier ont été identifiés, ce sont trois lignées endémiques de *Pseudomonas* (Prunier, Cotta 1987; Edin et al. 2000): *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *morsprunorum* race 1 et 2 (Kaluzna et al. 2010) et *P. viridiflava*. *P. syringae* est une espèce de bactéries strictement aérobies, gram négatives, le plus souvent fluorescentes. Elle regroupe plus de 50 pathovars, pathogènes pour plus de 180 espèces (Dye et al. 1980; Kaluzna et al. 2010). Bien qu'il lui ait été attribué un nom d'espèce pour les raisons historiques, *P. viridiflava* fait partie du complexe d'espèce de *P. syringae*. Le terme de pathovar (Young et al. 1978) est employé pour faciliter l'identification de souches dont la taxonomie est encore mal définie, permettant aux phytopathologistes de distinguer des sous-groupes de *P. syringae* avec des comportements pathogènes communs (Hirano et Upper 1991; Scortichini et al. 2003). Il n'est pas possible de discriminer les pathovars sur la seule base de leurs plantes hôtes (Hirano et Upper 1991; Scortichini et al. 2003; Young 2010). Les *P. syringae* sont bien souvent caractérisées des bactéries (Hirano et Upper 1990) :

- **pathogènes**, elles vont perturber la croissance et/ou la reproduction de la plante par leurs composantes de virulence et d'agressivité (Jones et Dangl 2006)
- **épiphytes**, elles sont capables de survivre et de se multiplier à la surface des végétaux,
- **glaçogènes**, ayant le pouvoir d'augmenter la température du point de congélation de l'eau dans les tissus.

Toutefois, toutes les souches de *P. syringae* ne sont pas pathogènes et glaçogènes. Les méthodes de classification et d'identification ont beaucoup évolué depuis le premier isolement de *P. syringae* sur lilas (*Syringa vulgaris*) par van Hall en 1902. Aujourd'hui, des études de réassociation ADN-ADN et de ribotyping ont permis de regrouper les *P. syringae* sous 9 espèces génomiques (Latif et Mercier 1994; Gardan et al. 1999).

I.3.3. Epidémiologie du dépérissement bactérien

Contrôler le déclenchement du dépérissement bactérien nécessite de connaître les modalités de colonisation, de développement et de survie des bactéries en cause au sein de l'arbre.

P. syringae est une bactérie aérobie qui peut être transportée par l'eau et le vent et capable de se développer dans des milieux très variés. Des études récentes montrent que son déplacement suit le cycle de l'eau et que toutes les souches de cette bactérie trouvées dans la neige, et la majorité dans la pluie, sont glaçogènes (Morris et al. 2008, 2010). Une quantité importante de *P. syringae* ayant subi une longue évolution en altitude est déversée dans les bassins versants vers l'aval, dont les zones de culture du Rhône Alpes font partie (Monteil et al. 2012). Selon Crosse (1966), il semblerait que les populations foliaires de *P. syringae* pv. *morsprunorum* proviennent de la pluie et se développent alors en conditions satisfaisantes sur la plante hôte (Cameron 1970). L'agent pathogène se conserve à la fois sur les parties aériennes en tant qu'épiphyte (Bordjiba et Prunier 1989) que dans les tissus en tant qu'endophyte de l'arbre,

dans l'apoplaste des cellules (Erikson 1945; Hattingh et al, 1989). Le nombre de bactéries présentes sur l'arbre semble croître régulièrement au cours du temps pendant les premières années après la plantation, ce qui pourrait être favorisé par la croissance de la canopée (Crosse 1966; Crosse et Garrett 1963). De manière générale, la bactérie demeure épiphyte pendant la phase de croissance printanière, où elle subsiste sur des feuilles apparemment saines. Deux périodes semblent propices au développement des bactéries épiphytes, l'une au printemps, particulièrement à la sortie des feuilles (Shanmuganathan 1962) l'autre en automne (Cameron, 1970; Prunier et Bordjiba, 1989). La bactérie peut subsister au sein de l'arbre au cours de l'hiver en s'installant dans les tissus végétaux, au sein des chancres ou enfermées dans les bourgeons. Par contre, il existerait des « poches » à bactéries dans les tissus sous-stomatiques où les bactéries seraient capables de pénétrer, de se multiplier avant de ressortir en masse à la surface des feuilles (Roos et Hattingh 1983). Ce phénomène pourrait être récurrent et avoir un rôle dans les fortes variations des populations épiphytes de bactéries (Hattingh et al, 1989). Les stades phénologiques et physiologiques de l'arbre sont donc déterminants dans le développement des populations bactériennes et des symptômes. Les rameaux sont très sensibles dès la fin de l'automne jusqu'au début du printemps et résistants le reste de l'année. C'est pendant cette dernière période que l'agent pathogène se multiplie de manière épiphyte (Crosse 1966). Crosse émet l'hypothèse selon laquelle les symptômes sur feuilles sont moins fréquents, car le pic de croissance bactérienne concorde rarement avec un stade fragile de la feuille. Des hypothèses ont été faites sur les moyens de pénétration de la bactérie dans les tissus. Nous pouvons d'ores et déjà, pour certains *Prunus*, valider certaines de ces portes d'entrée, présentées en ANNEXE I. Dans le cas de l'abricotier, il semble que les bourgeons soient la principale voie de pénétration naturelle et que les plaies pétiolaires ne soient pas une voie empruntée par la bactérie. Les blessures causées par la taille sont également une porte d'entrée majeure de la bactérie dans le système vasculaire.

I.3.4. Mécanismes impliqués dans le pouvoir pathogène de *P. syringae*

Trois principaux facteurs de virulence ont été identifiés chez *P. syringae* (pour synthèse, (Kennelly et al. 2007). Le **pouvoir glaçogène** que nous avons précédemment évoqué a longtemps été perçu comme une raison majeure de l'extension du chancre pendant l'hiver. Ce pouvoir de favoriser la prise en glace des cellules à des températures auxquelles les tissus sont normalement résistants au gel entraîne leur destruction et rend leur contenu disponible pour le développement de la bactérie. Cette faculté serait une conséquence à la fois de la baisse du taux de sucre dans les tissus en présence de bactéries, et de leur rôle de noyau glaçogène (Klement et al. 1984). Par ailleurs, les *P. syringae* disposent d'un arsenal spécifique permettant de contourner les mécanismes de défense de la plante (Jakobek et al, 1993) et de coloniser les tissus ligneux. Les *P. syringae* pathogènes produisent des **protéines effectrices intra ou extracellulaires issues de la voie de sécrétion de type III** dirigées contre le système de réaction immunitaire de la plante (TTSS). Certaines de ces protéines, les harpines, sont des éliciteurs qui déclenchent une réaction hypersensible sur les feuilles de tabac, ultime manifestation de la résistance « gène pour gène » (Lindgren 1997; Loreti et al, 2001; Oh et al, 2010). Des analyses comparatives du génome des *P. syringae* montrent une très haute variabilité des effecteurs, dont le répertoire est sans doute un facteur de l'adaptation à un panel très large d'hôtes (Greenberg et Vinatzer 2003).

Les **phytoalexines** telles que la syringomycine (Sinden 1971) ou la coronatine (Liang et al. 1994) contribuent également au pouvoir pathogène.

Les mécanismes moléculaires à l'origine de la pathogénicité d'une souche donnée pour une espèce donnée restent encore mal compris à ce jour (Misas-Villamil et al. 2013).

I.4. Facteurs influençant les symptômes et les dégâts

Facteurs pédoclimatiques et agronomiques

Ensemble, les caractéristiques du sol et du climat des régions sensibilisantes témoignent de conditions particulièrement favorables au développement de la bactérie par l'occurrence du gel hivernal. Il n'existe pas de lutte efficace contre le dépérissement bactérien. Une approche prophylactique combinant différents choix techniques doit être mise en place, dès la plantation du verger. L'absence de solution technique nous encourage à nous tourner davantage vers l'identification de mécanismes de résistance d'origine génétique pour apporter des solutions durables au dépérissement bactérien. Une synthèse des facteurs de développement de la maladie et des techniques de prévention employées est proposée en ANNEXE II.

Facteurs génétiques

Mécanismes potentiels de résistance

Il existe deux types de résistance aux agents pathogènes chez les plantes. La **résistance non-hôte** est non spécifique et correspond à une réaction immunitaire menant à une résistance de tous les génotypes (Uma et al, 2011). Il existe deux types de résistance non hôte : celle de **type I** ne produit aucun symptôme tandis que celle de **type II** entraîne une réaction hypersensible (Uma et al, 2011). La coévolution entre bactéries et plantes, dite hypothèse de la reine rouge (Van Valen 1977), est venue complexifier cette interaction, pouvant donner lieu à une **résistance dite hôte**. Celle-ci peut être qualifiée de **compatible** ou **incompatible** selon qu'il existe ou non une complémentarité entre les gènes de la plante et de la bactérie. Une interaction de type incompatible, donne lieu à une **résistance qualitative**, de type oligogénique, impliquant un petit nombre de gènes. Dans ce cas, la croissance de l'agent pathogène est rapidement stoppée. Ce mécanisme résulte d'un système de reconnaissance « gène pour gène » décrit par Flor en 1971 de la manière suivante : “ *A gene-for-gene relationship exists when the presence of a gene in one population is contingent on the continued presence of a gene in another population, and where the interaction between the two genes leads to a single phenotypic expression by which the presence or absence of the relevant gene in either organism may be recognized*”. Cette interaction fait intervenir des **gènes de résistance R chez la plante**, et **des gènes d'avirulence Avr chez l'agent pathogène**, la présence des deux entraînant l'**avirulence** de l'agent pathogène. Il convient de préciser que ces gènes ne sont pas les seuls impliqués dans cette interaction. Un gène peut avoir une action régulatrice de l'autre gène, et de nombreux facteurs de régulation interviennent, ce qui vient nuancer la conception simpliste de l'interaction gène à gène (Nimchuk et al. 2003). Dans le cas où un des gènes *Avr* ou *R* est absent, la réaction est dite compatible, c'est-à-dire que l'agent pathogène est virulent pour la plante. L'hôte est atteint mais peut présenter une **résistance de type quantitative**, impliquant des **Quantitative Trait Loci (QTL)**. A l'heure actuelle, des QTLs de résistance ont été identifiés pour différents agents pathogènes des *Prunus*, notamment la Sharka et *Xanthomonas pruni* chez l'abricotier, l'oïdium et les nématodes chez la pêche (Kole et Abbott 2012; Socquet-Juglard et al. 2012). Toutefois, aucune hypothèse sur le type de résistance n'a encore été émise pour le dépérissement bactérien des *Prunus* causé par *P. syringae*.

L'observation des cultivars révèle une grande variabilité de la réponse à la maladie

Nous faisons l'hypothèse que la résistance au dépérissement bactérien se manifeste au niveau de la pénétration et de la vascularisation de l'agent pathogène. Autrement dit la plante est rendue résistante par un blocage à l'accès au système vasculaire et/ou par une limitation de sa diffusion systémique. Jusqu'ici, plusieurs méthodes ont permis d'apprécier la variabilité de la réponse des cultivars à *P. syringae*. En conditions climatiques naturelles sous faibles niveaux

d'intrants où cette bactérie est naturellement présente, des criblages variétaux ont été réalisés à l'INRA de Gotheron (26) par un comptage des charpentières et des arbres morts (Brun 2011). Ils montrent une large gamme de symptômes qui résulte des deux types de mécanismes que nous venons d'évoquer, pénétration et vascularisation. Ces résultats sont présentés en ANNEXE III. Pour s'affranchir de la forte variabilité environnementale des symptômes, de nombreux travaux en conditions contrôlées ont été réalisés sur organes détachés (synthèse bibliographique de Gil, 2011, non publié) :

- Sur rameaux, par pulvérisation ou en créant une blessure,
- Sur feuilles, par des inoculations sur rameaux détachés.

L'ensemble de ces expérimentations vise plutôt la compréhension des mécanismes d'entrée et de développement de la bactérie ainsi que l'étude de la pathogénicité des souches (Prunier et Bordjiba, 1989) que la discrimination des différents cultivars. Par ailleurs, en conditions contrôlées, la variabilité entre génotypes ne semble pas facile à apprécier et les résultats sont faiblement corrélés aux observations en verger (Crosse 1953; Thomidis et Exadaktylou 2008).

I.5. Objectifs de travail

Perfectionnement de méthodes d'inoculation et de phénotypage

Dans ce contexte, le travail mené doit permettre de cribler un grand nombre d'accessions d'abricotier pour leur résistance à *P. syringae* en conditions climatiques naturelles. Il s'agit de mettre au point un protocole permettant d'obtenir des mesures de symptômes après inoculation de la bactérie qui soient les plus précises possibles, pour en disséquer les effets génétiques. Inoculation et phénotypage devront être reproductibles et robustes pour permettre de cumuler les observations sur plusieurs années dans le cadre d'un projet de longue durée de compréhension et de lutte contre la maladie.

Validation de l'hérédité du caractère de résistance

Nous nous proposons d'étudier dans un premier temps l'hérédité du caractère de résistance au dépérissement bactérien causé par *P. syringae* en axant notre travail sur deux composantes de la sensibilité exprimée sur rameaux en hiver et sur feuilles au printemps qui reflètent deux mécanismes impliqués dans la pathogénicité de la bactérie :

- La **vascularisation** de l'agent pathogène, qui se manifeste par le brunissement et la destruction des tissus cambiaux. C'est ce que nous mesurerons sur les rameaux au printemps après les avoir inoculé en hiver.
- Une **réaction locale**, à court terme, faisant suite à une lésion. C'est ce que nous observerons sur les feuilles quelques semaines après leur inoculation au printemps.

Pour ce faire, nous disposons de deux descendance de parents aux comportements contrastés « résistant × sensible » pour chacun de ces organes. Leur phénotypage et génotypage nous permettront de valider et de caractériser la ségrégation du caractère de résistance dans la descendance.

Criblage des ressources génétiques pour le caractère de résistance

Une étude de la sensibilité variétale de ressources génétiques sera réalisée afin de trouver de nouvelles sources de résistance. Les mêmes protocoles de phénotypage seront employés, nous permettant d'une part de valider l'hypothèse de variabilité au sein des génotypes et de comparer la distribution des symptômes avec celle obtenue dans les populations biparentales. Nous pourrions aussi tenter d'établir un lien entre ce caractère et l'origine phylogéographique des variétés, et chercher une relation entre la résistance des rameaux et des feuilles.

Caractérisation du support génétique de la résistance

A l'aide du génotypage d'une partie des individus phénotypés, nous serons en mesure d'identifier les régions du génome impliquées dans la résistance. Pour les populations biparentales, nous aurons recours à une analyse de liaison à l'aide d'une cartographie basée sur des marqueurs SSR. Dans le cas de l'étude de la collection variétale, nous réaliserons une analyse d'association sur l'ensemble du génome, à l'aide d'un jeu de marqueurs SNP densément répartis sur le génome. Ces deux approches sont complémentaires car elles ne reposent pas sur les mêmes matériels biologiques ni les mêmes approches analytiques.

II. Matériels et méthodes

II.1. Matériel végétal

Populations biparentales - Pour tester la résistance à *P. syringae* sur rameaux, une population issue d'un croisement 'Bergeron' × 'Bakour' (**BerBa**), de 224 individus en pseudo-F1, ou pseudo-test-cross (Grattapaglia et Sederoff 1994) a été inoculée en verger deux années consécutives. Cette population a été obtenue en 2004 et plantée à l'INRA de Gotheron (26). Bergeron est une variété locale issue du phylum Europe continentale (Hagen et al. 2002), sensible au chancre bactérien (Brun et al. 2011) et Bakour, une variété tunisienne locale issue du phylum Nord-africain (Carraut et Crossa-Raynaud, 1973) dont la faible sensibilité variétale a été mise en évidence et validée par Prunier, dont les résultats sont présentés en ANNEXE IV, et confirmée depuis à l'INRA de Gotheron (Brun et al. 2011). La population BerBa sera utilisée comme population de cartographie et de phénotypage pour la détection de QTL par analyse de liaison.

Pour tester les symptômes sur feuilles causés par *P. syringae*, une seconde population biparentale en pseudo-F1, 'Goldrich' x 'Moniqui' (**GoMo**), de 196 individus a été choisie et inoculée en 2013. Goldrich (et certains de ses hybrides) présente fréquemment des symptômes de criblures sur feuilles qui ne sont pas observés chez Moniqui, nous laissant supposer que ce caractère ségrége dans leur descendance commune (Audergon, communication personnelle).

Collection de ressources génétiques et panel re-séquencé - La collection variétale de ressources génétiques contient 587 variétés issues des différents phylums précédemment identifiés (Hagen et al. 2002; Bourguiba et al. 2012). Elle est maintenue sur le domaine INRA de l'Amarine à Bellegarde (30) et répartie sur trois parcelles. Le panel re-séquencé (nous parlerons de 'panel de RG') correspond à 76 individus sélectionnés dans la collection représentant fidèlement la diversité de la collection sur la base d'analyse moléculaire (Lasnier 2012, non publié). Ces accessions sont présentées en ANNEXE V avec leur pays d'origine.

II.2. Dispositif expérimental

Dans chaque dispositif (**Tab.1**), les arbres sont répartis sur plusieurs rangs à raison d'un arbre par génotype. Pour l'inoculation des rameaux, dont le développement des symptômes se fait sur plusieurs mois, des caractéristiques du rameau (hauteur, diamètre) ont été prises en compte en tant que covariables. La hauteur influence le microclimat à l'échelle d'une saison, comme le montre l'importance de la hauteur de greffage (Lichou et Jay, 2012) ; et le diamètre est corrélé positivement au développement du chancre (Cao et al. 1999). Pour chaque génotype, un rameau supplémentaire a été choisi sur lequel a été appliquée de l'eau par la même méthode que pour les inoculations.

Inoculation	Pop	An	Site	Nombre d'individus	Unité expérimentale	Répétitions	Témoin eau
Tissus vasculaires méthode Prunier	BerBa	2012	Gotheron (26)	224	RAMEAU (génotype, voisinage, diamètre, hauteur)	5	oui
		2013	Gotheron (26)	224	RAMEAU (génotype, voisinage, diamètre, hauteur)	5	oui
	Collection	2013	Amarine (30)	587	RAMEAU (génotype, diamètre)	3	oui
Criblures foliaires pulvérisation	GoMo	2013	Amarine (30)	196	FEUILLE (rameau, génotype)	4	non
	Panel RG	2013	Amarine (30)	76	FEUILLE (rameau, génotype)	4	oui

Tableau 1: Synthèse du dispositif expérimental visant à caractériser les réactions après inoculation de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (isolat 41A) sur rameaux et sur feuilles dans différentes populations d'abricotier.

II.3. Inoculations

L'isolat 41A prélevé par le CTIFL à Larnage (26) dans un verger fortement contaminé a été utilisé pour chaque type d'inoculation. Il s'agit d'une *P. syringae* pathovar *syringae* (Pss).

Rameaux : méthode Prunier - Les inoculations ont été réalisées les 6 décembre 2012 et 24 janvier 2013 sur la population BerBa et les 10 et 11 décembre 2012 sur la collection, selon la méthode Prunier (Prunier et al,1991) qui consiste à réaliser une entaille en dessous de l'écorce, à déposer une goutte d'inoculum sous la languette formée de 25µL de solution à 10⁸ UFC/mL de bactérie et à entourer cette zone de parafilm.

Feuilles : vaporisation - Les inoculations se sont déroulées les 14 et 17 mai 2013 sur le panel de RG puis sur la population GoMo. Quatre feuilles consécutives pleinement développées ont été inoculées sur chaque rameau par perforation à l'aide d'une brosse en inox et pulvérisation immédiate de l'inoculum. Chacune des faces de chaque feuille a reçu 1mL de suspension bactérienne à 10⁸ UFC/mL sur chaque face des feuilles (1mL par pulvérisation). Les feuilles ont été récoltées après trois semaines, stockées au froid (4°C) et scannées numériquement pour la notation.

Vérification de la présence de la souche dans les tissus inoculés - La présence de bactéries *P. syringae* a été testée sur un sous ensemble de 20 échantillons de feuilles (dont quatre témoins « eau ») et de 44 rameaux (dont trois témoins « eau ») selon le protocole fourni en ANNEXE VI. Les critères de fluorescence positive et de test à l'oxydase négatif sur les colonies obtenues ont permis d'identifier *P. syringae* dans les échantillons.

II.4. Notations

Symptômes sur rameaux (visualisation en ANNEXE VII)

Les notations ont été effectuées au mois de mai suivant l'inoculation. Les symptômes sont décrits par des longueurs, ont été mesurés au demi-centimètre près dans l'ordre suivant :

- **longueur de chancre (lgc, 2012-13)**: zone de symptômes visibles extérieurement englobant la zone cicatrisée et le méplat formé par la destruction des tissus du cambium,
- **longueur de la blessure résultant de l'entaille (lge, 2013)**: partie ouverte au contact de l'air formant une fente plus ou moins large formée à partir de l'entaille à l'inoculation,
- **longueur de brunissement superficiel (bs, 2013)**: observée directement sous l'écorce dans les tissus verts de l'année, elle est mesurée après pelage de l'écorce,
- **longueur de brunissement interne (bi, 2012-13)**: le décollement profond de l'écorce révèle un brunissement des tissus cambiaux supérieur ou égal à la longueur de chancre.

Symptômes sur feuilles

Une notation de **sévérité** a été réalisée sur chaque feuille après l'élaboration d'une échelle de 0 à 5, correspondant à différentes gammes de pourcentage de surface nécrosée :

0=[0;5], 1=[5;10], 2=[10;25], 3=[25;50], 4=[50;75], 5=[75;100] (en pourcents)

Les repères visuels de cette échelle sont présentés en ANNEXE VIII. Cette notation est complétée d'une appréciation de la taille de la feuille, par une note de 1 à 3 qui sert de covariable à la notation de sévérité.

II.5. Génotypage

Marquage à l'aide de marqueurs SSRs pour les populations biparentales

Le génotypage de la population BerBa a été réalisé en 2013, après un criblage du polymorphisme de 300 marqueurs SSR (Single Sequence Repeat) chez les deux parents à l'UR GAFL (Avignon). Ensuite, le génotypage de 72 SSR a été réalisé en deux temps, en avril puis en juillet 2013, par la société ADNiD sur un panel de 87 individus sélectionnés pour représenter la gamme de symptômes de 2012 (sur la base des moyennes brutes). Le premier génotypage visait à établir une cartographie peu dense de tous les groupes de liaisons, pour aller ensuite densifier des zones d'intérêt détectées en première approche. Pour la population GoMo, nous nous sommes appuyés sur les distances de la carte obtenue en 2007 par Bachellez et collaborateurs. La carte comporte 129 marqueurs SSR pour Goldrich (480,8cM) et 94 pour Moniqui (580,5cM) répartis sur l'ensemble des 8 groupes de liaison (cf. ANNEXE IX).

Marquage à l'aide de marqueurs SNPs pour le panel de ressources génétiques

Dans le cadre du projet ANR ABRIWG réalisé en collaboration avec l'UMR Biologie du Fruit et Pathologie de Bordeaux, le transcriptome de 93 accessions a été séquençé en utilisant le séquençage à haut-débit Illumina HI-SEQ2000 (Shen et al. 2005) avec une profondeur moyenne de 15X. L'alignement de ces séquences par rapport à celle du pêcher (d'où le terme de re-séquençage) a permis la détection de plus de 220.000 sites polymorphes ou SNP. A partir de ce jeu de marqueurs, un travail de sélection des marqueurs SNP sera réalisé sur la base du niveau d'information (polymorphisme, fréquence allélique, position sur le génome) afin de permettre les analyses subséquentes de caractérisation de la structure de la population RG, d'étude du déséquilibre de liaison (à l'échelle du chromosome) et d'évaluation de l'apparentement entre individus qui sont des pré-requis à la recherche d'association génotype-phénotype.

II.6. Traitement statistique des données

Données de phénotypage

Le traitement des notations de symptômes a été réalisé à l'aide du langage R (R Core Team, 2013). Les corrélations entre variables sont données par le coefficient de Pearson. Les analyses en composantes principales ont été réalisées à l'aide du package R/FactoMiner (Lê et al, 2008).

Traitement des notations sur rameaux - Les notes des rameaux étant toutes des variables continues (longueurs), l'analyse du dispositif peut se faire avec un modèle linéaire général testé par une ANCOVA où la variable expliquée est la variable (**lgc**, **lge**, **bi** ou **bs**) mesurée et les variables explicatives sont le génotype, le diamètre et la hauteur du rameau. Sur la base de travaux antérieurs, nous avons fait l'hypothèse d'indépendance entre rameaux pour l'échelle de temps à laquelle nous travaillons (Audergon et al, 1993; Monestiez et al, 1988). Les parcelles sont supposées homogènes en termes de microclimat et de teneur en eau du sol, cette dernière ayant un fort impact sur les symptômes (Cao et al. 1999; Vigouroux 1999). Une correction de Papadakis (Dagnelie 1989) a été appliquée sur les données des rameaux de la population BerBa. Une transformation par le logarithme (Log_{10}) a été effectuée pour stabiliser la variance. La normalité a été testée par un test de Shapiro, l'homogénéité des variances par un test de Fligner-Killeen, et l'indépendance des résultats a été jugée à l'aide de la distribution des résidus observés sur les QQ-plots générés par R. La comparaison entre les échantillons de

rameaux « inoculés » et « non inoculés » et entre les phénotypes des deux parents a été réalisée par un test bivarié de Wilcoxon. Le test de conformité d'une proportion, visant à tester s'il existe une répartition de 50% de sensibles et 50% de résistants, a été réalisé à l'aide du test binomial exact sous R. L'héritabilité au sens large des mesures de **lgc** et de **bi** a pu être calculée pour les deux années par la décomposition de la variance du phénotype (Dudley et Moll 1969). Enfin, les valeurs finales de phénotype qui ont été choisies pour représenter chaque individu dans la détection de QTL sont les coefficients individuels issus de l'ANCOVA.

Traitement des notations sur feuilles – L'effet du génotype est testé à partir des notes brutes par le test non paramétrique du $2\hat{I}$ (Arbonnier 1966) où l'hypothèse H_0 est que tous les génotypes sont répartis de la même manière dans les différentes classes. La valeur du $2\hat{I}$ est comparée à un χ^2 à $(\text{nombre d'individus}-1) * (\text{nombre de classes}-1)$ degrés de liberté. A partir de la notation individuelle des feuilles, trois notes synthétiques ont été choisies pour représenter les individus dans notre analyse QTL:

- **sevmoy** : la moyenne brute des notations (classes de 0 à 5) par individu,
- **sevmed** : la moyenne des notes transformées en pourcentage de nécrose par une moyenne sur la médiane de chaque classe par individu,
- **sevreglog** : un index calculé grâce au modèle de régression logistique multinomial (RLM), qui s'apparente à un modèle suivant une loi binomiale, avec plus de deux classes. Il permet de calculer les probabilités pour qu'un individu appartienne à chacune des classes. La note **sevreglog** est calculée par la somme des probabilités pour chaque classe (P) multiplié par la valeur de chaque note (N) de 0 à 5 :

$$\text{Sévérité} = P(N=0)*0 + P(N=1)*1 + P(N=2)*2 + P(N=3)*3 + P(N=4)*4 + P(N=5)*5$$

Ensemble, ces trois notes **sevmoy**, **sevmed** et **sevreglog** discriminent les individus de différentes manières à partir d'une même notation.

Données de génotypage

Données des marqueurs SSR dans les populations biparentales

Cartographie de la population BerBa – Elle a été réalisée à l'aide du logiciel JoinMap version 4 (Van Ooijen 2006). La fréquence maximale de recombinaison a été fixée à 0.45. Les regroupements ont été faits selon le maximum de vraisemblance, par une estimation multipoint des fréquences de recombinaison (burnin de 10.000, 4 cycles de Monte Carlo de longueur 1000), permettant de tester les différentes configurations selon des seuils de valeurs de LOD score croissants, de 2 à 10 (correspondant à des seuils de valeurs de P de 1.10^{-3} à 1.10^{-4}). Seuls les groupes identifiés à un LOD supérieur à 8 ont été retenus. La fonction d'évaluation des distances génétiques (en cM) employée est celle de Kosambi (Kosambi 1944).

Détection de QTLs par analyse de liaison - La fonction Haley-Knott (Haley et Knott 1992) a permis de réaliser la cartographie d'intervalle des QTLs par la méthode simple, composite, et par régression pas à pas (testant un maximum de 5 QTLs). Le LOD seuil a été fixé par 1000 simulations à une valeur de 2.3. Le package R/qtl (Broman et al. 2003) a servi à l'ensemble des calculs et une analyse indépendante a été réalisée sur le polymorphisme de chacun des parents.

Données des marqueurs SNP dans le panel de RG de 76 accessions

Analyse des fréquences, du polymorphisme et calcul du DL - Elle a été du logiciel Plink! (Purcell et al. 2007, <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>).

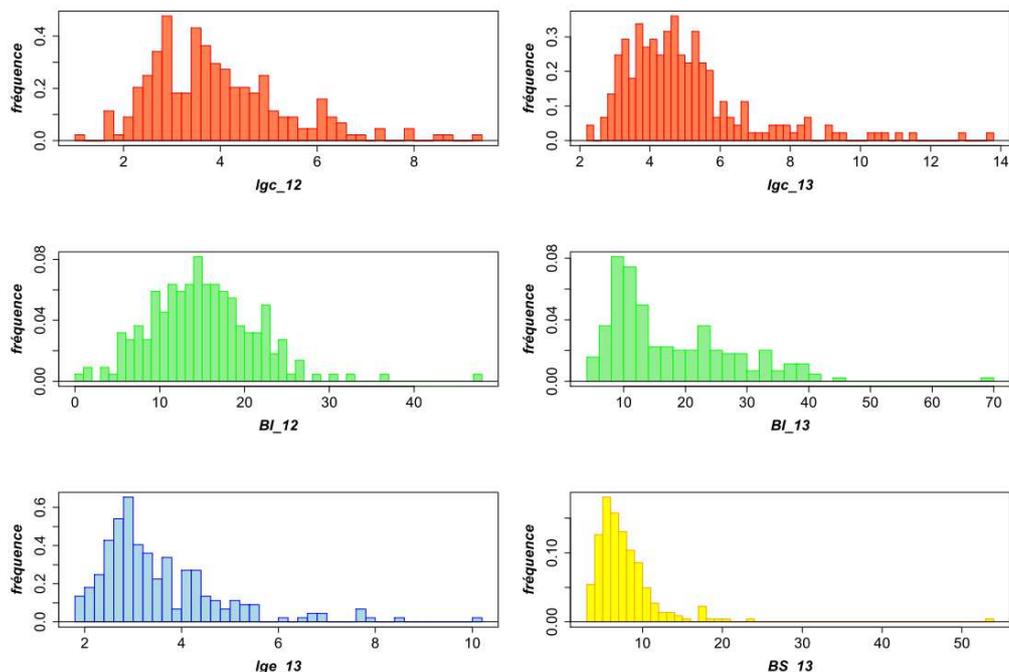


Figure 1: Distributions de l'intensité des symptômes de sensibilité suite à une inoculation bactérienne (méthode Prunier, Pss, souche 41A), mesurés sur rameaux au sein de la population hybride Bergeron × Bakour (224 individus) en 2012 et en 2013. Les distributions portent sur les moyennes de 5 rameaux testés par individu. Mesures en centimètres. Logiciel R (<http://R-project.org>). Auteur : M. ROTH

VARIABLES log(x+1)	2012 et 2013		2013	
	lgc	bi	lge	bs
Effet de l'année	0,0225 *	NS	NA	NA
Effet du génotype	2,00E-16***	2,00E-16***	2,00E-16***	2,00E-16***
Effet interaction GxE (Génotype x Année)	2,00E-16***	2,00E-16***	NA	NA
Effet correction Papadakis	2,00E-16***	2,00E-16 ***	1,05e-13 ***	1,07e-14 ***
Effet diamètre du rameau	5,54e-15 ***	1,33e-10***	3,05e-05***	NS
Effet hauteur de l'inoculation	2,00E-16***	NS	NS	NS
Distribution normale (Shapiro)	non	non	non	non
Homoscedasticité % an (Fligner-Killeen)	non	non	NA	NA
Homoscedasticité % génotype (Fligner-Killeen)	non	non	oui	oui
Comparaison % témoin (Wilcoxon)	2,00E-16***	2,00E-16***	2,00E-16***	2,00E-16***
R ² du modèle choisi	0,47	0,43	0,40	0,44
Héritabilité au sens large (H ²)	0,69	0,67		
Moyenne de la population en 2012 (cm)	4,03 ±1,5	15,25 ±6,3		
Moyenne Bergeron en 2012 (cm)	4,05 ±1,2	16,32 ±6,5		
Moyenne Bakour en 2012 (cm)	3,40 ±1,6	11,5 ±5,4		
Moyenne de la population en 2013 (cm)	5,04 ±1,7	17,69 ±9,8	3,58 ±1,3	7,86 ±3,9
Moyenne Bergeron 2013 (cm)	8,33 ±4,3	35,75 ±17,7	5,08 ±2,5	13,17 ±8,9
Moyenne Bakour 2013 (cm)	5,75 ±2,6	20,5 ±9,1	3,68 ±4,2	9 ±5,4
Différence entre parents (Wilcoxon)	0,18	0,07	0,13	0,51

Tableau 2 : Synthèse des analyses statistiques effectuées suite aux inoculations des rameaux (méthode Prunier, Pss, souche 41A au sein de la population hybride Bergeron × Bakour 5 répétitions, 224 individus) – 'NS' : non significatif, les symboles * indiquent le niveau de significativité. '%' : par rapport à ; '±' indique l'écart-type. Lgc : longueur de chancre ; bi : longueur de brunissement interne ; lge : longueur de la blessure apparente partant de l'entaille ; bs : brunissement superficiel. Calculs réalisés à l'aide du langage R (<http://R-project.org>). Auteur : M. ROTH

Le DL entre marqueurs deux à deux au sein du même chromosome a été estimé à l'aide du calcul du r^2 (Hill et Robertson 1968). Le package R/snp.plotter a servi à sa représentation graphique (Luna et Nicodemus, 2007).

Inférence du nombre de populations ancestrales – Elle a été faite grâce au logiciel STRUCTURE (Pritchard et al, 2000), en modèle d'admixture (Burnin de 50.000 et 50.000 répétitions) par le biais du portail de l'Université d'Oslo, Bioportal (<http://www.bioportal.uio.no/>). Pour chaque individu, les maximums de vraisemblance et le nombre de populations ancestrales ont été ajustés selon la méthode dite du deltaK (Evanno, et al, 2005) telle qu'implémentée dans le logiciel STRUCTURE HARVESTER (Earl 2012).

Estimation de l'apparentement entre individus - La matrice des coefficients d'apparentement (compris entre 0 et 1) des individus deux à deux a été obtenue à l'aide de SPAGeDI (Hardy et Vekemans 2002) en utilisant la formule de Ritland (1996).

Détection de QTLs par analyse d'association - Les données génotypiques, phénotypiques, de structure et d'apparentement ont été traitées à l'aide du logiciel TASSEL (Bradbury et al. 2007) pour générer les résultats d'association en testant successivement le modèle linéaire généralisé (GLM) et mixte (MLM). Les trois modèles ainsi testés ont été le GLM 'simple' (intégrant génotype et phénotype), le GLM 'Q' (modèle simple avec les coefficients de structure comme covariables), et MLM 'Q+K' intégrant phénotype et génotype en effet fixe, coefficients de structure en covariables et la matrice d'apparentement en aléatoire. Le choix du modèle s'est fait à l'aide du tracé des QQ-plots permettant d'évaluer la répartition des valeurs de P dans chaque modèle. Une correction par le False Discovery Rate (FDR) (Benjamini et Hochberg 1995) à 5% a été réalisée sur les valeurs de P inférieures à 1.10^{-3} . Cette correction tient compte du déséquilibre entre le nombre très élevé de marqueurs (7939 après filtre) et le faible effectif du panel (76). Les QQ-plot et les Manhattan plot permettant de visualiser les résultats de TASSEL ont été créés grâce au code R qqman (Turner 2011).

III. Résultats

III.1. Analyse de la résistance à *Pseudomonas syringae* des rameaux et feuilles des populations d'abricotier à l'aide des données de phénotypage

III.1.1. Analyse des réactions aux inoculations sur rameaux

Les réactions aux inoculations traduisent une variabilité génétique dans le comportement des clones analysés pour l'ensemble des variables mesurées (**Tab.2**). Les notes des rameaux inoculés avec une suspension bactérienne sont significativement supérieures à celles des rameaux témoins (test de Wilcoxon, p-valeur $< 2^E-16$).

Caractérisation des symptômes de la population biparentale BerBa après inoculation sur rameaux

Parents – L'ensemble des notes de Bakour sont moins élevés que celle de Bergeron, mais la différence n'est pas significative (**Tab.2**). Les rameaux de Bakour testés en 2013 ont des symptômes plus importants que la moyenne de la population (**Tab.2**). Tout comme pour Bergeron, les valeurs mesurées ont presque doublé entre 2012 et 2013 (effet année : p-valeur $< 5.10^{-2}$), là où la moyenne de la population n'a pas changé de manière significative (**Tab.2**).

Population - Il existe une variabilité de la réaction significative au sein de la population, comme le montrent la distribution des individus (**Fig.1**) et les tests d'ANCOVA sur chaque variable mesurée (**Tab.2**). A lui seul, le génotype explique 20 à 45% de la variabilité des mesures.

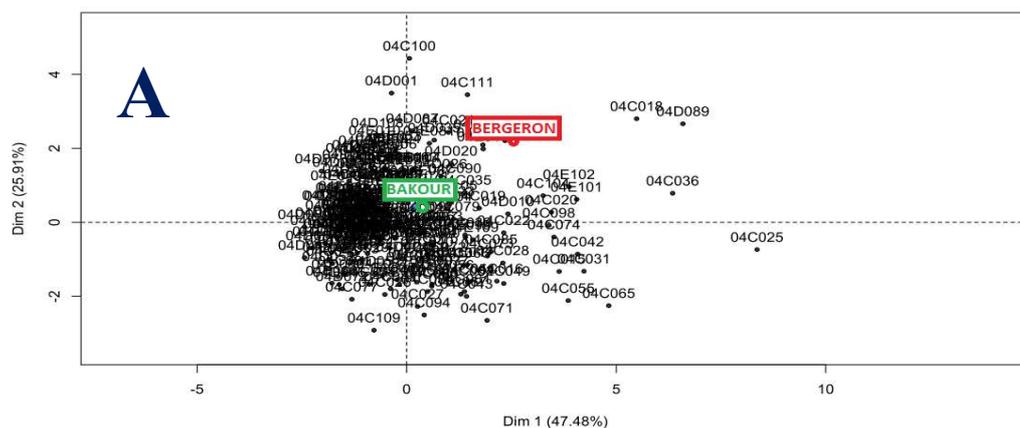
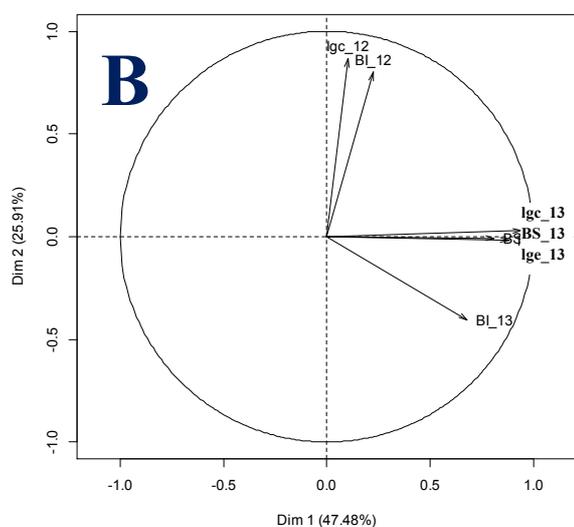


Figure 2 : Représentations synthétiques des données de sensibilité tissulaire mesurées sur rameaux suite à une inoculation bactérienne (méthode Prunier, Pss, souche 41A) - ACP des variables mesurées en 2012 et 2013 sur rameaux au sein de la population Bergeron × Bakour (moyennes par individu sur 5 rameaux, 224 individus). A : nuage des individus (moyennes sur 5 répétitions) selon l'axe 1 et 2 de l'ACP, les parents Bergeron et Bakour ont été introduits en données illustratives. B : représentation des variables mesurées en 2012 et en 2013.



lgc_12 et lgc_13 : Longueur de chancre, mesurée en 2012-13
 BI_12 et BI_13 : longueur de brunissement interne, mesurée en 2012-13
 lgc_13 : longueur de la blessure apparente à partir de l'entaille, mesurée en 2013
 BS_13 : longueur de brunissement superficiel, mesurée en 2013

Package R/FactoMiner (Lê, Josse, and Husson 2008). Auteur : M. ROTH

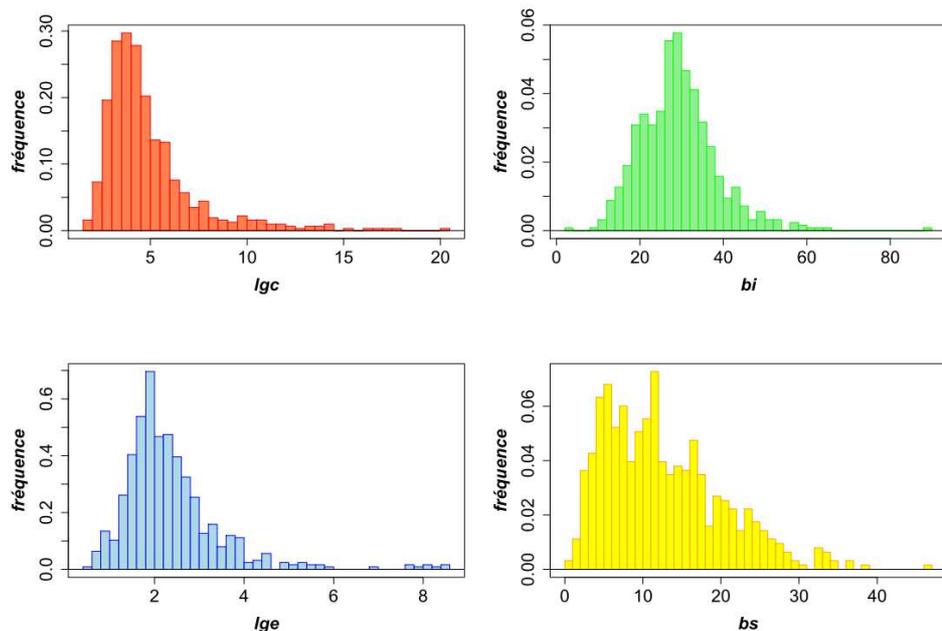


Figure 3 : Distributions de l'intensité des symptômes mesurés après inoculation tissulaire sur rameaux (méthode Prunier, Pss, souche 41A) au sein de la collection (587 accessions) - Les distributions portent sur les moyennes des notations sur les 3 rameaux testés par individu. Mesures en centimètres. Logiciel R (<http://R-project.org>). Auteur : M. ROTH

Une ACP projetant les individus pour l'ensemble des variables sur les 5 premiers axes (seuls les axes 1 et 2 sont représentés en **Fig.2**) et la matrice des corrélations (**Tab.3**) montrent que :

- Les notes d'une même année sont assez bien corrélées entre elles (en violet **Tab.3**) en particulier **lge** et **lgc** (corrélation de 0.84).
- **bi** et **bs** ont un comportement qui se distingue des autres réactions,
- Les notes de 2012 et 2013 (**lgc,bi**) sont peu corrélées entre elles (en orange, **Tab.3**)

	BI 12	BI 13	lgc 12	lgc 13	lge 13	BS 13
BI 12	1.00	-0.05	0.49	0.19	0.14	0.12
BI 13	-0.05	1.00	-0.22	0.52	0.55	0.42
lgc 12	0.49	-0.22	1.00	0.11	0.09	0.06
lgc 13	0.19	0.52	0.11	1.00	0.84	0.74
lge 13	0.14	0.55	0.09	0.84	1.00	0.54
BS 13	0.12	0.42	0.06	0.74	0.54	1.00

Le nuage des individus est étendu et peu structuré sur les deux premiers axes (**Fig.2-A**), montrant un profil très répandu d'individus recombinants aux notes globalement moyennes, et de rares individus aux notes particulièrement élevées. Bergeron se trouve parmi ces individus extrêmes, et Bakour se situe dans une gamme de symptômes moyens.

Tableau 3 : Matrice de coefficients de corrélation de Pearson des variables mesurées sur rameaux dans la population BerBa en 2012 et 2013. Auteur : M. ROTH

Caractérisation des symptômes de la collection comportant 586 accessions après inoculation sur rameaux

De même que pour la population BerBa, la distribution des symptômes (**Fig.3**) est continue sur une large gamme avec un effet marqué du génotype (**Tab.3**), sauf pour la variable **bi** (p-valeur > 5.10⁻²). La synthèse des analyses est présentée dans le **Tab. 3** ci-dessous.

VARIABLES (en log(x+1))	lgc	bi	lge	bs
Effet du génotype	2,00E-16***	NS	2,00E-16***	2,00E-16***
Effet du diamètre du rameau	2,00E-16***	8,73e-10 ***	2,00E-16***	0,0284*
Respect de la normalité (Shapiro)	non	non	non	non
Homoscedasticité % génotype (Fligner-Killeen)	oui	oui	oui	oui
R ² du modèle	0,5192	-	0,5075	0,4897
Moyenne des individus	4,96 ±2,5	29,31 ±9,2	2,38 ±1,1	12,73 ±7,7

Tableau 3 : Synthèse des analyses statistiques effectuées suite aux inoculations sur rameaux (méthode Prunier, Pss, souche 41A) au sein de la collection (587 individus) de ressources génétiques – 'NS' : non significatif seuil de 5.10⁻², les symboles * indiquent le niveau de significativité. '%' signifie par 'rapport à', '±' écart-type. Auteur M. ROTH.

III.1.2. Analyse des réactions aux inoculations sur feuilles

Le test de Wilcoxon valide l'effet de l'inoculation sur les variables mesurées dans le panel de RG (p-valeur < 2^E-16).

Caractérisation des symptômes de la population biparentale GoMo après inoculation sur feuilles

Parents - La comparaison des deux parents est rendue délicate par le fait que le clone de Goldrich a été taillé par erreur avant la lecture des feuilles, ne laissant que deux répétitions sur l'arbre. Les symptômes de Moniqui sont en moyenne de 1,1 sur 4 répétitions et ceux de Goldrich de 0.5 sur 2.

Population – La distribution des symptômes peut être visualisée dans la **Fig.4** (page suivante). Les faibles fréquences des notes supérieures à deux n'ont pas permis l'ajustement du modèle de régression logistique multinomiale (RLM) avec les données brutes. Les notes supérieures ou égales à deux ont donc été regroupées dans une même classe pour rééquilibrer les fréquences et prévoir les estimations sur trois niveaux (0,1,2). Les individus restent bien discriminés dans les deux systèmes de notation (valeur de 2I supérieure à 831, valeur de Chi² correspondante). Le modèle RLM met en évidence le nombre élevé d'individus aux notes moyennes.

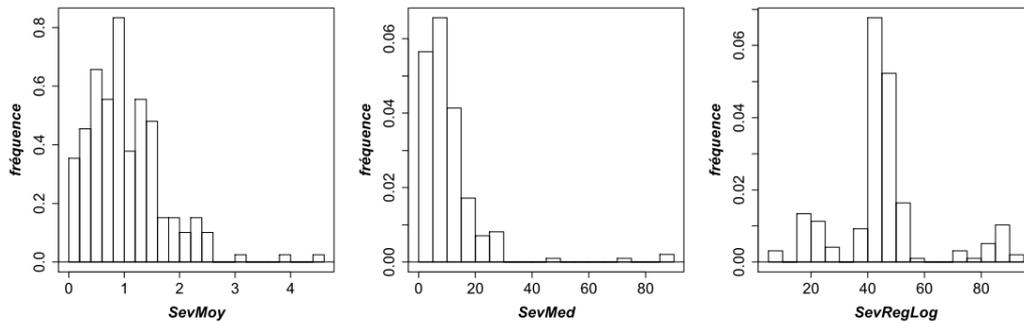


Figure 4 : Distributions des notes de sévérité des symptômes sur feuilles observés après inoculation au sein de la population hybride Goldrich × Monique de 196 individus (Pss, souche 41A). Les distributions portent sur les moyennes de 4 feuilles x 4 rameaux par individu. SevMoy = sévérité moyenne ; SevMed = sévérité médiane, **sevreglog** = note de sévérité obtenue par le modèle logistique multinomial, centrée sur une valeur de 50. Logiciel R (<http://R-project.org>). Auteur : M. ROTH

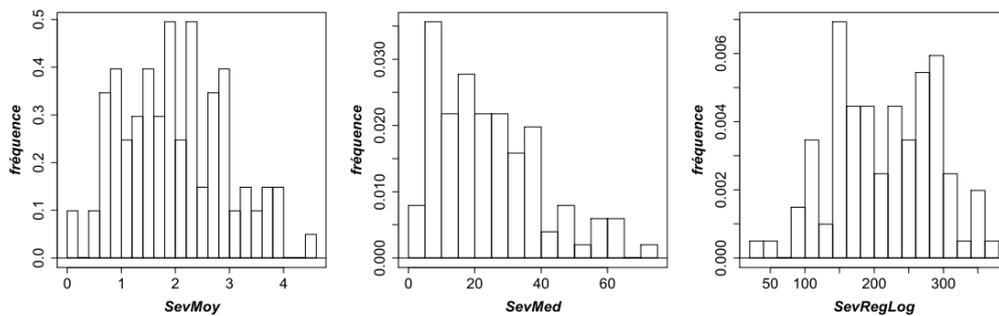


Figure 5 : Distributions des notes de sévérité des symptômes sur feuilles observées après inoculation dans le panel Ressources Génétiques reséquencées, (76 accessions) de la souche 41A (Pss) - Les distributions portent sur les moyennes de 4 feuilles x 4 rameaux par individu. SevMoy = sévérité moyenne ; SevMed = sévérité médiane, **sevreglog** = note de sévérité obtenue par le modèle logistique multinomial, centrée sur une valeur de 200. Logiciel R (<http://R-project.org>). Auteur : M. ROTH

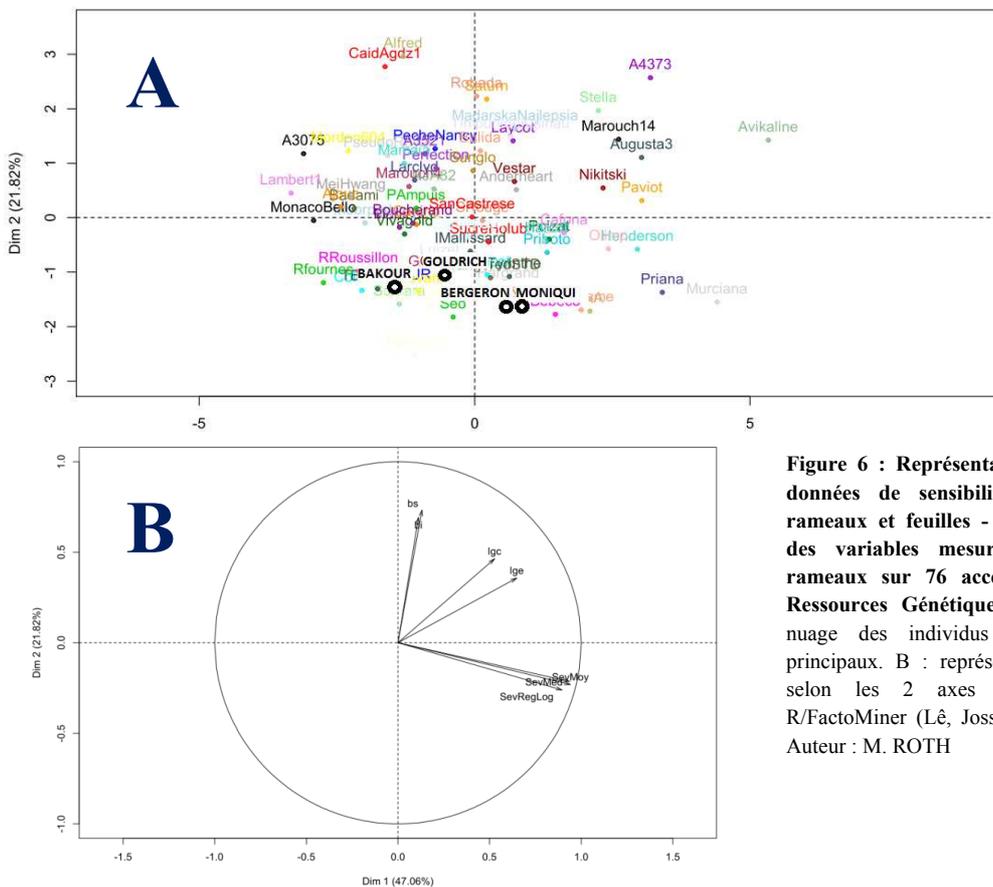


Figure 6 : Représentation synthétique des données de sensibilité bactérienne sur rameaux et feuilles - ACP sur l'ensemble des variables mesurées sur feuilles et rameaux sur 76 accessions du panel de Ressources Génétiques reséquencées. A : nuage des individus selon les 2 axes principaux. B : représentation des variables selon les 2 axes principaux. Package R/FactoMiner (Lê, Josse, and Husson 2008). Auteur : M. ROTH

Caractérisation des symptômes du panel de Ressources Génétiques constitué de 76 accessions après inoculation sur feuilles

Bien que les symptômes bruts ne montrent pas une répartition bimodale des symptômes (Fig.5), la note intégrant les coefficients du modèle de régression logistique multinomial fait apparaître une ségrégation des accessions en deux classes de sensibles et de résistants (test binomial sur le pourcentage de valeurs au dessus de 200, p-value=0.55). Les moyennes brutes par classe montrent une continuité des valeurs, avec une majorité des individus répartis entre les notes 1 et 4. Les moyennes de pourcentage de nécrose faisant référence à la médiane des classes (note **sevmed**) montrent un plus grand nombre d'individus moyennement à peu touchés. L'effet du génotype est validé par le test du $2\hat{I}$ (valeur de $2I$ supérieure à 449, valeur de Chi^2 correspondante).

La moyenne des notations sur les feuilles de la descendance GoMo a été de 1, là où elle a été de 2 pour panel de RG.

Isolement des bactéries dans les tissus inoculés avec et sans la bactérie

La présence de *P. syringae* a été validée par les tests de fluorescence et de réaction à l'oxydase sur chacun des échantillons testés de rameaux et de feuilles inoculées. Par souci de concision, le détail de ces résultats n'est pas présenté.

III.1.3. Lien entre les réactions observées sur les rameaux et les feuilles dans le panel de ressources génétiques constitué de 76 accessions

Au sein du panel de ressources génétiques, les analyses comparées des inoculations sur rameaux et sur feuilles peuvent être synthétisées dans une ACP (Fig.6). Les deux axes principaux portant respectivement 21,82% et 47,06% de la variabilité observée ce qui suggèrent une quasi-indépendance des réactions de chaque type d'organe (Fig.6-B). Parmi les variables des rameaux, les **brunissements interne et superficiel** ont un comportement singulier, qui s'exprime sur l'axe 4 (9,6% de la variabilité observée, non représenté), où ces deux variables s'opposent et où **lgc**, **lge**, ainsi que les variables des feuilles se regroupent. La différenciation des variables mesurées sur rameaux, **lge** et **lgc** d'une part et **bi** et **bs** d'autre part, est en contraste avec ce qu'on observe dans la population BerBa, où les variables au sein d'une même année (**lgc** et **bi** pour 2012 et **lgc**, **lge**, **bi** et **bs** pour 2013) forment un groupe homogène (Fig.2). Bakour et Goldrich se situent parmi les individus aux notes globalement faibles (quart inférieur droit). On pourra noter la grande proximité entre l'ensemble des parents des populations biparentales étudiées Bakour, Bergeron, Goldrich et Moniqui, qui souligne la variabilité accrue des réactions et des profils d'individus au sein du panel de RG (Fig.6-A).

III.2. Analyse des données de génotypage et détection de zones d'intérêt pour la résistance à *Pseudomonas syringae*

III.2.1. Analyse de liaison sur les variables observées sur rameaux et feuilles dans deux populations biparentales

Etude de la résistance à *Pseudomonas syringae* sur rameaux dans la population BerBa

Positionnement des marqueurs par cartographie génétique

Sur un total de 300 marqueurs SSR criblés sur les parents, 72 ont été sélectionnés et 63 ont pu être génotypés chez 87 individus. Sept d'entre eux restent isolés des groupes de liaison identifiés. Douze marqueurs en distorsion de ségrégation ont pu être cartographiés. Ils se divisent en deux groupes, l'un dans la partie inférieure du GL1a et l'autre dans la partie inférieure du GL7a. La configuration de ces régions pourrait expliquer le fait que les portions

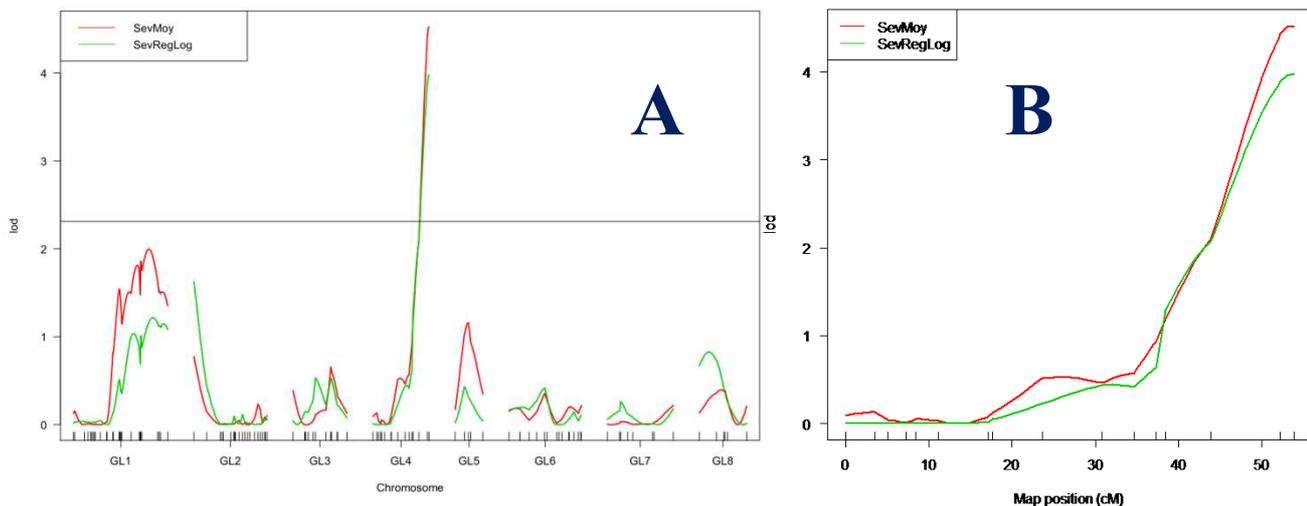


Figure 5 : Représentation graphique des valeurs de LOD score obtenues par détection de QTL sur la carte génétique du parent Goldrich pour les symptômes de sensibilité bactérienne sur feuilles dans la population hybride Goldrich × Moniqui de 196 individus (méthode IM – seuil de LOD score : 2,3). A : LOD score sur les 8 groupes de liaison. B : LOD score sur le groupe de liaison 4. SevMoy = sévérité moyenne ; sevreglog = note de sévérité obtenue à l’aide des coefficients du modèle de régression logistique multinomiale. Package R/qtl (Broman et al. 2003). Auteur : M. ROTH.

Chromosome	Position du dernier SNP	Nombre de marqueurs	Distance moyenne (kb)
1	46850878	1694	27,6
2	26713908	901	29,5
3	21961609	906	24,2
4	30131593	1019	29,5
5	18423148	731	25,1
6	28846152	1022	28,2
7	22721651	813	27,6
8	21789080	853	25,5

Tableau 4: Caractéristiques du jeu de 7939 SNPs obtenu après un filtre sur le polymorphisme et la position des marqueurs au sein des gènes (76 accessions). La distance moyenne est la celle entre deux SNP consécutifs, en kilobases. Auteur : M. ROTH

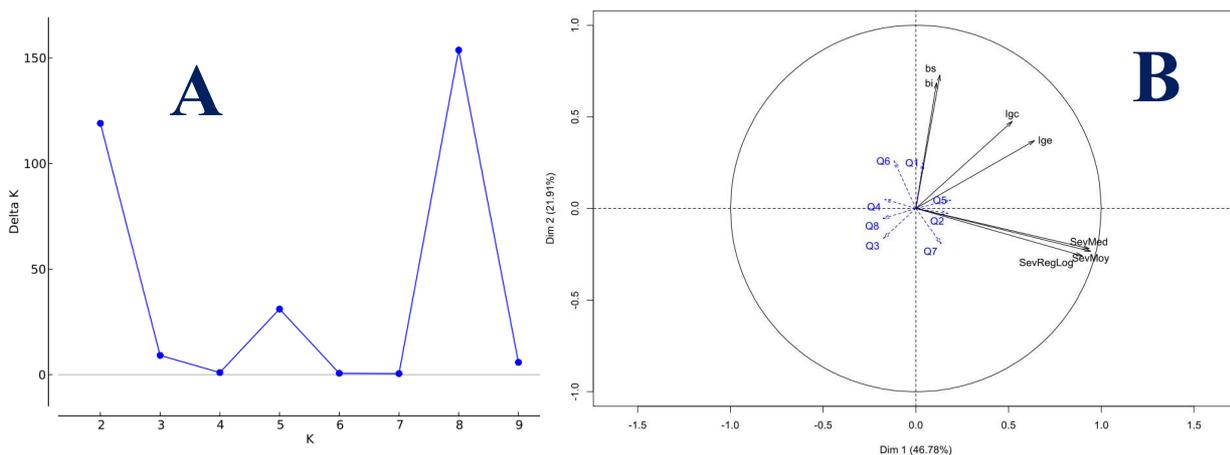


Figure 6: Structure populationnelle de 76 accessions d’abricotier et lien avec les variables de résistance à *P. syringae* mesurées après inoculation (Pss, souche 41A). A. Représentation graphique des valeurs de Delta K obtenues à partir des résultats de STRUCTURE (Pritchard, Stephens, and Donnelly 2000) avec l’application en ligne STRUCTURE HARVESTER (Earl 2012) avec 7939 marqueurs SNP polymorphes. B. ACP des variables caractérisant les réactions aux inoculations sur rameaux et feuilles avec leurs coefficients pour chaque valeur de Q correspondant aux 8 groupes génétiques obtenus à l’aide de STRUCTURE. Package R/FactoMiner (Lê, Josse, and Husson 2008). Auteur : M. ROTH

a et b des chromosomes 1 et 7 ne parviennent pas à se regrouper. Aucun marqueur n'a pu être cartographié sur le GL4. Le chromosome le mieux représenté est le GL1 avec 17 marqueurs au total. La carte de Bakour s'étend sur 428,6cM et comporte 52 marqueurs et celle de Bergeron couvre 275,9cM avec 39 marqueurs. Elle est présentée en ANNEXE X.

Détection de QTLs pour la résistance sur rameaux à *Pseudomonas syringae*

Allèles de Bakour – Aucun QTL n'a pu être mis en évidence sur les variables mesurées (**lgc**, **lge**, **bi**, **bs**, en 2012 et 2013). Une zone du GL8 située en position 0 cM, au niveau du marqueur UDAP-470, se situe en limite de significativité pour la longueur de brunissement interne mesuré en 2012, avec un LOD score de 2,00. Aucune zone significative n'a été mise en évidence à l'aide des marqueurs polymorphes chez Bergeron.

Etude de la résistance à l'inoculation bactérienne sur feuilles dans la population GoMo -

Détection de QTLs pour la résistance sur feuilles à *Pseudomonas syringae*

Allèles de Goldrich (Fig. 7) – Une zone significative ressort de l'analyse en cartographie d'intervalle simple sur les variables **sevmoy** (LOD score de 4,5) et **sevreglog** (LOD score de 4,0) (**Fig.7-A**). Elle est localisée à 53,8cM du GL4, au niveau du marqueur ECU1775 (**Fig.7-B**). L'intervalle de confiance autour de cette position est de 4,8cM pour la variable **sevmoy** et de 8,8cM pour la variable **sevreglog**. Le pourcentage de variation expliqué par ce QTL est faible, de 11,4 et 10,1% respectivement pour **sevmoy** et **sevreglog**. L'effet du QTL est de 0,5 sur la note **sevmoy** et de 11 sur la note **sevreglog**. Une zone est en limite de significativité sur le GL1 en position 72cM entre les marqueurs UDP98-022 et UDAP-471B (zone de 54,4cM), au niveau du marqueur EPDCU3489 (**Fig.7A**). La cartographie d'intervalle composite ne révèle pas d'autre zone significative.

Aucune zone d'intérêt n'a été détectée par rapport aux allèles de Moniqui, le LOD score le plus élevé se trouvant sur le GL2, et compris entre 1 et 1,6 pour l'ensemble des trois notes (le seuil étant de 2.3).

III.2.2. Analyse d'association sur les variables observées sur rameaux et feuilles dans le panel de RG constitué de 76 accessions re-séquencées

Filtre sur le jeu de données de 200.000 SNPs représentés sur 93 individus de la collection

Le filtre sur le polymorphisme de 76 accessions de la collection et la position des SNP (un par gène) nous a permis d'obtenir un jeu de 7939 SNPs de position physique connue et répartis sur l'ensemble du génome. Leur répartition est présentée dans le **Tab.4** ci-contre.

Etude de la structure et de l'apparentement du panel

L'ensemble de 7939 SNPs a servi à établir la structure populationnelle du panel. La méthode d'Evanno appliquée aux résultats obtenus par STRUCTURE nous donne un delta K formant trois pics, à K=2, K=5 et K=8 (**Fig.8-A**). Le modèle le plus probable est celui d'une population structurée par huit groupes génétiques. Ceci est en accord avec les études de diversité menées précédemment à l'aide de marqueurs SSR (Lasnier, 2013). Une première confrontation de la structure avec les symptômes observés a été réalisée à l'aide d'une ACP représentant les individus par rapport aux variables mesurées sur laquelle ont été projetées en illustratif les variables 'Q' contenant les coefficients de chaque individu pour chaque groupe de 1 à 8. Cependant, les variables Q1 à Q8 ne sont pas bien représentées par les principaux axes (**Fig.8-B**), montrant que les phénotypes observés n'ont pas de lien évident avec la structure du panel. Les associations seraient donc relativement indépendantes de la structure populationnelle pour les variables observées.

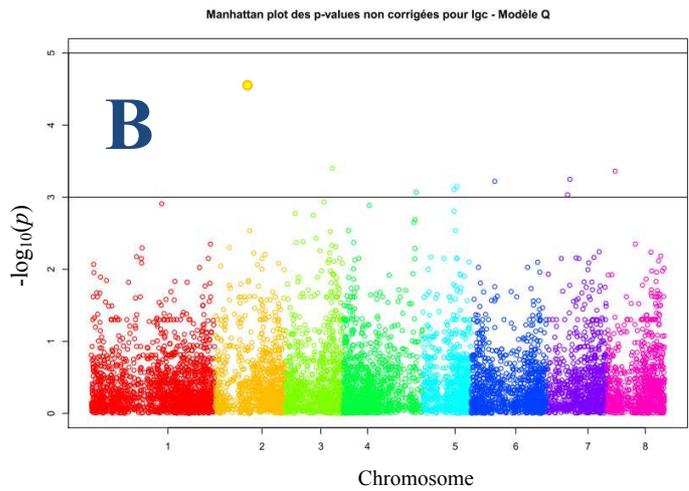
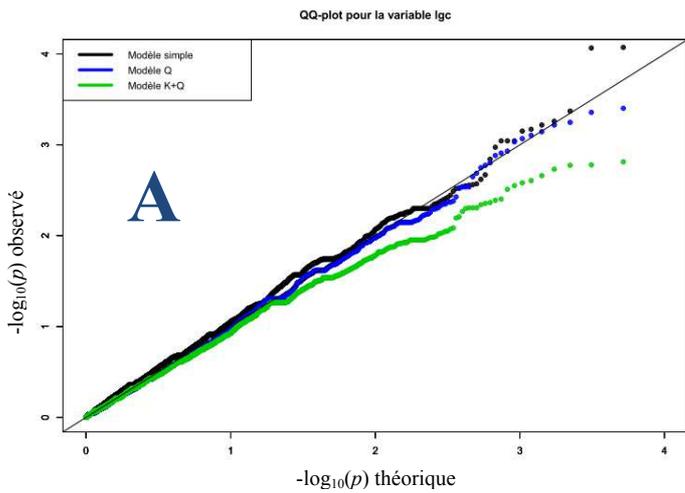


Figure 7 : Résultats de l'analyse d'association pour la variable *lgc* au sein d'un panel de 76 accessions et de 7939 SNPs A: QQ plot représentant la distribution des p-values obtenues selon les 3 modèles testés et permettant de comparer les différents modèles testés B : Manhattan plot représentant le $-\log_{10}(p)$ associée à chaque SNP en fonction de la position génomique du marqueur en mégabases (modèle Q). Le seuil de $-\log_{10}(p\text{-valeur})=3$ marque le seuil de significativité des associations obtenues. Réalisé à l'aide du code R/qqman (Turner 2011). Auteur : M. ROTH

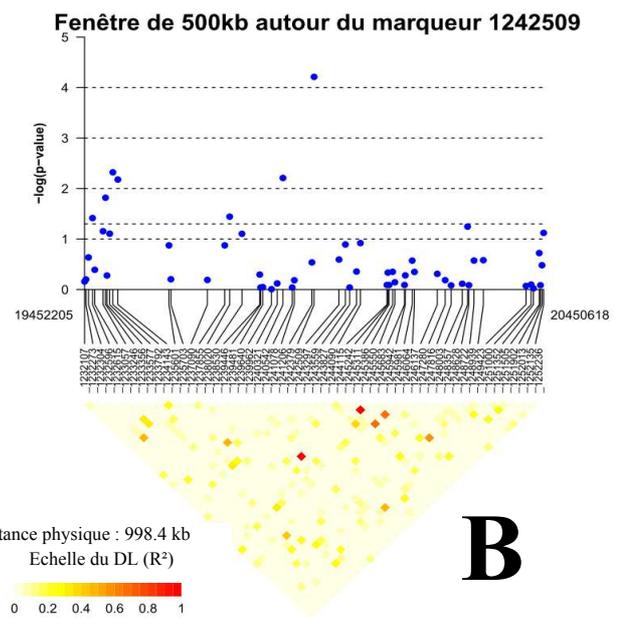
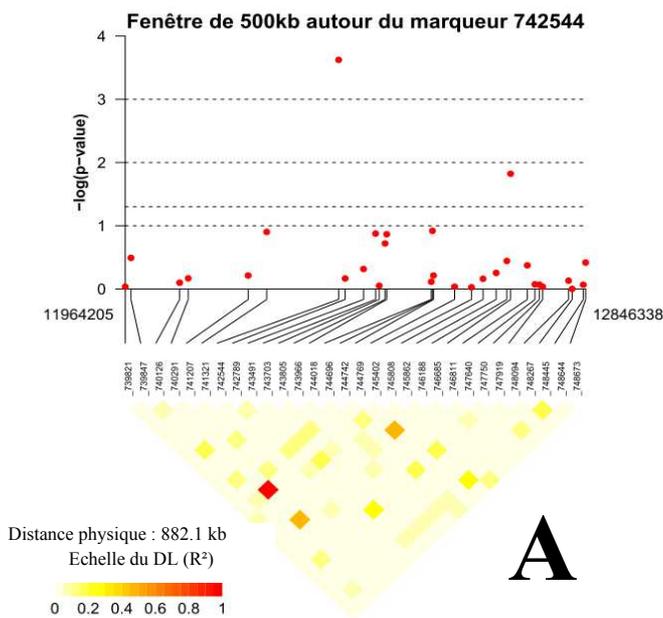


Figure 10 : Motif du déséquilibre de liaison (DL) et des valeurs de P autour de deux marqueurs SNPs présentant chacun une forte association avec les variables mesurées sur rameaux et feuilles inoculés. Valeurs de DL : r^2 . Positions en paires de bases. A : DL autour du marqueur 742544 situé sur le chromosome 2 et associé au caractère « longueur de chancre » sur rameaux. B : DL autour du marqueur 1242509 situé sur le chromosome 3 et associé au caractère de sévérité sur feuilles « *sevmed* ». kb : kilobases. Réalisé à l'aide du package R/snpplotter (Luna and Nicodemus 2007). Auteur : M. ROTH

L'apparentement (Kinship) entre les individus du panel est faible, avec une moyenne estimée à 0,012, un écart type de 0,031, et 33% de valeurs nulles. Un phylogramme proposé en ANNEXE XI permet de constater ce faible apparentement.

Choix du modèle d'association, correction des p-values et résultats

Le modèle jugé le plus pertinent au vu des QQ-plot est le modèle linéaire généralisé intégrant la matrice Q. En effet, il est le modèle donnant pour chacune des six variables une répartition des p-valeurs observées la plus proche des p-valeurs théoriques, comme illustré **Fig.9-A** sur la variable **lgc**. Pour des raisons de concision, nous avons fait le choix de présenter la démarche menant au choix du modèle pour la variable **lgc** (**Fig.9**) puis de reporter une synthèse des associations pour l'ensemble des variables étudiées dans l'ANNEXE XII et les associations particulièrement proches entre elles dans l'ANNEXE XIII. Les 44 associations détectées restent inchangées par la correction choisie car l'ensemble des p-valeurs restent significatives au seuil de 1.10^{-3} . Pour les variables portant sur les rameaux, des associations ont été détectées sur tous les chromosomes sauf sur le 1 et pour les variables portant sur les feuilles, tous les chromosomes sont concernés sauf le 7. En particulier, l'association la plus significative pour **lgc** se situe au marqueur 742544 (chromosome 2) avec une p-valeur de 2.10^{-4} et la plus significative pour **sevmed** et **sevmoy** se situe au marqueur 1242509 (chromosome 3) avec une p-valeur de 6.10^{-5} pour **sevmed** et $1,5.10^{-4}$ pour **sevmoy**. On peut remarquer deux zones d'association entre des variables portant sur les deux types d'organe : pour les variables **sevreglog** et **bs**, une zone de 30kb d'écart sur le chromosome 3 ; ainsi qu'une zone de 90kb sur le chromosome 5 portant deux associations pour **lgc** et **sevmed**.

Analyse du déséquilibre de liaison dans deux zones d'intérêt

La représentation de la décroissance du DL selon la distance physique (kb) peut être visualisée sur chacun des chromosomes en ANNEXE XIV. La résolution de nos associations est d'autant plus forte que le DL dans les zones détectées est faible. A l'échelle du génome, et dans le panel étudié, le DL moyen est relativement faible (**Tab.5** ci-contre).

Chromosome	DL moyen (r^2)	écart-type de r^2
1	0,064	0,092
2	0,056	0,082
3	0,059	0,085
4	0,057	0,078
5	0,073	0,103
6	0,059	0,082
7	0,061	0,087
8	0,050	0,075

Tableau 5 : Déséquilibre de liaison moyen marqueurs deux à deux (r^2) et écart-type sur l'ensemble des chromosomes calculé pour 76 accessions à l'aide de 7939 SNPs par Plink!. Auteur : M. ROTH

Comme il est également très variable d'une région à une autre, nous avons décidé de nous focaliser sur deux régions du génome les plus associées au caractère de résistance pour chacun des deux types d'organes, et d'y étudier le motif du DL (**Fig.10**). Ces régions sont matérialisées par les marqueurs 742544

pour la variable **lgc** mesurée sur rameaux, et par le marqueur 1242509 pour la variable **sevmed** mesurée sur feuilles.

Marqueur 742544 sur rameaux – C'est un SNP rare de type C/T (transition), dont l'allèle CT est présent chez 5 individus du panel traité et qui explique 20,8% de la variabilité de **lgc**. Son DL moyen au sein du chromosome 2 est très faible (R^2 de 0.01), ce qui s'observe également dans un environnement direct de 500kb (**Fig.10-A**). Les marqueurs voisins ne présentent pas de valeurs de p particulièrement basses, traduisant la force de cette association entre ce marqueur et les symptômes de chancre.

Marqueur 1242509 sur feuilles – C’est un SNP très répandu, de type C/T. Les trois allèles sont CC (21 individus) CT (11 individus) et TT (44 individus). De même que pour le marqueur précédent, ce SNP explique une proportion considérable de la variabilité phénotypique observée sur feuilles : 25,8% pour **sevmed** et 23,5% pour **sevmoy**. Le DL moyen autour ce marqueur sur le chromosome 3 est nul, et très faible dans son voisinage direct (500kb, **Fig.11-B**), donnant là aussi une excellente résolution de l’association entre ce marqueur et la variable de sensibilité sur feuilles **sevmed**.

IV. Discussion

*L’étude que nous avons menée visait au criblage de la résistance de l’abricotier à *P. syringae*, bactérie responsable du dépérissement bactérien chez les *Prunus*, à partir d’un vaste panel d’individus, dans le but de valider l’hérédité de la résistance et d’identifier les zones du génome impliquées. Nous avons étudié les réactions de deux types d’organes pour lesquels nous attendions une variabilité génétique sachant leur importance en verger (rameaux et feuilles). Les observations ont été faites à l’aide de deux types de populations complémentaires, populations biparentales et collection de ressources génétiques, afin d’obtenir une vision à la fois large, complète et précise de l’expression et du déterminisme génétique de cette résistance.*

IV.1. Réponses aux objectifs de travail initiaux

Notre dispositif expérimental a permis de discriminer les individus dans l’ensemble des populations à l’aide de plusieurs variables descriptives des symptômes sur chaque type d’organe. L’**effet marqué du génotype** dans nos observations sur les populations biparentales nous indique que le caractère de résistance ségrége au sein des populations choisies, et ce de manière quantitative, reflétant pour chacun des types d’organes l’**absence d’une composante majeure de résistance, telle qu’un gène majeur**. L’héritabilité des caractères de longueur de chancre et de brunissement interne mesurés dans la population BerBa est élevée (69 et 67% d’héritabilité pour **lgc** et **bi** entre 2012 et 2013), malgré des interactions G×E non négligeables. L’étude des rameaux chez les 587 individus de la collection ainsi que les feuilles des 76 accessions du panel de diversité montre également de fortes disparités entre les génotypes en termes de réponse au stress. La distribution des symptômes et l’absence de corrélation entre la structure du panel et les symptômes observés indiquent que la résistance est un **caractère à la fois peu répandu et indépendant de l’origine phylogéographique des individus**. Au vu des deux premiers axes de l’ACP réalisée en IV.1.3., nous pouvons proposer une liste de 10 cultivars ayant des sensibilités faibles à la fois sur rameaux et sur feuilles : **Colomer, Rouge de Fournes, Rouge du Roussillon, Screara, Tardif de Bordaneil, qui sont des variétés françaises, Lambertin N°1 et Dwarf Darnaud (Etats-Unis d’Amérique), Bakour (Tunisie), Monaco Bello (Italie) et Palsteyn (Afrique du Sud)**. Ayant validé l’existence d’un effet génétique sur les caractères observés, nous avons pu mettre en évidence des régions génomiques (QTL) liées à la résistance chez l’abricotier, à l’aide d’une double analyse de liaison et d’association (GWAS), révélant ainsi la complémentarité de ces deux types d’approches. Chez la population GoMo un QTL lié à la résistance des feuilles aux inoculations de *P. syringae* localisée sur le **chromosome 4** au niveau du **marqueur ECU1775** a été identifiée. Cette zone, responsable 10,1 à 11,4%, de la variabilité observée dans les réactions sur feuilles colocalise avec une région détectée sur des données obtenues, en 2012, à l’aide d’une méthode d’inoculation différente et réalisée sur 87 individus de cette même population (Gil, résultats non présentés).

L'intervalle de confiance du QTL, compris entre 4,8 et 8,8cM selon les variables observées en 2013, et sa stabilité sur deux années nous indiquent qu'il s'agit d'une zone suffisamment précise et robuste pour être davantage exploitée dans une **démarche de cartographie fine et de sélection assistée par marqueurs**. Par ailleurs, l'étude de la résistance sur les deux organes à l'aide d'une approche GWAS nous a permis d'établir pour chacune des variables mesurées une **liste de gènes candidats** (40 au total), et de mettre en évidence deux zones pour lesquelles **des résistances sur chacun des organes semblent co-localiser** sur les chromosomes 3 et 5 (ANNEXE XIII). Une zone entre les deux marqueurs situés en position 27.212kb et 27.691kb, c'est-à-dire en fin du chromosome 4 (dont la taille approximative est de 30 Mb), a été **identifiée** comme responsable à la fois d'une différence de **brunissement superficiel** et de la **longueur de chancre** significative entre les individus. Cette zone terminale du chromosome 4 pourrait donc être le support d'une résistance tissulaire à la bactérie, à la fois sur rameaux et sur feuilles. Par ailleurs, il existe une corrélation significative entre **lgc** et les variables décrivant les feuilles (corrélation comprise entre 0.33 et 0.36), montrant qu'une part de la variabilité observée au sein des génotypes repose sur un support génétique commun. D'autre part, l'ensemble des SNPs associés par GWAS présentent un **déséquilibre de liaison faible** sur le chromosome auquel ils appartiennent (r^2 maximum de 0,21 et ANNEXE XIV), voire dans un voisinage proche (étudié pour les marqueurs 742544 et 1242509), indiquant une grande précision dans la définition de ces zones. De plus, les résultats nous ayant démontré que **la structure n'intervient pas de manière notable dans le caractère étudié**, ceci donne plus de force à l'interprétation biologique sous-jacente à nos associations. Autrement dit, elles ne peuvent pas être de faux positifs dus à des artefacts de la structure de la population étudiée.

IV.2. Connaissances apportées sur les mécanismes de résistance au dépérissement bactérien de l'abricotier

Une réponse quantitative à la maladie - Les réponses aux inoculations de l'abricotier par un isolat de *P. syringae* sur rameaux et feuilles traduisent un **comportement profondément quantitatif** des réactions observées reflétant des caractères sous contrôle génétique complexe ou polygéniques. Sur feuilles comme sur rameaux, le modèle de résistance semble être une superposition d'effets faibles illustrant le **modèle infinitésimal de Fisher** (Fisher 1919) qui décrit une succession de mutations sur une longue période de temps contribuant à un caractère complexe. En témoignent les résultats d'association, présentant un effectif élevé de gènes candidats et qui ne sont pas en déséquilibre de liaison entre eux. Au vu des symptômes observés, le terme de **tolérance** est certainement plus approprié que celui de résistance, car toutes les accessions développent des symptômes après inoculation et aucune d'entre elles n'est totalement résistante. Nous avons donc certainement identifié des composantes de tolérance, versus de sensibilité, et non de la résistance.

Un fort effet environnemental a été observé dans nos mesures, traduit par l'effet année en interaction avec le génotype sur les variables **lgc** et **bi** (notes de 2012 et 2013 non corrélées). Les notes de **lgc** et **bi** plus élevées en 2013 s'expliquent certainement par un délai entre l'inoculation et le phénotypage plus long ainsi que par des conditions hivernales 2012-13 particulièrement favorables au développement des symptômes. Ce résultat, qui était prévisible, justifie le travail engagé et notamment la recherche d'une anticipation des risques génétiques liés à la sensibilité à la maladie.

Des réactions au sein des couples de parents des populations biparentales peu contrastées- En effet, elles ne se différencient pas significativement, ce qui a une origine différente dans les deux cas (Bergeron/Bakour et Goldrich/Moniqui). Les rameaux de Bakour sélectionnés en 2013 présentent un caractère peu cohérent avec les observations antérieures. Pour nous prémunir d'une interprétation abusive, des **tests complémentaires** sont en cours pour contrôler l'état sanitaire de ce clone et notamment la présence de phytoplasmes qui perturberait la réactivation des tissus. Dans le cas de Goldrich et Moniqui, nous attendions des criblures prononcées sur Goldrich et un comportement de moindre sensibilité sur Moniqui (Audergon, communication personnelle). Les modalités d'inoculation n'ont pas ciblé les composantes de sensibilité typiques de Goldrich, mais plutôt une sensibilité tissulaire qui s'exprime chez chacun des parents. Ceci peut en partie expliquer la faible étendue de la gamme de symptômes au sein de la population GoMo, mais des conditions d'inoculation peu favorables au développement de la bactérie lors de nos inoculations peuvent être aussi en cause, en particulier de fortes pluies post-inoculatoires. Ceci n'a cependant pas empêché l'identification de différences de sensibilité d'origine génétique.

Une complémentarité entre les variables mesurées – Sur rameaux, les variables **lgc** et **lge** (fortement corrélées) rendent *a priori* compte de la sensibilité au chancre telle que définie par la filière arboricole. Cependant, les phénomènes de brunissement observés (**bi** et **bs**) semblent peu liés aux lésions corticales alors même qu'ils sont génétiquement dépendants et associés à la présence de bactéries. Ces données éclairent d'un regard nouveau la sensibilité variétale et ses **déterminants a priori multifactoriels**. Le lien entre les variables mesurées, dont chacune reflète un aspect de la réaction, mérite donc d'être davantage éclairé, en particulier l'origine du brunissement interne et ses conséquences sur le comportement de la plante. Nous avons pu observer la singularité de ce caractère dans la collection où l'effet du génotype n'a pas été validé, malgré un fort développement des symptômes (moyenne de 29,3cm dans la collection, contre 17,7cm dans la BerBa). **Le brunissement interne résulte d'une interaction complexe entre oxydation des tissus et synthèse de toxines bactériennes**. Les flavonoïdes, molécules constitutives de la plante qui peuvent présenter une couleur caractéristique, sont généralement des molécules de défense. Elles sont soit **induites**, et reflètent donc une interaction « hôte × pathogène », soit **préformées** (Treutter 2006), alors mobilisés au contact de la bactérie. Les teneurs en flavonoïdes sont sans doute fortement **liées au génotype**, comme cela a été démontré pour le fruit chez l'abricotier (Ruiz et al. 2005; Sochor et al. 2010). Toutefois, les flavonoïdes du bois restent encore peu caractérisés chez les *Prunus* (Hillis et Swain 1959; Iwashina 2000). La teneur du bois en flavonoïdes peut avoir un rôle dans la résistance, tout comme elle peut être purement constitutive, auquel cas elle ne contribuerait qu'au bruit environnemental dans nos mesures. Néanmoins, **la bactérie a pu être ré-isolée sur des tissus brunis** au sein d'un large panel d'échantillons, nos mesures reflètent donc bien une manifestation de son développement. **Une démarche ciblée sur les métabolites tels que les flavonoïdes** induits par la présence de la bactérie et leur déplacement dans le système vasculaire viendrait sans doute éclairer ces questionnements. Par ailleurs, la comparaison entre les observations de résistance tissulaire sur les deux types d'organes nous amène à considérer **deux mécanismes de réaction bien distincts**, tous deux quantitatifs et très peu liés à la structure du panel étudié, donc à l'origine phylogéographique des individus. Il convient de rappeler que Bakour est une variété Tunisienne et qu'elle a évolué dans un contexte où la **pression sélective du dépérissement bactérien est quasi nulle**. Les déterminants de la résistance pourraient provenir de mutations fortuites, de même que des *P. syringae* peuvent être pathogènes sur certaines espèces ou résistantes à des antibiotiques alors qu'elles sont privées de tout contact de leur hôte dans leur milieu de vie (Morris et al. 2007).

Sur feuilles, une seule notation visuelle a servi à établir plusieurs variables qui offrent un regard complémentaire sur les symptômes. La variable **sevreglog** qui est issue du modèle de régression logistique est la seule qui discrimine les individus en deux classes résistants/sensibles. Elle permet dans le panel de RG de mettre en évidence des zones complémentaires par rapport aux variables **sevmed** et **sevmoy**, notamment sur les chromosomes 2, 4, et 8 (ANNEXE XI). Cette variable présente trois fois plus de marqueurs en associations que les variables **sevmed** ou **sevmoy**. Ceci montre l'importance du choix des variables de départ dans la détection d'effets génétiques, en particulier lorsque ceux-ci sont faibles.

Convergence des mécanismes de résistance sur les deux types d'organe – Les analyses en composantes principales sur l'ensemble de variables mesurées (*cf* IV.1.3.) montrent que les mécanismes de résistance des rameaux sont *a priori* très différents de ceux des feuilles. Toutefois, **une faible part de la variabilité observée dans les symptômes a une origine convergente sur les deux types d'organes**, ce qui est supporté par la comparaison des principaux axes de l'ACP (notamment les axes 1 et 4) et la proximité de facteurs de résistance sur l'extrémité terminale du chromosome 4.

IV.3. Complémentarité des résultats des populations hybrides et du panel de diversité

Les travaux réalisés mettent en évidence la nécessité de travailler sur des populations diversifiées. Comme l'ont résumé Kole et Abbott (2012), l'analyse de liaison dans les populations biparentales permet de disséquer les composantes d'une source de résistance donnée mais chez les arbres fruitiers, sa mise en place la rend moins précise et surtout moins puissante que la GWAS pour détecter des zones d'intérêt. Ceci s'explique à différents niveaux :

- Le **type de marqueur** choisi peu révéler un faible taux de polymorphisme entre les parents, comme cela a été le cas dans la population BerBa criblée par des marqueurs SSR,
- Les **populations ont une taille limitée** par des contraintes spatiales et/ou de coût. Considérant la population Berba, bien que phénotypée dans sa totalité (224 individus), seule une faible proportion d'individus a été génotypé (40%), réduisant la représentation de combinaisons génotype×phénotype. La population GoMo, par contre, a pu être étudiée dans son intégralité (196 individus).
- Les **populations F1** sont issues seulement d'un brassage interchromosomique entre les deux parents, et non d'un brassage intrachromosomique de leurs allèles, pouvant limiter la ségrégation du caractère quantitatif étudié. Nous n'en avons cependant pas vu les conséquences, car les génotypes étudiés ont révélé une grande variabilité phénotypique dans leurs réactions aux inoculations.

Par ailleurs, nos travaux démontrent le **grand intérêt à poursuivre les travaux de GWAS chez l'abricotier** notamment en raison de la **faible étendue du DL** à l'échelle du génome (ANNEXE XIV) et par la **large diversité disponible** pour cette espèce, mais aussi l'accessibilité de données de **séquençage à haut-débit**. En effet, l'étude du DL n'est encore qu'à ces débuts chez l'abricotier (Kole et Abbott 2012). Elle a été initiée par les travaux de Olukolu (Olukolu 2010), sur des zones ciblées des GL1 (32 SSR) et GL7 (23 SSR), dans l'étude du caractère de besoin en froid. Nos travaux ont permis d'avancer sur ce terrain en constatant un faible DL à l'échelle du génome entier, et d'identifier avec précision des zones liées à la résistance au dépérissement bactérien. Le succès d'une approche par GWAS est dépendant du **choix des individus** qui, s'il est judicieux, permettra dans une même analyse de

combiner différents caractères. L'effectif de 76 accessions que nous avons exploité ici peut paraître faible, il s'est néanmoins **révélé extrêmement représentatif de la diversité** connue au sein de cette espèce et assez puissant pour révéler des zones liées à notre caractère d'intérêt. Le panel constitué peut vraisemblablement être considéré comme une **core-collection** et son extension ne fera qu'augmenter sa représentativité de la diversité.

IV.4. Analyse critique des dispositifs expérimentaux mobilisés et pistes d'amélioration

Ayant conscience du caractère préliminaire des travaux engagés, l'analyse des résultats nous suggère de nombreuses pistes d'amélioration.

Le Phénotypage – Pour étudier les deux types d'organes, nous avons fait le choix de travailler en conditions naturelles. Des essais préliminaires en **conditions contrôlées** sur rameaux se sont révélés inefficaces pour discriminer les individus (Gil, 2012, non publié et Thomidis and Exadaktylou, 2008). Travailler en verger permet également, dans le cas des rameaux, de bénéficier de la **réactivation printanière des tissus**, déterminante dans le développement des symptômes. Nous nous trouvons alors confrontés à des effets environnementaux forts, ce qui requiert un travail sur le long terme pour consolider le phénotypage de chaque individu. Aussi, des **observations pluriannuelles** permettront de caractériser et de lisser les déterminants des interactions G×E. Le **nombre de répétitions** devrait également être augmenté pour accroître la robustesse des analyses. Tout particulièrement dans le cas des expérimentations conduites **sur rameaux**, il semble indispensable de réaliser le test du témoin sur un nombre beaucoup plus restreint d'individus (10%), permettant d'augmenter le nombre de répétitions. De manière complémentaire, nous proposons de préparer les arbres par une taille laissant suffisamment de **rameaux disponibles et homogènes** en hauteur et en diamètre.

Concernant l'étude des criblures **sur feuilles** dans la population GoMo, les résultats éclairent de manière complémentaire le questionnement initial. La sensibilité tissulaire observée via les inoculations doit être complétée d'une **notation pluriannuelle des symptômes naturels de criblures** pour pouvoir traiter la question des **portes d'entrées** qui sont propres à Goldrich. Le perfectionnement d'une méthode d'inoculation sans blessure en conditions contrôlées est envisageable, en prenant par exemple appui sur celle de Domnez et collaborateurs, par pulvérisation en chambre climatisée (Domnez et al, 2010).

Le Génotypage – Les marqueurs SSR ont permis de couvrir le génome, de manière dense dans la population GoMo et sur certaines régions dans la population BerBa. Ils permettent de représenter deux à quatre allèles par locus, confirmant l'intérêt de leur emploi chez les *Prunus* (Struss et al. 2003). Nous avons toutefois été confrontés au faible **polymorphisme entre Bergeron et Bakour** (environ 1 marqueur polymorphe sur 5), qui reflète sans doute la proximité des phylums nord-européen (Bergeron) et méditerranéen (Bakour) (Bourguiba et al. 2012). La voie aujourd'hui préconisée est le recours à une densification par d'autres types de marqueurs, plus abondants dans le génome, les SNPs. Le projet ABRIWG dans lequel, entre autres, Bergeron, Bakour, Goldrich et Monique ont été re-séquencés a permis une **récente détection de SNPs entre parents deux à deux** (Wong, communication personnelle). Ainsi, **entre Bergeron et Bakour un ensemble de 185.014 SNPs est d'ores et déjà disponible**, qu'il conviendra d'exploiter sur la population hybride. Cette densification sera accompagnée d'un génotypage plus large de la population, dont seulement 40% était représentée jusqu'ici, afin de **gagner en représentativité des allèles et des phénotypes**.

Enfin, nous pouvons faire état d'une **perte partielle et définitive d'information génétique** au sein des populations hybrides. Les populations de cartographie de QTLs devraient en

théorie n'être soumises à aucune pression de sélection. Or celle-ci est accentuée par le fait de travailler sur des arbres en verger, qui engendre la perte de nombreux individus. Dans la population BerBa, plantée en 2004 à hauteur de 300 individus, les maladies ont entraîné la perte de 90 individus, dont 70 par dépérissement bactérien, soit **23% d'individus très sensibles qui échappent à notre étude**. Ainsi, il est probable qu'un déséquilibre des fréquences alléliques sur des zones en lien avec le caractère observé se soit établi au cours du temps. Une perte d'information d'un autre ordre réside dans le fait que nous travaillons sur deux **cartes génétique séparées père/mère**, omettant les interactions possibles entre leurs allèles. Cette méthode classiquement employée chez les arbres fruitiers (Testolin 2002) pourrait être améliorée en utilisant une carte consensus entre les parents grâce à des **marqueurs ponts** et à un codage prenant en compte l'ensemble des allèles présent à chaque locus (2 à 4). Une **approche de Bulk Segregant Analysis** ou BSA (Michelmore et al, 1991) permettrait de simplifier le travail de génotypage en regroupant des individus dans différents pools de génotypage selon différentes classes de phénotype relatives aux symptômes sur rameaux. Néanmoins, l'efficacité de cette méthode dépend fortement de la méthode de génotypage, car il s'agit de **quantifier avec précision les fréquences des allèles** identifiés dans les différents pools. Dans le panel de RG, les résultats sont très probants puisque des associations ont été identifiées dans un panel restreint de 76 accessions. Le re-séquençage de près de 60 individus complémentaires devrait accroître la représentativité des différents phénotypes, permettant de gagner en significativité sur les associations, mais aussi en révélant de nouvelles associations, notamment liées à des allèles rares et non représentées dans le panel de 76 accessions. Cependant, la **puissance informatique** requise pour traiter ces données de haut débit reste une contrainte qu'il ne faut pas négliger, car elle nécessite une connaissance adaptée des nouveaux outils de calcul informatique et de formatage des données, ainsi qu'un temps de calcul important. Cette dernière contrainte peut être contournée par le recours à des serveurs puissants mis en commun dans le cadre de conventions entre différentes unités et organismes de recherche (dans notre cas avec le CIRAD de Montpellier).

IV.5. Stratégie à mettre en place pour lutter contre la maladie et contribuer à l'amélioration variétale de l'abricotier

Les travaux engagés ont permis d'identifier des régions d'intérêt porteuses de facteurs de résistance à la maladie. L'élargissement de la population biparentale BerBa et de ses effectifs génotypés, puis l'exploitation des données de polymorphisme SNP devraient permettre d'identifier des gènes candidats dans cette population. Ils pourront être **validés sur la collection** et sur des descendance hybrides en ségrégation actuellement disponibles en verger d'observation. Toutefois la robustesse de la démarche devra être intégrée dans une logique de **durabilité** avec notamment la prise en compte de la **diversité de l'agent pathogène** et la complémentarité des mécanismes de résistance.

Analyse fine des composantes de l'interaction hôte/agent pathogène – Il faut ainsi rappeler que nous n'avons fait varier dans nos travaux que le génotype de l'abricotier, en travaillant toujours avec la souche 41A, qui est une **souche très agressive et virulente** (Lamichhane 2013, non publié). Nous pourrions nous attendre à des réactions différentes en impliquant d'autres souches, notamment celles portant des **gènes de vascularisation** (ou « woody genes »). Ces gènes découverts par l'annotation de séquence de diverses souches de *Pseudomonas* (Green et al. 2010; Rodríguez-Palenzuela et al. 2010) permettraient à la bactérie de pénétrer le système vasculaire (41A en est dépourvue), autrement dit de franchir les barrières naturelles de leurs hôtes (Morris, travaux en cours). Au regard des difficultés

d'analyse des composantes de résistance, un enjeu majeur réside dans la caractérisation fine des interactions plante × agent pathogène et dans le déploiement de mesures simples et robustes de caractérisation. Un préalable sera leur **étude sur un faible nombre de combinaisons** [**bactérie**_{souche} × **abricotier**_{clone}] pour étudier précisément les composés issus de leur interaction, déterminer le rôle du stade phénologique de l'arbre dans le développement de la bactérie, et les modalités d'observations préalablement à l'analyse à grande échelle. En revanche, travailler sur le seul génotype de l'hôte implique de figer l'ensemble de ces facteurs de variation, en fixant en priorité la souche et le stade phénologique de la plante.

Identification du support génétique de la résistance des feuilles et des rameaux - Il semble indispensable de garder une approche complémentaire entre populations biparentales et panel de diversité en allant vers :

- ❖ Le **Genotyping by Sequencing** (ou GBS, Elshire et al., 2011), sur les descendances ciblées avec une densification de certaines zones à l'aide de SNPs,
- ❖ Une extension des ressources séquencées pour **privilégier l'association**, en revenant de manière ciblée sur des populations biparentales issues de nouveaux croisements.

Application à la méthodologie de sélection – La sélection des arbres fruitiers est particulièrement soumise à la longueur des cycles de vie et à la grande quantité d'espace nécessaire aux observations des clones. Elle s'est donc rapidement tournée vers des méthodes économiques en temps et en coût, telles que la **sélection assistée par marqueurs (SAM)**, aujourd'hui employée chez l'abricotier pour l'autofertilité et la résistance à la Sharka (cité en I.1.1). Toutefois, la mise au point de la SAM est, elle aussi, jusqu'à présent longue et coûteuse. Le séquençage semble être en passe d'accélérer considérablement la découverte de marqueurs liés à des traits d'intérêt agronomique. Même si comme pour beaucoup d'espèces l'information génétique est de moins en moins un facteur limitant, **les enjeux résident dans la manière de phénotyper** en termes de quantité d'individus et de qualité (précision, répétabilité) du phénotypage. Les valeurs d'héritabilité observées sur les mesures de **lgc** et **bi** dans la BerBa nous indiquent que l'effet génétique reste majeur dans nos observations. Dans une perspective de phénotypage sur plusieurs années, nous sommes à même de consolider des zones d'intérêt portant des effets faibles. La stratégie de sélection doit donc concentrer ses forces sur un phénotypage robuste, basé sur une grande **connaissance de la biologie** et de la diversité de l'espèce, ainsi que sur la **rigueur statistique** employée pour traiter ces observations. Par ailleurs, la complexité apparente du caractère de tolérance au dépérissement bactérien ne nous fait pas remettre en cause la mise en place d'un schéma de SAM. Des individus candidats pourront être intégrés à l'analyse d'association et testés sur des descendances ciblées. **L'extension du panel de re-séquençage** entraînera certainement la découverte de nouvelles associations, à caractère plus ou moins rare et expliquant un faible taux de variation phénotypique. Un temps d'ajustement sera nécessaire pour valider la position des zones d'intérêt, mais elles seront amplement valorisées, à la fois en SAM et en sélection génomique, si la filière s'engage dans cette direction. En effet, l'abondance des caractères visés par l'amélioration des cultivars d'abricotier évoqués en I.2.3., et le caractère quantitatif avéré de bon nombre d'entre eux, nous permet d'envisager une stratégie de **sélection génomique** pour cette espèce, comme évoqué par Kole et Abbott (2012). La SAM et la sélection génomique permettront d'identifier des individus intéressants au sein de croisements ciblés ou d'orienter le choix de géniteurs sur la seule base des données génétiques, entraînant un gain de temps substantiel dans un schéma de sélection qui reste aujourd'hui particulièrement long chez les arbres fruitiers.

L'objectif de nos travaux était de décrire la variabilité et le support génétique de la résistance de l'abricotier à *Pseudomonas syringae*. Nous avons observé la sensibilité des rameaux et des feuilles sur un panel d'individus issus de deux pseudo-F1 et d'un panel de ressources génétiques. Un protocole rigoureux a été mis en place afin de discriminer les individus en conditions climatiques naturelles (verger) selon leur sensibilité à la bactérie. Les réactions suite à des inoculations tissulaires avec la souche pathogène 41A de *P. syringae* pv. *syringae* ont été mesurées. Le phénotypage a révélé une forte variabilité des symptômes en lien avec des facteurs génétiques d'origine polygénique complexe. La caractérisation génétique des individus à l'aide de marqueurs SSR sur les populations biparentales et de marqueurs SNP sur le panel de ressources génétiques a permis par des analyses de liaison (cartographie de QTLs) et par des analyses d'association ou Genome Wide Association Study (GWAS) de localiser les zones du génome en lien avec les composantes de résistance observées. La population biparentale, issue d'un croisement entre Goldrich, variété sensible aux criblures foliaires et Moniqui, révèle un facteur de résistance des feuilles, localisé sur l'extrémité terminale du chromosome 4, au niveau du marqueur ECU1775. Ces résultats sont cohérents avec des données préliminaires obtenues en 2012 ce qui traduit la robustesse de ce QTL. Nous préconisons donc de poursuivre l'étude de cette zone pour la préciser et l'utiliser en sélection assistée par marqueurs (SAM), d'autant plus qu'elle colocalise avec un facteur de résistance sur rameaux mis en évidence par notre étude d'association. Deux autres zones de colocalisation entre des facteurs de résistance sur rameaux et sur feuilles ont été positionnées sur les chromosomes 3 et 5 par cette dernière approche. Un lien entre la résistance sur feuilles et sur rameaux existe donc pour une partie des déterminants identifiés qui n'était à première vue pas évident dans les analyses en composante principale sur les variables brutes. Il porte une faible part de la variabilité des symptômes observés. En parallèle, l'analyse d'association nous a permis d'établir une liste de 40 SNPs considérées comme positionnées dans, ou à proximité de gènes candidats de résistance. L'étude du déséquilibre de liaison au sein du panel de 76 accessions démontre pour la première fois l'existence de valeurs faibles du r^2 à l'échelle du génome de l'abricotier, tendance validée sur deux régions de 1Mb. Ceci implique que les associations décrites sont d'une grande précision, et que ce type d'approche mérite d'être largement déployé dans l'étude des caractères d'intérêt chez l'abricotier. Une stratégie judicieuse de génotypage sera un élément clé du contrôle de la résistance au dépérissement bactérien, ainsi que des programmes d'innovation variétale de demain chez l'abricotier. Dans les populations biparentales, l'acquisition récente de SNPs permettra de cibler davantage le génotypage et une approche de Genotyping By Sequencing (GBS) pourrait aussi être envisagée. Toutefois, si l'abondance des données génomiques marque un tournant décisif dans la stratégie d'amélioration de l'abricotier et des *Prunus* en général, il faut garder à l'esprit que la puissance et les connaissances informatiques nécessaires à leur exploitation, ainsi qu'un phénotypage robuste et pluriannuel sont essentiels à la réussite d'une telle approche. Enfin, nos travaux éclairent les mécanismes biologiques sous-jacents aux réactions observées, en ouvrant notamment des opportunités de travail nouvelles en commun entre améliorateurs et pathologistes sur les déterminants génétiques et moléculaires d'une résistance durable.

Index bibliographique et sitographique

(Norme AFNOR Z 44005-2)

Bibliographie

- Arbonnier, P. (1966). L'analyse de l'information: aperçu théorique et application à la loi multinomiale. In : Annales des Sciences forestières, EDP Sciences, 23, pp. 949-1017
- Arumuganathan, K., Earle, E. D. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9(3), pp. 208-218. doi:10.1007/BF02672069
- Audergon, J. M., Monestiez, P., Habib, R. (1993). Spatial dependencies and sampling in a fruit-tree: a new concept for spatial prediction in fruit studies. *Journal of Horticultural Sciences*, 68(1), pp. 99-112. *Statistical Society, Series B (Methodological)*, pp. 289-300.
- Bachellez, A., Blanc, A., Corre, M., Croset, C., Ferréol, A., Lambert, P., Quilot, B. (2007). ISAFRUIT-Study of the genetic basis of *Prunus* fruit quality in two peach and two apricot populations. In: XII EUCARPIA Symposium on Fruit Breeding and Genetics 814, pp. 523-528.
- Bailey, L. H., Hough, L. F. (1975). Apricot. In: *Advances in fruit breeding*. Purdue University Press, pp. 367-386.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal of complex traits in diverse samples. Bioinformatics*, 23(19), pp. 2633-2635.
- Bordjiba, O., Prunier, J.-P. (1989). Establishment of an epiphytic phase by three species of *Pseudomonas* on apricot trees. In: IX International Symposium on Apricot Culture 293, pp. 487-494
- Bourguiba, H., Audergon, J.-M., Krichen, L., Trifi-Farah, N., Mamouni, A., Trabelsi, S., Khadari, B. (2012). Loss of genetic diversity as a signature of apricot domestication and diffusion into the Mediterranean Basin. *BMC Plant Biology*, 12(1), pp. 49. doi:10.1186/1471-2229-12-49
- Bradbury, P.-J., Zhang, Z., Kroon, D.-E., Casstevens, T.-M., Ramdoss, Y., Buckler, E.-W. (2007). TASSEL: software for association mapping
- Broman, K. W., Wu, H., Sen, S., Churchill, G. A. (2003). R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*, 19(7), pp. 889-890. doi:10.1093/bioinformatics/btg112
- Brun, Laurent, Warlop, F., Mercier, V., Broquaire, J.-M., Clauzel, G., Gomez, C., Audergon, J.-M. (2011). Quelle sélection fruitière pour une production durable, à faible niveau d'intrants? Méthodologie pour un réseau de sélection variétale décentralisée. *Innovations Agronomiques*, 15, pp. 105-115.
- Cameron, H. (1970). *Pseudomonas* content of cherry trees. *Phytopathology*, 60(9), pp. 1343-1346.
- Cao, T., Saylor, R. J., DeJong, T. M., Kirkpatrick, B. C., Bostock, R. M., Shackel, K. A. (1999). Influence of Stem Diameter, Water Content, and Freezing-Thawing on Bacterial Canker Development in Excised Stems of Dormant Stone Fruit. *Phytopathology*, 89(10), pp. 962-966. doi:10.1094/PHYTO.1999.89.10.962
- Carraut, A., Crossa-Raynaud, P. (1973). Caractéristiques de la culture et orientations des recherches sur l'abricotier en Tunisie. In: V and VI International Symposium on Apricot Culture and Decline 85, pp. 683-691.
- Chabrolin, M. (1922). Le dépérissement des abricotiers dans la Vallée du Rhône. *La vie agricole et rurale*, pp. 415-416.
- Crosse, J. (1953). Bacteriosis of apricot. In: Bacterial diseases of stone-fruit trees in Britain. *Transactions of the British Mycological Society*, 36(1), pp. 38.
- Crosse, J. E. (1966). Epidemiological relations of the *Pseudomonad* pathogens of deciduous fruit trees. *Annual Review of Phytopathology*, 4(1), pp. 291-310. doi:10.1146/annurev.py.04.090166.001451
- Crosse, J. E., Garrett, C. M. E. (1963). Studies on the bacteriophage of *Pseudomonas mors-prunorum*, *Ps. syringae* and related organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 26(2), pp. 159-177. doi:10.1111/j.1365-2672.1963.tb04764.x

- Dagnelie, P. (1989). The method of Papadakis in agricultural estimation: an overview. *Biuletyn Odceny Odmian*, 21, pp. 111-122.
- De Candolle, A. (1892). Origin of cultivated plants. Appleton ed., New York.
- Dirlewanger, E. (2004). Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(26), pp. 9891-9896. doi:10.1073/pnas.0307937101
- Donmez, M. F., Karlidag, H., Esitken, A. (2010). Identification of resistance to bacterial canker (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) disease on apricot genotypes grown in Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, 126(2), pp. 241-247. doi:10.1007/s10658-009-9536-x
- Dudley, J., Moll, R. (1969). Interpretation and use of estimates of heritability and genetic variances in plant breeding. *Crop Science*, 9(3), pp. 257-262.
- Dye, D. W., Bradbury, J. F., Goto, M., Hayward, A. C., Lelliott, R. A., Schroth, M. N. (1980). International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Review of Plant Pathology*, 59(4), pp. 153-168.
- Earl, D.-A. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), pp. 359-361.
- Edin, M., Audergon, J.-M., Lichou, J., Breniaux, D., Luneau, P., Minodier, R., Vigouroux, A. (2000). La bactériose de l'abricotier, CTIFL ed., Hortipratic, Issoudun, 40 p.
- Elshire, R.-J., Glaubitz, J.-C., Sun, Q., Poland, J.-A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE*, 6(5), e19379. doi:10.1371/journal.pone.0019379
- English, H., Davis, J. R., Lownsbery, B. F., De Vay, J. E. (1977). Bacterial canker, an important decline disease on apricot and other stone fruits in California. In: VI International Symposium on apricot culture and decline, 85, pp 235-242.
- Erikson, D. (1945). Certain aspects of resistance of plum trees to bacterial canker: Part II. On the nature of the bacterial invasion of *Prunus* sp. by *Pseudomonas mors-prunorum* Wormald. *Annals of Applied Biology*, 32(2), pp. 112-117. doi:10.1111/j.1744-7348.1945.tb06769.x
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), pp. 2611-2620. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Fisher, R. A. (1919). The Correlation between relatives on the supposition of mendelian inheritance. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, 52(2), pp. 399-433.
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9(1), pp. 275-296. doi:10.1146/annurev.py.09.090171.001423
- Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., Grimont, F., Grimont, P. A. D. (1999). DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Suty and Dowson 1959). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(2), pp. 469-478. doi:10.1099/00207713-49-2-469
- GIL, C. Etude de la variabilité génétique dans la caractère de résistance au chancre bactérien causé par *Pseudomonas syringae* chez l'abricotier. Avignon (France) : INRA GAFL, 2013 (en cours de rédaction).
- Gomez, E., Ledbetter, C. (1993). Transmission of biochemical flavor constituents from apricot and plum to their interspecific hybrid. *Plant Breeding*, 111(3), pp. 236-241. doi:10.1111/j.1439-0523.1993.tb00634.x
- Grattapaglia, D., Sederoff, R. (1994). Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*, 137(4), pp. 1121-1137.
- Green, S., Studholme, D. J., Laue, B. E., Dorati, F., Lovell, H., Arnold, D., Kamoun, S. (2010). Comparative genome analysis provides insights into the evolution and adaptation of *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* on *Aesculus hippocastanum*. *PLoS ONE*, 5(4), e10224. doi:10.1371/journal.pone.0010224
- Greenberg, J. T., Vinatzer, B. T. (2003). Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing

- their interaction with plant cells. *Current Opinion in Microbiology*, 6(1), pp. 20-28. doi:10.1016/S1369-5274(02)00004-8
- Hagen, L., Khadari, B., Lambert, P., Audergon, J.-M. (2002). Genetic diversity in apricot revealed by AFLP markers: species and cultivar comparisons. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(2-3), pp. 298-305. doi:10.1007/s00122-002-0910-8
- Halász, J., Hegedűs, A., Pedryc, A. (2005). Molecular background of self-incompatibility in apricot. *Acta Biologica Szegediensis*, 49(1-2), pp. 21-22.
- Haley, C. S., Knott, S. A. (1992). A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity*, 69(4), pp. 315-324.
- Hardy, O. L., Vekemans, X. (2002). SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular ecology notes*, 2(4), pp. 618-620.
- Hattingh, M. J., Roos, I. M., Mansvelt, E. L. (1989). Infection and systemic invasion of deciduous fruit trees by *Pseudomonas syringae* in South Africa. *Plant Disease*, 73(10), pp. 784-789.
- Hill, W. G., Robertson, A. (1968). Linkage disequilibrium in finite populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 38(6), pp. 226-231.
- Hillis, W. E., Swain, T. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica*. II.—The analysis of tissues of the Victoria plum tree. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10(2), pp. 135-144. doi:10.1002/jsfa.2740100211
- Hinrichs-Berger, J. (2004). Epidemiology of *Pseudomonas syringae* Pathovars associated with decline of plum trees in the Southwest of Germany. *Journal of Phytopathology*, 152(3), pp. 153-160. doi:10.1111/j.1439-0434.2004.00816.x
- Hirano, S. S., Upper, C. D. (1990). Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Annual Review of Phytopathology*, 28(1), pp. 155-177.
- Hirano, S. S., Upper, C. D. (1991). Bacterial community dynamics. In *Microbial ecology of leaves*. Springer ed., pp. 271-294).
- Hurtado, M., Romero, C., Vilanova, S., Abbott, A., Llácer, G., Badenes, M. (2002). Genetic linkage maps of two apricot cultivars (*Prunus armeniaca* L.), and mapping of PPV (sharka) resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(2-3), pp. 182-191. doi:10.1007/s00122-002-0936-y
- Iwashina, T. (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, 113(3), pp. 287-299.
- Jakobek, J. L., Smith, J. A., Lindgren, P. B. (1993). Suppression of bean defense responses by *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell Online*, 5(1), pp. 57-63.
- Jones, J. D. G., Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), pp. 323-329. doi:10.1038/nature05286
- Kaluzna, M., Ferrante, P., Sobiczewski, P., Scortichini, M. (2010). Characterization and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* from stone fruits and hazelnut using repetitive-PCR and MLST. *Journal of Plant Pathology*, 92(3), pp. 781-787.
- Kennelly, M. M., Cazorla, F. M., de Vicente, A., Ramos, C., Sundin, G. W. (2007). *Pseudomonas syringae* diseases of fruit trees: progress toward understanding and control. *Plant disease*, 91(1), pp. 4-17.
- Klement, Z., Rozsnyay, D., Balo, E., Panczel, M., Prileszky, G. (1984). The effect of cold on development of bacterial canker in apricot trees infected with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Physiological plant pathology*, 24(2), pp. 237-246.
- Kole, C., Abbott, A. G. (2012). Genetics, genomics and breeding of stone fruits. CRC Press.
- Kosambi, D. D. (1944). The estimation of map distance from recombination values - Recherche Google. *Ann. Eugen.*, 12, pp. 172-175.
- Kostina, K. F. (1969). The use of varietal resources of apricots for breeding. *Trud. Nikit. Bot. Sad.*, 40, pp. 45-63.
- Lambert, P., Dicenta, F., Rubio, M., Audergon, J. M. (2006). QTL analysis of resistance to sharka disease in the apricot (*Prunus armeniaca* L.) 'Polonais' × 'Stark Early Orange' F1 progeny. *Tree Genetics Genomes*, 3(4), pp. 299-309. doi:10.1007/s11295-006-0069-6
- LASNIER Adrien (2013) Analyse de la diversité génétique chez l'abricotier (*Prunus armeniaca* L.) à l'aide de marqueurs microsatellites, INRA UR GAFL.
- Latif, S. H. (1994). Taxonomy of phytopathogenic *Pseudomonads* of group *Pseudomonas syringae*:

phenotypic and genotypic study. Doctorat Sciences Agronomiques, Angers, 82 p.

Lê, S., Josse, J., & Husson, F. (2008). FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *Journal of statistical software*, 25(1), pp. 1-18.

Lecouls, A. C., Bergougnoux, V., Rubio-Cabetas, M.-J., Bosselut, N., Voisin, R., Poessel, J.-L., Esmenjaud, D. (2004). Marker-assisted selection for the wide-spectrum resistance to root-knot nematodes conferred by the Ma gene from Myrobalan plum (*Prunus cerasifera*) in interspecific *Prunus* material. *Molecular Breeding*, 13(2), pp.113-124.

doi:10.1023/B:MOLB.0000018758.56413.cf

Liang, L., Sobiczewski, P., Paterson, J., Jones, A. (1994). Variation in virulence, plasmid content, and genes for coronatine synthesis between *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* and *P. s. syringae* from *Prunus*. *Plant disease*, 78(4), pp. 389-392.

Lichou, J., Jay, M. (2012). Abricot. Monographie ed., CTIFL, Paris, 567p., ISBN 13 : 9782879113111

Lindgren, P. B. (1997). The role of hrp genes during plant-bacterial interactions. *Annual review of phytopathology*, 35(1), pp. 129-152.

Loreti, S., Sarrocco, S., Gallelli, A. (2001). Identification of hrp genes, encoding harpin protein. *Pseudomonas avellanae*, *Journal of Phytopathology*, 149(3-4), pp. 219-226, doi:10.1046/j.1439-0434.2001.00606.x.

Luisetti, J. (1983). Quelques aspects de la variabilité de *Pseudomonas persicae*, agent du dépérissement bactérien du pêcher. In: Colloque sur les Recherches Fruitières. Bordeaux (France).

Luna, A., Nicodemus, K. K. (2007). snp. plotter: an R-based SNP/haplotype association and linkage disequilibrium plotting package. *Bioinformatics*, 23(6), pp. 774-776.

Michelmore, R., Paran, I., Kesseli, R. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(21), pp. 9828-9832.

Misas-Villamil, J. C., Kolodziejek, I., Crabill, E., Kaschani, F., Niessen, S., Shindo, T., ... van der Hoorn, R. A. (2013). *Pseudomonas syringae* pv.

syringae Uses proteasome inhibitor Syringolin A to colonize from wound infection sites. *PLoS pathogens*, 9(3), e1003281.

Monestiez, P., Habib, R., Audergon, J. M. (1988). Estimation de la covariance et du variogramme pour une fonction aléatoire à support arborescent. Etude géostatistique de variables ayant pour support spatial un arbre fruitier. *Geostatistics*, In: Congrès international de géostatistiques Avignon., pp. 39-56.

Monteil, C. L., Guilbaud, C., Glaux, C., Lafolie, F., Soubeyrand, S., Morris, C. E. (2012). Emigration of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from leaf litter contributes to its population dynamics in alpine snowpack. *Environmental Microbiology*, 14(8), pp. 2099-2112. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02680.x

Morris, C. E., Kinkel, L. L., Xiao, K., Prior, P., Sands, D. C. (2007). Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Infection, Genetics and Evolution*, 7(1), pp. 84-92. doi:10.1016/j.meegid.2006.05.002

Morris, C. E., Sands, D. C., Vanneste, J. L., Montarry, J., Oakley, B., Guilbaud, C., Glaux, C. (2010). Inferring the Evolutionary History of the Plant Pathogen *Pseudomonas syringae* from Its Biogeography in Headwaters of Rivers in North America, Europe, and New Zealand. *mBio*, 1(3), e00107-10-e00107-20. doi:10.1128/mBio.00107-10

Morris, C. E., Sands, D. C., Vinatzer, B. A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffiere, A., Thompson, B. M. (2008). The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *The ISME Journal*, 2(3), pp. 321-334.

Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt III, B. F., Dangl, J. L. (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics*, 37(1), pp. 579-609. doi:10.1146/annurev.genet.37.110801.142628

Oh, H.-S., Park, D. H., Collmer, A. (2010). Components of the *Pseudomonas syringae* Type III secretion system can suppress and may elicit plant innate immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(6), pp. 727-739. doi:10.1094/MPMI-23-6-0727

Olukolu, B. A. (2010). The genetics of chilling requirement in apricot (*Prunus armeniaca* L.). PhD at the Graduate School of Clemson University, 223p.

- Pinar, H., Bircan, M., Unlu, M., Kaymak, S., Uzun, A., Yilmaz, K. U. (2013). Screening some Turkish and foreign apricot cultivars for self-compatibility. *Acta horticulturae (ISHS)*, 981, pp. 185-190.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), pp. 945-959.
- Prunier, J. P., Cotta, J. (1987). Le dépérissement bactérien (*Pseudomonas* spp.) de l'abricotier: situation en France. *EPPO Bulletin*, 17(2), pp. 251-256. doi:10.1111/j.1365-2338.1987.tb00035.x
- Prunier, J.-P., Jullian, J.-P., Minodier, R., Clauzel, G., Martins, J. (2005). Chancre bactérien sur l'abricotier - Eviter les dégâts par la mise en oeuvre de pratiques simples et raisonnées. *Arborperformance*, 595, pp. 23-30.
- Prunier, J.-P., Audergon, J. M., Cotta, J. (1991). Etude de la sensibilité variétale de l'abricotier au chancre bactérien. In Agriculture. Programme de Recherche AGRIMED. Deuxièmes Rencontres sur l'abricotier., Avignon (France), p. 111-112.
- Prunier, J.-P., Bordjiba, O. (1989). Effect of frost on bacterial necrosis of apricot buds. In: IX International Symposium on Apricot Culture 293, pp. 495-502.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., Daly, M. J. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American Journal of Human Genetics*, 81(3), pp. 559-575.
- Rehder, A. (1949). Bibliography of cultivated trees and shrubs hardy in the cooler temperate regions, of the northern hemisphere Jamaica Plain: Harvard ed., 10.
- Ritland, K. (1996). Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetical Research*, 67(2), pp. 175-186.
- Rodríguez-Palenzuela, P., Matas, I. M., Murillo, J., López-Solanilla, E., Bardaji, L., Pérez-Martínez, I., Ramos, C. (2010). Annotation and overview of the *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 draft genome reveals the virulence gene complement of a tumour-inducing pathogen of woody hosts. *Environmental Microbiology*. 12(6), pp. 1604-1620. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02207.x
- Roos, I. M. M., Hattingh, M. J. (1983). Scanning electron microscopy of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* on sweet sherry leaves. *Journal of Phytopathology*, 108(1), pp. 18-25. doi:10.1111/j.1439-0434.1983.tb00559.x
- Ruiz, D., Egea, J., Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A. (2005). Characterization and quantitation of phenolic compounds in new apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), pp. 9544-9552. doi:10.1021/jf051539p
- Scortichini, M. (2010). Epidemiology and predisposing factors of some major bacterial diseases of stone and nut fruit trees species. *Journal of Plant Pathology*, 92(1sup), pp. 1-73.
- Scortichini, M., Marchesi, U., Dettori, M., Rossi, M. (2003). Genetic diversity, presence of the *syrB* gene, host preference and virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains from woody and herbaceous host plants. *Plant Pathology*, 52(3), pp. 277-286.
- Shanmuganathan, N. (1962). Studies in bacterial canker of plum and cherry (*Pseudomonas Morsprunorum* Wormald). Doctoral thesis, London.
- Shen, R., Fan, J.-B., Campbell, D., Chang, W., Chen, J., Doucet, D., McBride, C. (2005). High-throughput SNP genotyping on universal bead arrays. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 573(1), pp. 70-82.
- Sinden, S. (1971). Properties of syringomycin, a wide spectrum antibiotic and phytotoxin produced by *Pseudomonas syringae*, and its role in the bacterial canker disease of peach trees. *Physiological Plant Pathology*, 1(2), pp. 199-213. doi:10.1016/0048-4059(71)90029-4
- Sochor, J., Zitka, O., Skutkova, H., Pavlik, D., Babula, P., Krska, B., Kizek, R. (2010). Content of phenolic compounds and antioxidant capacity in fruits of apricot genotypes. *Molecules*, 15(9), pp. 6285-6305. doi:10.3390/molecules15096285
- Socquet-Juglard, D., Duffy, B., Pothier, J. F., Christen, D., Gessler, C., Patocchi, A. (2012). Identification of a major QTL for *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* resistance in apricot. *Tree Genetics Genomes*, 9(2), pp. 409-421. doi:10.1007/s11295-012-0562-z

- Struss, D., Ahmad, R., Southwick, S. M., Boritzki, M. (2003). Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using SSR and AFLP markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(6), pp. 904-909.
- Szabo, Z., Nyéki. (1991). Blossoming, fructification and combination of apricot varieties. *Acta horticulturae (ISHS)*, 293, pp. 295-302.
- Testolin, R. (2002). Marker-assisted selection in stone fruits. In: XXVI International Horticultural Congress: Genetics and Breeding of Tree Fruits and Nuts 622, pp. 163-176.
- Thomidis, T., Exadaktylou, E. (2008). Susceptibility of 30 cherry (*Prunus avium*) genotypes to the bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 36(3), pp. 215-220. doi:10.1080/01140670809510237
- Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 4(3), pp. 147-157. doi:10.1007/s10311-006-0068-8
- Uma, B., Swaroopa Rani, T., Podile, A. R. (2011). Warriors at the gate that never sleep: Non-host resistance in plants. *Journal of Plant Physiology*, 168(18), pp. 2141-2152. doi:10.1016/j.jplph.2011.09.005
- Van Hall, C. J. J. (1902). Bijdragen tot de kennis der Bakterieele Plantenziekten. In: Inaugural Dissertation Amsterdam, pp. 198.
- Van Ooijen, J. W. (2006). JoinMap ® 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands.
- Van Valen, L. (1977). The red queen. *The American Naturalist*, 111(980), pp. 809-810.
- Vavilov, N. I. (1951). The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. *Soil Science*, 72(6), p. 482.
- Verde, I., Abbott, A. G., Scalabrin, S., Jung, S., Shu, S., Marroni, F., Cattonaro, F. (2013). The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. *Nature Genetics*, 45(5), pp. 487-494. doi:10.1038/ng.2586
- Vigouroux, A. (1999). Bacterial canker of peach: effect of tree winter water content on the spread of infection through frost-related water soaking in stems. *Journal of Phytopathology*, 147(9), pp. 553-559. doi:10.1046/j.1439-0434.1999.00427.x
- Vilanova, S., Romero, C., Abbott, A. G., Llácer, G., Badenes, M. L. (2003). An apricot (*Prunus armeniaca* L.) F2 progeny linkage map based on SSR and AFLP markers, mapping plum pox virus resistance and self-incompatibility traits. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(2), pp. 239-247. doi:10.1007/s00122-003-1243-y
- Yilmaz, U. K., Gurcan, K. (2012). Genetic diversity in apricot. In: Genetic diversity in plants (InTech., p. 498).
- Young, J. M. (1987). New plant disease record in New Zealand: *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* from nectarine, peach, and Japanese plum. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 30(2), pp. 235-247. doi:10.1080/00288233.1987.10430502
- Young, J. M. (2010). Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology*, 92(1sup), S1-5.
- Young, J. M., Dye, D. W., Bradbury, J. F., Panagopoulos, C. G., Robbs, C. F. (1978). A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 21(1), pp. 153-177. doi:10.1080/00288233.1978.10427397
- Zhang, Q., Chen, W., Sun, L., Zhao, F., Huang, B., Yang, W., Wang, J. (2012). The genome of *Prunus mume*. *Nature communications*, 3, p.1318, doi:10.1038/ncomms2290
- Zhebentyayeva, T., Ledbetter, C., Burgos, L., Llácer, G. (2012). Apricot. In Fruit Breeding, Springer US ed., pp. 415-458.

Sitographie

Bioportal Oslo University (2004). Bioportal. <http://www.bioportal.uio.no/> (consulté en août 2013)

FAOSTAT (2012) <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (consulté en mars et avril 2012)

FranceAgriMer (2011) <http://www.franceagrimer.fr/filiere-fruit-et-legumes> (consulté en mars et avril 2012)

Getting genetics done, Turner, S. (2011). R code for making manhattan plots and QQ plots from plink output files. www.gettinggeneticsdone.blogspot.fr (consulté en août 2013).

GDR (2013) Genomic, Genetic, and Breeding Resources for Rosaceae Crop Improvement (consulté en juillet et août 2013).

ANNEXES

ANNEXE I : Nature des différentes portes d'entrée à <i>P. syringae</i> chez les Prunus d'intérêt agronomique.....	33
ANNEXE II : Facteurs pédo-climatiques influençant le développement de symptômes de dépérissement bactérien chez l'abricotier et les autres <i>Prunus</i> et solutions prophylactiques proposées	34
ANNEXE III : Note synthétique de sensibilité précoce intégrant le pourcentage d'arbres et le nombre de charpentiers morts de dépérissement bactérien de 16 variétés entre 2009 et 2011 sur le site de Gotheron (26) en conditions de climat et de contamination naturels.	35
ANNEXE IV : Mesures de chancre moyennes par génotype (en centimètres), obtenues par Prunier en 1996 et 1997 après inoculation de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (souche 41A) par la méthode Prunier sur différents cultivars d'abricotier en verger	36
ANNEXE V : Liste des 76 accessions du panel re-séquéncé dans le cadre du projet ABRIWG donnant leur nom de variété, leur identifiant dans la base de données de l'INRA GAFL (« A » pour abricot), ainsi que leur pays d'origine.	37
ANNEXE VI : Protocole d'isolement de <i>P. syringae</i> dans les colonies isolées sur rameaux et feuilles d'abricotier inoculées par la souche 41A (<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>).	38
ANNEXE VII : Visualisation des quatre mesures effectuées sur rameaux après inoculation tissulaire des <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (souche 41A), méthode Prunier.....	39
ANNEXE VIII : Repères visuels permettant la notation des symptômes de criblures sur feuilles d'abricotier trois semaines après inoculation de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (souche 41A) sur des blessures réalisées par perforation à l'aide d'une brosse métallique.....	40
ANNEXE IX : Cartographie de type « père-mère » de la population Goldrich × Moniqui (187 individus), réalisée à l'aide de 93 marqueurs SSR dans Map Maker (fonction Kosambi).....	41
ANNEXE X : Cartographie de type « père-mère » de la population Bergeron x Bakour obtenue à l'aide de marqueurs SSRs parmi 89 individus.	42
ANNEXE XI : Arbre phylogénétique obtenu sur 78 accessions de la collection d'abricotier re-séquéncées à l'aide de 2114 marqueurs SNPs en calculant les distances génétiques par paire d'individu (Neighbor Joining).	43
ANNEXE XII : Synthèse des marqueurs SNPs en association (40SNP, 44 associations) avec six variables mesurant les symptômes sur feuilles et rameaux de 76 accessions d'abricotier après inoculation de <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> (souche 41A).....	44
ANNEXE XIII : Portions du génome portant plusieurs associations proches pour le caractère de résistance de l'abricotier à l'inoculation tissulaire de <i>P. syringae</i> sur rameaux et feuilles.	45
ANNEXE XIV : Décroissance du déséquilibre de liaison (DL) sur l'ensemble des chromosomes d'un panel de 76 accessions d'abricotier, calculé à l'aide de 7939 marqueurs SNPs.....	46

ANNEXE I : Nature des différentes portes d'entrée à *P. syringae* chez les Prunus d'intérêt agronomique. Auteur : M. ROTH

<i>Espèce</i>	<i>Porte d'entrée</i>	<i>Oui</i>	<i>Non</i>	<i>Source</i>
Abricotier	Bourgeons	X	X	Crosse, 1953; Wimalajeewa, 1987, Prunier et Bordjiba, 1989
	Plaies pétiolaires		X	Crosse, 1953
	Fruit		X	
Pêcher	Rameaux (dégât de gel)	X		Weaver, 1978
	Plaies pétiolaires	X		Cao et al., 2013; Vigouroux and Charras, 1988
Cerisier	Plaies pétiolaires	X		Crosse, 1951, Cao et al. 2013
	Fleurs		X	Wimalajeewa 1987
	Feuilles		X	Wimalajeewa 1987
	Lenticelles	X		Cao et al. 2013
	Fruit		X	Wimalajeewa 1987
Prunier	Plaies pétiolaires	X		Cao et al. 2013
	Fleurs		X	Hinrich Berger, 2004
	Blessures	X		Hinrich Berger, 2004
	Lenticelles	X		Cao et al. 2013

Références bibliographiques :

- BORDJIBA, O et PRUNIER, J-P, (1989). Establishment of an epiphytic phase by three species of *Pseudomonas* on apricot trees. In : IX International Symposium on Apricot Culture 293. 1989. pp. 487-494. ISBN 9066054646.
- CAO, Tiesen, KIRKPATRICK, Bruce C., SHACKEL, Kenneth A. et DEJONG, Theodore M., (2013). Effect of leaf scar age, chilling and freezing-thawing on infection of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* through leaf scars and lenticels in stone fruits. *Fruits*, 68(2)2, pp. 159-169. doi 10.1051/fruits/2013060.
- CROSSE, J. E., (1951). The Leaf Scar as an Avenue of Infection for the Cherry Bacterial Canker Organism, *Pseudomonas mors-prunorum* Wormald. *Nature*. 168(4274), pp. 560-561. doi 10.1038/168560b0.
- CROSSE, JE, 1953. Bacterial diseases of stone-fruit trees in Britain: IX. Bacteriosis of apricot. *Transactions of the British Mycological Society*. 36(1), pp. 38-IN2.
- HINRICHS-BERGER, J., (2004). Epidemiology of *Pseudomonas syringae* Pathovars Associated with Decline of Plum Trees in the Southwest of Germany. *Journal of Phytopathology*. 152(3), pp. 153-160. DOI 10.1111/j.1439-0434.2004.00816.x.
- VIGOUROUX, A et CHARRAS, J, 1988. Interest of anticipated chemical defoliation for the control of peach bacterial dieback caused by *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*. In : 7. Colloque sur les Recherches Fruitières, Bordeaux (France), 2-3 Dec 1987. CTIFL. 1988.
- WEAVER, DJ, (1978). Interaction of *Pseudomonas syringae* and freezing in bacterial canker on excised peach twigs. *Phytopathology*. 68(10), pp. 1460.
- WIMALAJEEWA, Dls, (1987). Seasonal variation in susceptibility of apricot to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (bacterial canker), and site of infection in apricot and cherry. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 27(3), pp. 475. doi 10.1071/EA9870475.

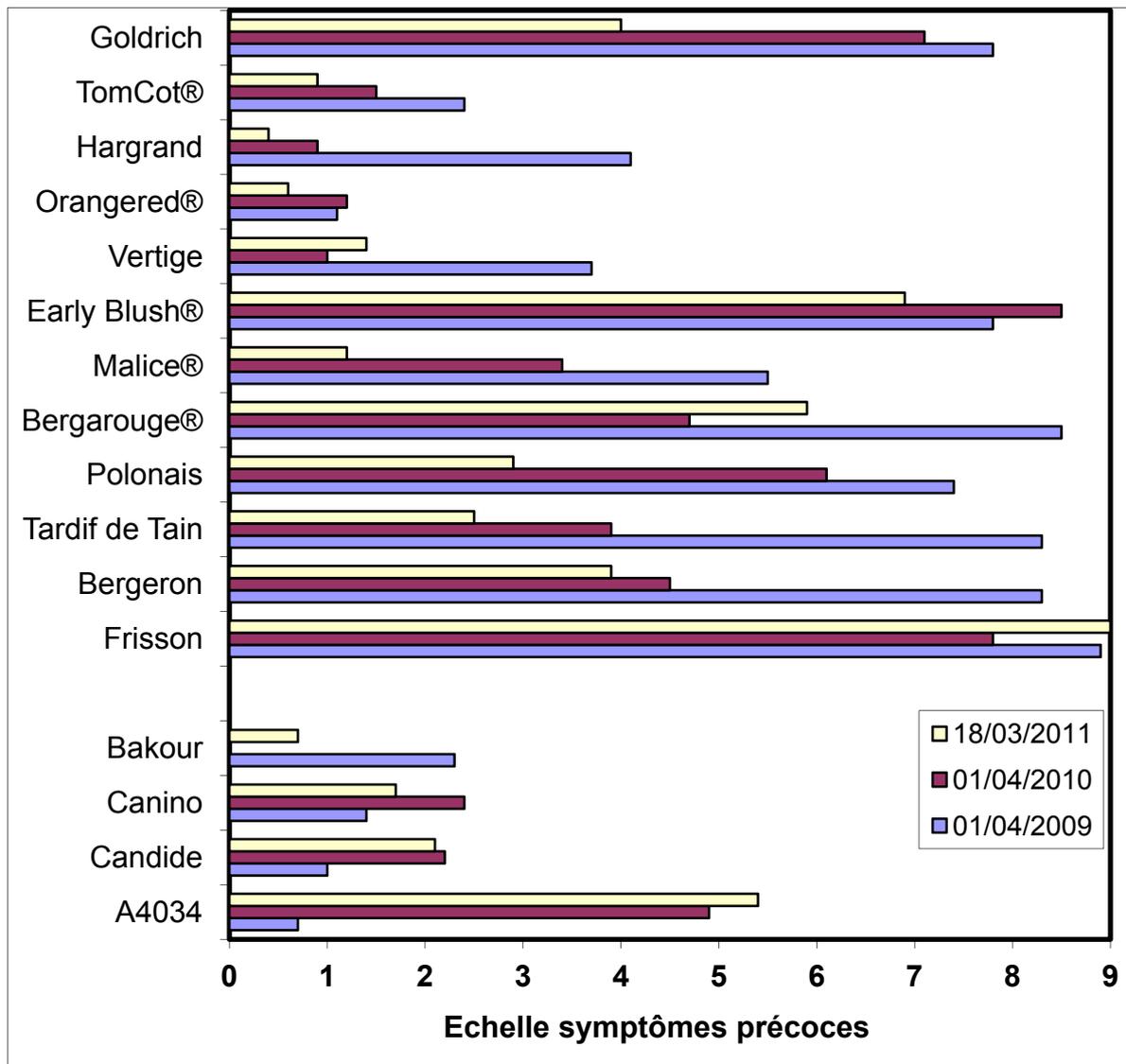
ANNEXE II : Facteurs pédo-climatiques influençant le développement de symptômes de dépérissement bactérien chez l'abricotier et les autres *Prunus* et solutions prophylactiques proposées. Auteur : M. ROTH

<i>Facteurs influençant la maladie</i>	<i>Favorisant</i>	<i>Limitant</i>	<i>Sources</i>
Type de sol	Arène granitique, sol squelettique, légers et sableux	Terres lourdes	CTIFL, 1998
Texture	Sols caillouteux à texture grossière	Limoneux, Argilo-calcaire	English et al., 1977, Vigouroux et al., 1997, CTIFL 1998
Profondeur	Peu profond ou semelle de labour		English et al., 1961 sur pêcher et prunier
pH	Acide		Weaver et Wehnut, 1975 sur pêcher, CTIFL 1998
Minéraux		Calcium ?	Gaignard and Luisetti, 1993; Vigouroux and Bussi, 1995 -CTIFL 1998, dementi Cao et al., 2006 pour le pêcher
Etat hydrique	Excès		CTIFL 1998
Altitude	au-delà de 400m		CA Ardèche enquête 1997
Précédent cultural	Vigne	Annuelle	CTIFL 1998
Couvert	Présence	Absence	CTIFL 1998
Composante technique	Attitude à adopter		Sources
Lutte chimique	Badigeon (mélange de peinture acrylique et de bouillie bordelaise) appliqué sur le tronc		essai SEFRA, CTIFL, 2009
Fertilisation	Equilibrée, sans excès		Sayler et al., 2002, Cao et al., 2006, 2011
Taille	Précoce et suivie d'une protection antibactérienne		Sobiczewski et Jones, 1992
Gestion des ravageurs	Cas du pêcher, lutter contre les nématodes		English et al., 1977, Lownsbey et al., 1977, Cao et al., 2006
Type de porte-greffe	Eviter les types abricotier et prunier, choix de porte-greffe moins sensibles comme Rubira ®		Day 1947, recommandations du CTIFL 2000
Greffage	Privilégier un greffage haut >1m		Sayler et al., 2002, recommandations du CTIFL 2000
Ebourgeonnage à la base des charpentières	Permet de limiter la pénétration dans les zones à risque		recommandations du CTIFL 2000

Références bibliographiques :

- CAO, T., KIRKPATRICK, B. C., SHACKEL, K.A. DEJONG, T. M., (2011). Influence of mineral nutrients and freezing-thawing on peach susceptibility to bacterial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Fruits* 66(6), pp. 441-452. doi 10.1051/fruits/2011057.
- CAO, T., MCKENRY, M.V., DUNCAN, R.A., DEJONG, T.M., KIRKPATRICK, B.C. SHACKEL, K.A., (2006). Influence of Ring Nematode Infestation and Calcium, Nitrogen, and Indoleacetic Acid Applications on Peach Susceptibility to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Phytopathology*. 96(6), pp. 608-615. doi 10.1094/PHYTO-96-0608.
- DAY, L. H., (1947). The influence of rootstock on the occurrence and severity of bacterial canker. *American Society of Horticultural Sciences*. 50, pp. 100:102.
- ENGLISH, H., DAVIS, J.R., LOWNSBERY, B.F, DE VAY, J.E., (1977). Bacterial canker, an important decline disease on apricot and other stone fruits in California. In: VI International Symposium on apricot culture and decline, 85, pp. 235-242.
- LOWNSBERY, B.F., ENGLISH, H., NOEL, G.R., SCICK, F.J., (1977). Influence of Nemaguard and Lovell Rootstocks and *Macroposthonia xenoplax* on bacterial canker of peach. *The Journal of Nematology*. 9(3), pp. 221-224.
- SAYLER, R. J., SOUTHWICK, S. M., YEAGER, J. T., GLOZER, K., LITTLE, E. L., KIRKPATRICK, B. C., (2002). Effects of Rootstock and Budding Height on Bacterial Canker in French Prune. *Plant Disease*. 86(5), pp. 543-546. doi 10.1094/PDIS.2002.86.5.543.
- SOBICZEWSKI, P et JONES, AL, 1992. Effect of exposure to freezing temperatures on necrosis in sweet cherry shoots inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* or *Ps morsprunorum*. *Plant disease*. 76(5), pp. 447-451.

ANNEXE III : Note synthétique de sensibilité précoce intégrant le pourcentage d'arbres et le nombre de charpentières morts de dépérissement bactérien de 16 variétés entre 2009 et 2011 sur le site de Gotheron (26) en conditions de climat et de contamination naturels. On notera les valeurs observées pour Bakour et Bergeron. Auteur : L. BRUN



ANNEXE IV : Mesures de chancre moyennes par génotype (en centimètres), obtenues par Prunier en 1996 et 1997 après inoculation de *P. syringae* pv. *syringae* (souche 41A) par la méthode Prunier (Prunier, Audergon 1993; Prunier, Audergon, Cotta 1991) sur différents cultivars d'abricotier en verger (10 rameaux par génotype, 3 blocs). Les inoculations ont eu lieu sur deux sites, Banettes (84) - deux notations successives - et Mévouillon (26). Classement des individus par la méthode de HSD après un test ANOVA (code couleur donné à titre indicatif). La valeur de HSD correspond à la « Honestly Significant Difference » permettant de discriminer les groupes d'individus. Les groupes d'individus sont différenciés par des lettres. Le classement des génotypes communs aux deux sites n'est pas le même dans les deux essais (validé par le test sur les rangs de Wilcoxon). Les deux références pour Bergeron correspondent à deux arbres distincts. Auteur : M. ROTH

Banettes						Mévouillon		
06/03/1996			14/11/1996			03/11/1997		
Variété	Moy1	Groupe	Variété	Moy2	Groupe	Variété	Moyenne	Groupe
P.dasycarpa	6,7	k	P.dasycarpa	7,133	k	Bakour	9,828	n
Lambertin°1	11,93	jk	Lambertin°1	12,83	jk	P. dasycarpa	12,57	m
Rassosansky4	12,93	jk	RougedeRoussillon	16,93	ijk	Screara	20,71	l
HâtifColomer	14,53	ijk	Broskova	18,33	hijk	Jaubert Foulon	29,34	k
RougedeRoussillon	15,21	hijk	Screara	18,88	hijk	Hâtif Colomer	31,52	j
JaubertFoulon	16,37	ghij	Canino	19,1	hijk	Moniqui	31,93	i
Screara	16,63	fghij	Rassosansky21	20,33	ghijk	Palsteyn	33,27	h
Broskova	17,47	fghij	Rassosansky4	21,53	fghij	Poizat	35,17	g
PrécoceduPortugal	17,5	fghij	HâtifColomer	21,6	fghij	Precoce de Portugal	37,2	f
Canino	17,7	fghij	JaubertFoulon	22,77	efghij	Rouge du Roussillon	40,53	e
Houcall	17,7	fghij	804x669-105	25,87	defghij	Houcall	42,27	d
Luizet	18,5	fghij	804x669-255	26,9	defghi	Polonais	45	c
Rassosansky21	18,63	efghij	PrécoceduPortugal	27	cdefghi	Muscat	46,92	b
804x669-255	19,43	efghij	BebecoL	27,17	cdefghi	Rouge de Fournes	47,31	b
Pseudo-royal	22,73	defghi	Sweet	28,23	cdefghi	Broskova	50	a
Sweetkernelkernel	23,9	defgh	Poizat	28,77	cdefghi	Luizet	50	a
BebecoLZ	23,93	defgh	Luizet	29,33	cdefghi	Rassosansky 21	50	a
804x669-105	24,17	defgh	Muscat	29,33	cdefghi	Rassosansky 4	50	a
Palsteyn	24,97	defg	Palsteyn	29,73	cdefghi	ANOVA effet génotype p-value=2e-16		HSD 9,03
Bergeron30	25	defg	Pseudo-royal	31,47	bedefgh			
Bergeron	25,63	defg	Bergeron30	33,47	bedefg			
Muscat	25,7	defg	Bergeron	33,63	bedefg			
Poizat	25,83	def	RougedeFournes	34,3	bcdef			
Moniqui	27,97	cde	Moniqui	35,6	bcde			
RougedeFournes	31,07	cd	Flamingold	37,13	bed			
Flamingold	32,07	bcd	Moniquitardif	40,63	bc			
Moniquitardif	37,1	bc	Houcall	40,7	bc			
Caninox morleuch-E22	40,47	b	Caninoxmorleuch-E22	44,87	b			
MeiHwang	55,97	a	MeiHwang	59,8	a			
HSD	9,38				13,7			
ANOVA : effet génotype p-value=2e-16								

Références bibliographiques:

PRUNIER, J-P, AUDERGON, J. M. et COTTA, J., 1991. Etude de la sensibilité variétale de l'abricotier au chancre bactérien. In AGRICULTURE. Programme de Recherche AGRIMED. Deuxièmes Rencontres sur l'Abricotier. J.M. AUDERGON, EUR 15009 Fr. Avignon (France), 1991. pp. 111-112.

PRUNIER, J-P et AUDERGON, J. M., 1993. Bacterial canker: varietal susceptibility of apricot (abstract of poster p. 122). In Xth International Symposium on Apricot Culture. Izmir (Turkey). 1993. Vol. 1, pp. 20-24.

ANNEXE V : Liste des 76 accessions du panel re-séquéncé dans le cadre du projet ABRIWG donnant leur nom de variété, leur identifiant dans la base de données de l'INRA GAFL (« A » pour abricot), ainsi que leur pays d'origine.

Auteur : M. ROTH

Variété	Code accession	Pays d'origine	Variété	Code accession	Pays d'origine
Ajoc	A3408	France	Morden 604	A0682	Canada
Alfred	A2662	USA	Murciana	A4374	Espagne
Anderheart	A2205	USA	Nikitski	A1693	Russie
Arrogante	A1314	Espagne	NJA82	A4079	USA
Augusta3	A4316	Italie	Olimp	A2343	Roumanie
Avikaline	A1711	France	Orangered Standard	A2894	USA
Badami	A1267	Iran	Palsteyn	A1956	Afrique du Sud
Bakour	A2137	Tunisie	Pavlot	A0654	France
Bebeco	A2204	Grèce	Pêche de Nancy	A0076	France
Bergeron	A0660	France	Perfection	A1453	USA
Boucherand	A2734	France	Poizat	A0539	France
Bulida	A2922	Espagne	Précoce d'Ampuis	A0039	France
Cafona	A0544	Italie	Précoce de Tyrinthe	A1809	Grèce
CaidAgdz1	A2069	Maroc	Priana	A1729	Tunisie
Canino	A1343	Espagne	Priboto	A4322	France
Colomer	A0008	France	Pseudo Royal	A0862	USA
Dwarf Darnaud	A2853	USA	Robada	A3862	USA
Early Blush	A2928	USA	Rouge de Fournes	A2129	France
Erevani	A2348	Iran	Rouge du Roussillon	A0157	France
Fantasme	A1939	France	San Castrese	A1915	Italie
Goldrich	A2218	USA	Saturn	A2340	Roumanie
Harcot	A1811	Canada	Screara	A0804	France
Hargrand	A1814	Canada	Semis Indukuch	A3075	Afghanistan
Henderson	A0634	USA	Silistra x Ananas	A0892	Roumanie
Lambert N°1	A2311	USA	Stark Early Orange	A1145	USA
Larclyd	A4222	Nouvelle-Zélande	Stella	A2382	USA
Laycot	A1813	Canada	Sucre de Holub	A0010	Hongrie
Luizet	A0665	France	Sunglo	A2217	Canada
Madarska Najlepsia	A0882	Slovaquie	Super Rouge	A1710	France
Mallissard	A4294	France	Tardif de Bordaneil	A1793	France
Mamaia	A2335	Roumanie	Timpurii de Kisinou	A2346	Roumanie
Manicot	A1236	France	Tardif de Tain	A2490	France
Marouch 14	A2067	Maroc	Veecot	A2156	Canada
Marouch 4	A2065	Maroc	Vestar	A3698	Slovaquie
Mei Hwang	A0300	Chine	Vivagold	A2219	Canada
MonacoBello	A2330	Italie	4034L	A4034	France
Moniqui	A0500	Espagne	A3521	A3521	Iran
Moorpark	A2635	USA	A4373	A4373	Italie

ANNEXE VI : Protocole d'isolement de *P. syringae* dans les colonies isolées sur rameaux et feuilles d'abricotier inoculées par la souche 41A (*P. syringae* pv. *syringae*). Auteur : M. ROTH

1. **Isolement des bactéries sur rameaux** : prélèvement d'une languette de bois, dans l'entaille réalisée lors de l'inoculation et de part et d'autre de cette blessure dans deux boîtes séparées. Immersion dans 500µL d'eau distillée et agitation répétée trois fois (vortex).
Isolement des bactéries sur feuilles : lavement au stomacher de deux feuilles par échantillon pendant 1'30'' minutes à 200 tour par minute. Dilution au dixième de la solution obtenue.
2. **Ensemencement** : un volume de 100µL de la solution obtenue pour chaque échantillon a été ensemencé à l'aide de billes d'ensemencement sur un milieu semi-sélectif KBC (King, Ward, Raney 1954; Mohan, Schaad 1987) et placé dans une étuve à 25°C pendant deux à quatre jours selon la croissance observée.
3. **Repiquage** : les colonies ont été repiquées sur milieu KB (King, Ward, Raney 1954), à raison de 1 à 10 colonies par boîte selon leur croissance et leur densité.
4. **Tests d'identification** : après 24 à 48h dans l'étuve (25°C), le test à l'oxydase a été réalisé et la fluorescence des colonies reportée visuellement à l'aide d'une lampe UV.

Références :

King, E.O., M.K. Ward, et D.E. Raney (1954). Two Simple Media for the Demonstrating of Phycocyanin and Fluorescein. J. Lab. Clin. Med. 44, pp: 301–307.

Mohan, SK, et NW Schaad (1987). An Improved Agar Plating Assay for Detecting *Pseudomonas Syringae* Pv. *Syringae* and *P. S. Pv. Phaseolicola* in Contaminated Bean Seed. Phytopathology 77(10), pp: 1390–1395.

ANNEXE VII : Visualisation des quatre mesures effectuées sur rameaux après inoculation tissulaire des *P. syringae* pv. *syringae* (souche 41A), méthode Prunier. Auteur : M. ROTH

A. Détail des variables observées sur les rameaux dans l'ordre dans lequel les notations ont été effectuées

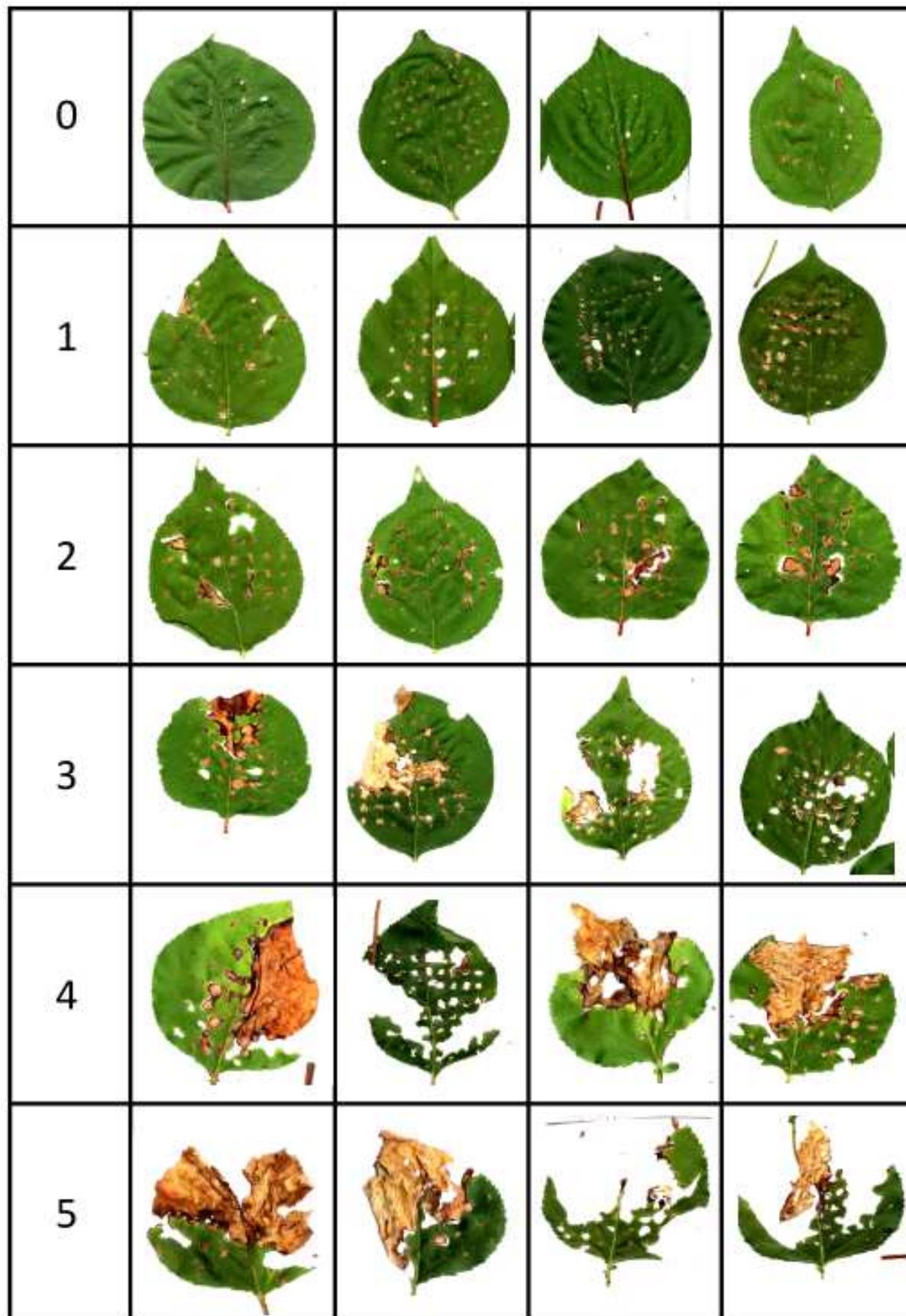
1. **Longueur de chancre** : languette d'inoculation et méplat.
 2. **Longueur de la blessure résultant de l'entaille** après décolllement de la languette et léger pelage.
 3. **Brunissement superficiel** après avoir ôté l'écorce, tissus verts de l'année.
 4. **Brunissement interne** après un décortiquage profond partant de l'entaille (ici, non représenté en totalité, seule la partie gauche est décortiquée).
- Le brunissement peut se prolonger sous un nœud (flèche rouge).



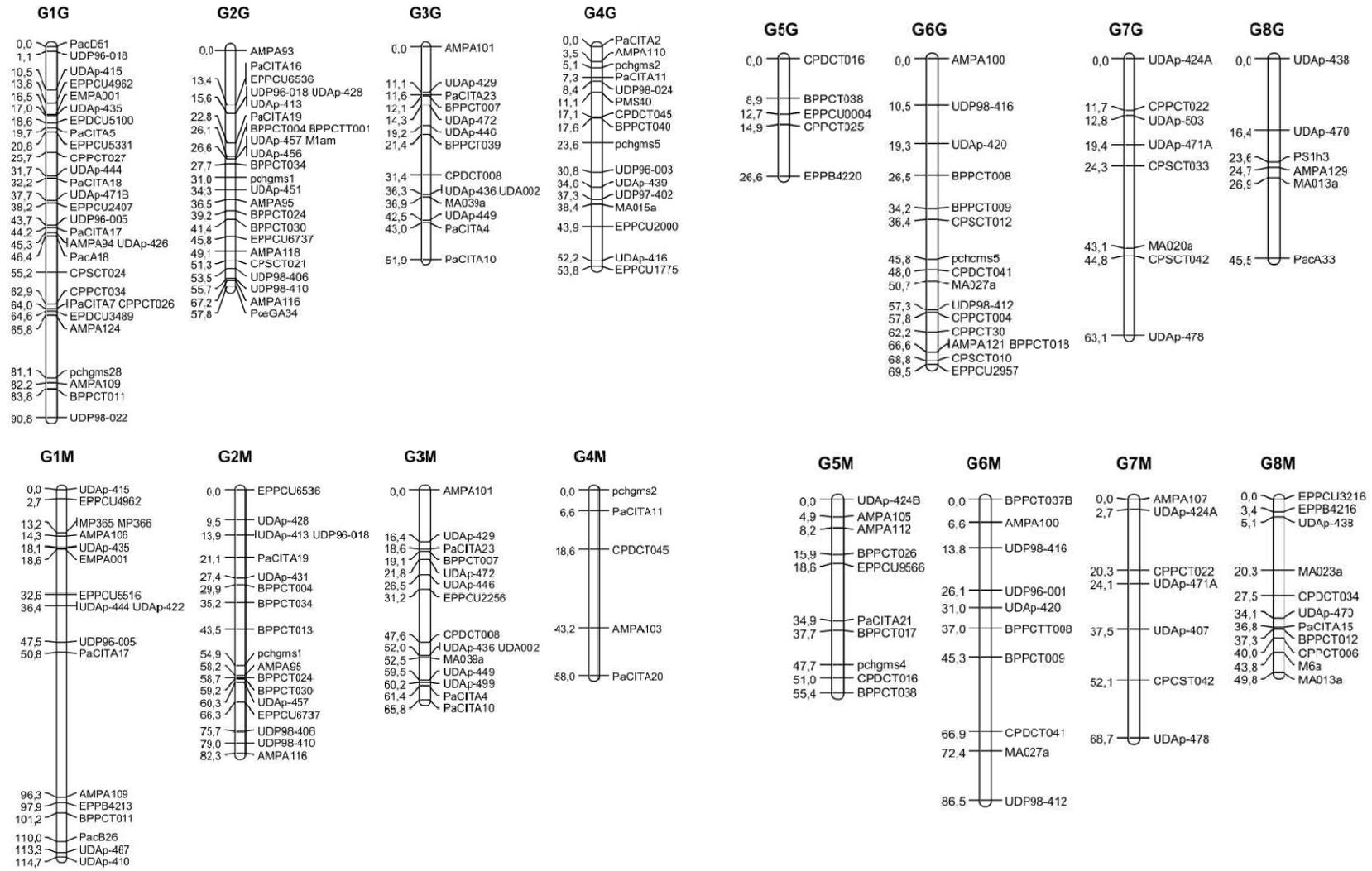
ANNEXE VIII : Repères visuels permettant la notation des symptômes de criblures sur feuilles d'abricotier trois semaines après inoculation de *P. syringae* pv. *syringae* (souche 41A) sur des blessures réalisées par perforation à l'aide d'une brosse métallique. Détail du pourcentage de nécrose représenté par chacune des classes :

0 = 0 à 5% ; 1 = 5 à 10% ; 2 = 10 à 25% ; 3= 25 à 50% ; 4 = 50 à 75% ; 5= 75 à 100%

Auteur : M. ROTH

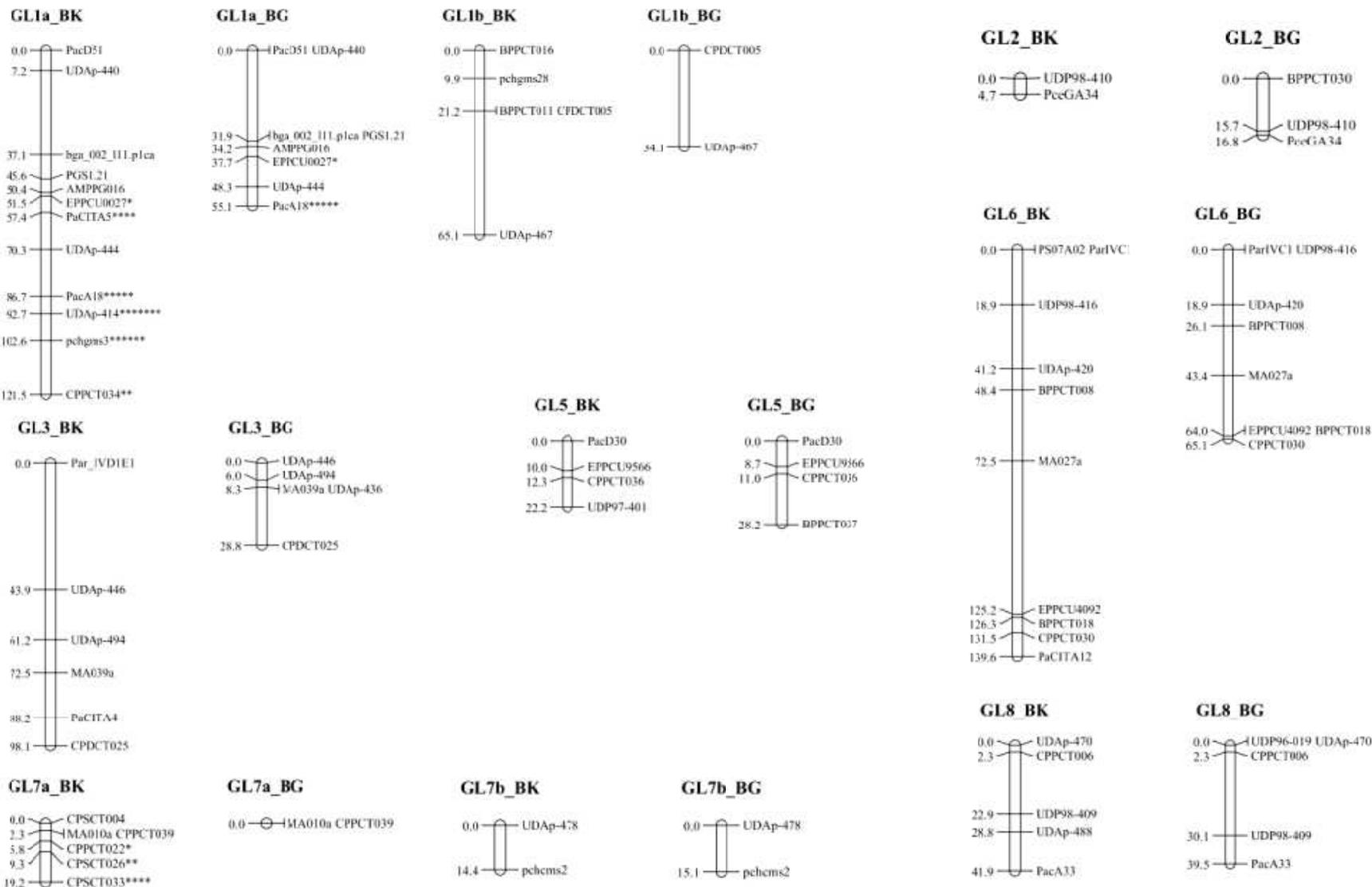


ANNEXE IX : Cartographie de type « père-mère » de la population Goldrich × Moniqui (187 individus), réalisée à l'aide de 93 marqueurs SSR dans Map Maker (fonction Kosambi). La dernière lettre du nom des chromosomes (G1 à 8) indique s'il s'agit du père « G » pour Goldrich ou de la mère « M » pour Moniqui. Les positions sont données en centimorgans. Auteur : P. LAMBERT

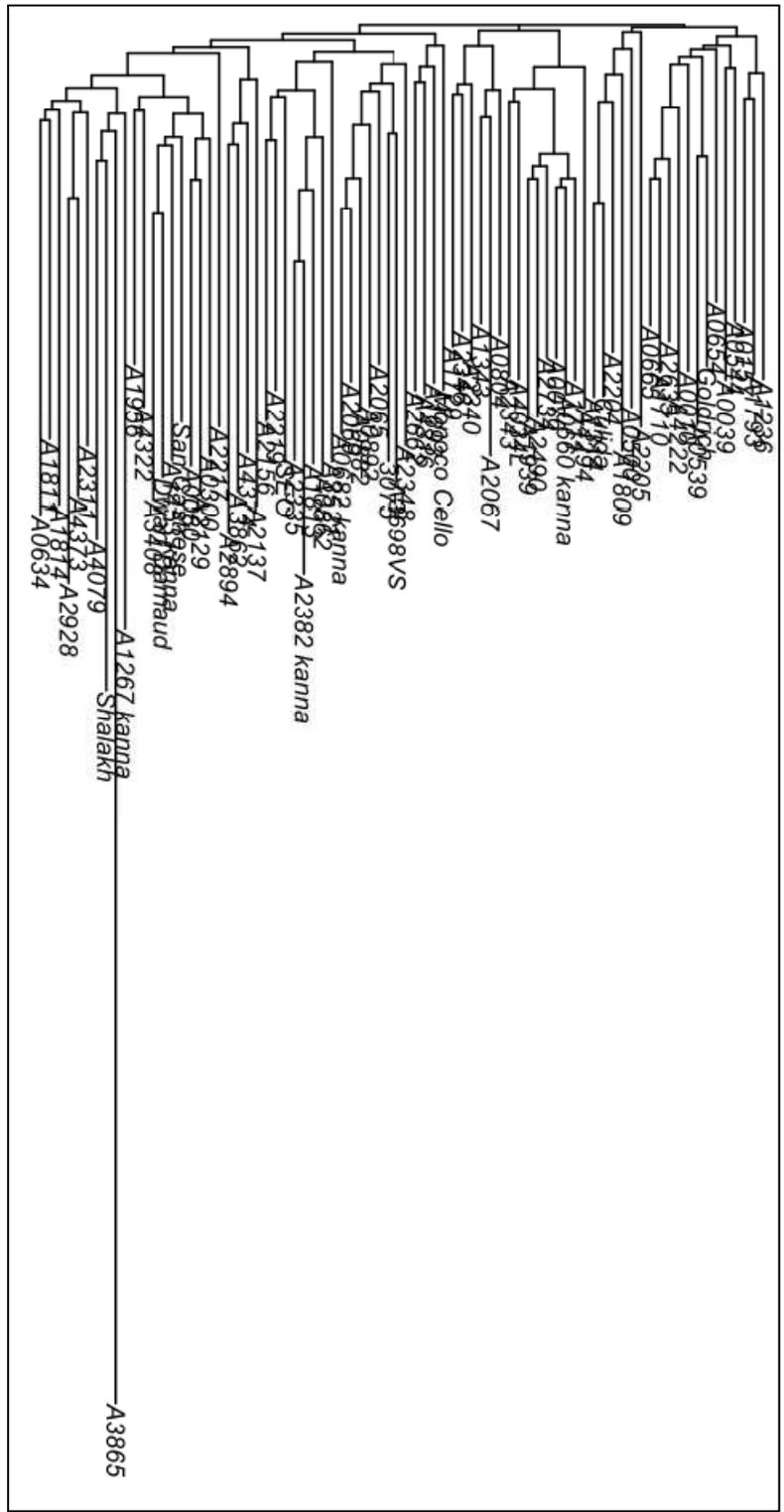


ANNEXE X : Cartographie de type « père-mère » de la population Bergeron x Bakour obtenue à l'aide de marqueurs SSRs parmi 89 individus. (52 marqueurs chez Bakour et 39 chez Bergeron). Les noms des chromosomes (GL1 à 8) indiquent s'il s'agit du père « BK » pour Bakour ou de la mère « BG » pour Bergeron. Les positions sont données en centimorgans. Logiciel : JoinMap® (Van Ooijen, 2066). Auteur : M. ROTH

42



ANNEXE XI : Arbre phylogénétique obtenu sur 78 accessions de la collection d'abricotier re-séquencées à l'aide de 2114 marqueurs SNPs en calculant les distances génétiques par paire d'individu (Neighbor Joining). Les accessions Shalakh et A3865 ne font pas partie du panel de 76 accessions conservé pour les analyses d'association. L'accession A3865 est un hybride interspécifique, ce qui explique sa position. Auteur : C. SAUVAGE



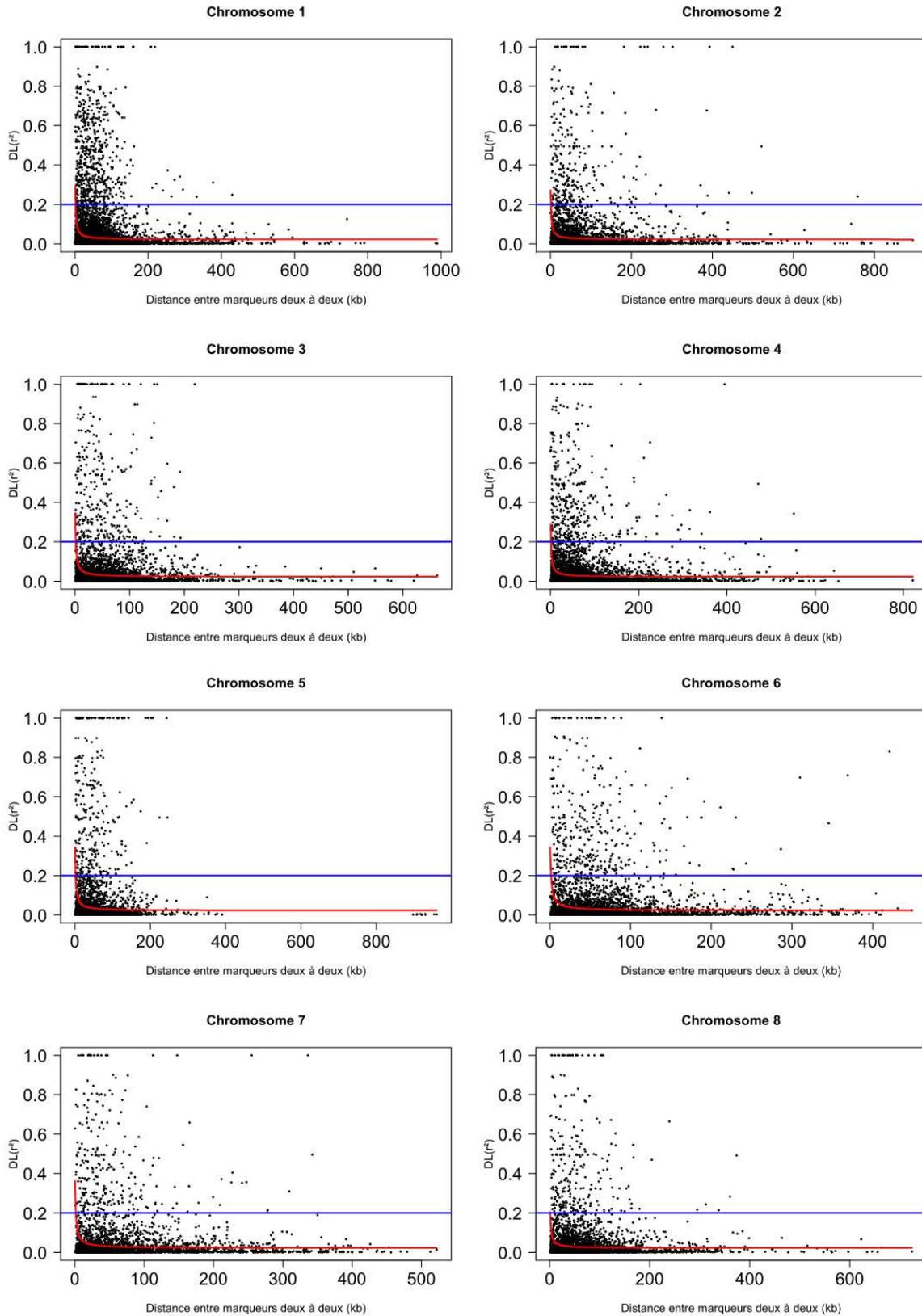
ANNEXE XII : Synthèse des marqueurs SNPs en association (40SNP, 44 associations) avec six variables mesurant les symptômes sur feuilles et rameaux de 76 accessions d'abricotier après inoculation de *P. syringae* pv. *syringae* (souche 41A). Le surlignage rouge indique l'association la plus significative pour chaque variable et le surlignage orange indique la redondance de deux marqueurs dans les résultats. Position en paires de base. « P brute » obtenue dans TASSEL à l'aide d'un GLM expliquant le phénotype par la matrice Q de STRUCTURE et les génotypes sur 7939 SNPs. « P corrigée » obtenue par un FDR (Benjamini, Hochberg 1995) à 5% sur les p-valeurs < 1.10^{-3} . R² du modèle : part de variation du phénotype expliquée par le modèle d'association. DL : déséquilibre de liaison entre marqueurs deux à deux. Auteur : M. ROTH

Variables	SNP	Chromosome	Position	P brute	P corrigée	R ² modèle	DL(r ²)
bs	_1268201	3	21140247	5,32E-05	1,43E-04	0,190	0,050
	1558033	4	17285402	7,16E-05	1,43E-04	0,185	0,009
	1621596	4	26173905	4,49E-04	5,39E-04	0,154	0,014
	_1634397	4	27212381	4,74E-05	1,43E-04	0,192	0,211
	_1754009	5	9458475	7,40E-04	7,40E-04	0,145	0,008
	2841287	8	18317414	2,80E-04	4,21E-04	0,162	0,044
lgc	742544	2	12373117	2,64E-05	2,38E-04	0,208	0,011
	_1206113	3	17903381	3,97E-04	9,29E-04	0,189	0,018
	_1640275	4	27691775	8,57E-04	9,29E-04	0,173	0,008
	_1788174	5	11877530	7,90E-04	9,29E-04	0,174	0,162
	_1808542	5	13017526	7,17E-04	9,29E-04	0,176	0,199
	_2042316	6	8991719	6,04E-04	9,29E-04	0,180	0,140
	_2361655	7	7731551	9,29E-04	9,29E-04	0,136	0,001
	_2370914	7	8608039	5,68E-04	9,29E-04	0,147	0,012
2648545	8	3063601	4,39E-04	9,29E-04	0,187	0,012	
lge	721869	2	9851930	5,04E-04	6,30E-04	0,179	0,014
	786524	2	16165214	5,40E-05	2,70E-04	0,223	0,025
	_923383	2	24184189	4,07E-04	6,30E-04	0,183	0,144
	_923661	2	24192038	8,57E-04	8,57E-04	0,167	0,020
	1202471	3	17627180	4,55E-04	6,30E-04	0,181	0,016
sevmed	461087	1	36884254	7,27E-05	1,82E-04	0,223	0,079
	612163	1	45323712	3,81E-04	4,77E-04	0,190	0,020
	1242509	3	19951394	1,23E-05	6,13E-05	0,258	0,000
	1825923	5	13918423	7,76E-04	7,76E-04	0,174	0,042
	2230350	6	25415527	3,75E-04	4,77E-04	0,190	0,111
sevmoy	49184	1	3318045	9,79E-04	9,79E-04	0,168	0,062
	461087	1	36884254	2,24E-04	4,49E-04	0,199	0,079
	1242509	3	19951394	3,75E-05	1,50E-04	0,235	0,000
	2230350	6	25415527	7,97E-04	9,79E-04	0,173	0,111
sevreglog	126566	1	9176293	8,76E-04	8,76E-04	0,174	0,007
	461087	1	36884254	1,19E-04	5,84E-04	0,217	0,079
	_546314	1	42395051	8,23E-04	8,76E-04	0,176	0,143
	_700018	2	6008237	3,82E-04	8,76E-04	0,157	0,012
	1038905	3	4053458	1,56E-04	5,84E-04	0,211	0,005
	_1168673	3	15375348	8,19E-04	8,76E-04	0,141	0,035
	_1267439	3	21109108	7,50E-04	8,76E-04	0,178	0,102
	1458319	4	9223383	7,79E-04	8,76E-04	0,177	0,014
	1543725	4	15845830	1,12E-04	5,84E-04	0,182	0,073
	_1871226	5	16369607	7,02E-04	8,76E-04	0,179	0,096
	2005427	6	6330047	6,12E-04	8,76E-04	0,182	0,182
	2106330	6	16100021	7,75E-05	5,84E-04	0,226	0,080
	_2109422	6	16419136	6,39E-04	8,76E-04	0,146	0,046
_2610964	8	232491	6,84E-04	8,76E-04	0,180	0,036	
2688460	8	7656450	6,39E-04	8,76E-04	0,146	0,005	

ANNEXE XIII : Portions du génome portant plusieurs associations proches pour le caractère de résistance de l'abricotier à l'inoculation tissulaire de *P. syringae* sur rameaux et feuilles. Position en paires de base. « P-valeur brute » obtenue dans TASSEL à l'aide d'un GLM expliquant le phénotype par la matrice Q de STRUCTURE et les génotypes sur 7939 SNPs. « P-valeur corrigée » obtenue par un FDR (Benjamini, Hochberg 1995) à 5% sur les p-valeurs $< 1.10^{-3}$. R² du modèle : part de variation du phénotype expliquée par le modèle d'association. DL : déséquilibre de liaison entre marqueurs deux à deux. Les zones bordées de rouge indiquent deux marqueurs proches, l'un détecté pour une variable descriptive des symptômes sur rameaux et l'autre pour une variable descriptive des symptômes sur feuilles. Le gène putatif donné pour chaque position provient de l'adossement à la séquence du pêcher (source : base de données Genome Database for Rosaceae <http://www.rosaceae.org/>). Les chromosomes sont différenciés par des couleurs distinctes. Les codes couleurs du DL permettent de nuancer les valeurs élevées et faibles de r². Auteur : M. ROTH

Nom du SNP	Variable	Chromosome	Position (pb)	P-valeur brut	P-valeur corrigée	R ² modèle	DL(r ²)	Nom de gène (GDR)
locus461087	sevmed	1	36884254	7,27E-05	1,82E-04	0,2235	0,0794	
locus461087	sevmoy	1	36884254	2,24E-04	4,49E-04	0,1992	0,0794	ppa008657m.g
locus461087	sevreglog	1	36884254	1,19E-04	5,84E-04	0,2168	0,0794	
locus923383	lge	2	24184189	4,07E-04	6,30E-04	0,1829	0,1436	ppa014748m.g
locus923661	lge	2	24192038	8,57E-04	8,57E-04	0,1674	0,0204	ppa000445m.g
locus120247 1	lge	3	17627180	4,55E-04	6,30E-04	0,1807	0,0163	ppa003163m.g
locus120611 3	lgc	3	17903381	3,97E-04	9,29E-04	0,1891	0,0178	ppa015769m.g
locus124250 9	sevmed	3	19951394	1,23E-05	6,13E-05	0,2578	0,0000	ppa023282m.g
locus124250 9	sevmoy	3	19951394	3,75E-05	1,50E-04	0,2348	0,0000	
locus126743 9	sevreglog	3	21109108	7,50E-04	8,76E-04	0,1779	0,1021	ppa013164m.g
locus126820 1	bs	3	21140247	5,32E-05	1,43E-04	0,1899	0,0502	ppa001900m.g
locus163439 7	bs	4	27212381	4,74E-05	1,43E-04	0,1918	0,2115	ppa005961m.g
locus164027 5	lgc	4	27691775	8,57E-04	9,29E-04	0,1725	0,0080	ppa017035m.g
locus180854 2	lgc	5	13017526	7,17E-04	9,29E-04	0,1764	0,1990	ppa000984m.g
locus182592 3	sevmed	5	13918423	7,76E-04	7,76E-04	0,1745	0,0423	ppa003331m.g
locus210633 0	sevreglog	6	16100021	7,75E-05	5,84E-04	0,2256	0,0799	ppa006112m.g
locus210942 2	sevreglog	6	16419136	6,39E-04	8,76E-04	0,1462	0,0462	ppa003572m.g
locus223035 0	sevmed	6	25415527	3,75E-04	4,77E-04	0,1899	0,1106	ppa006509m.g
locus223035 0	sevmoy	6	25415527	7,97E-04	9,79E-04	0,1727	0,1106	

ANNEXE XIV : Décroissance du déséquilibre de liaison (DL) sur l'ensemble des chromosomes d'un panel de 76 accessions d'abricotier, calculé à l'aide de 7939 marqueurs SNPs. L'intersection entre la courbe de régression (LOESS) en rouge et le seuil de 0.2 du r^2 en bleu indique une décroissance significative du DL. kb= kilobases. Auteur : M. ROTH





Diplôme :Ingénieur

Spécialité : Sciences et Production du Végétal

Spécialisation / option :Amélioration des plantes

Enseignant référent : Maria MANZANARES-DAULEUX

Auteur:Morgane ROTH

Date de naissance* : 31 août 1989

Nb pages :25 Annexe(s) :14 (Total : 57)

Année de soutenance : 2013

Organisme d'accueil : INRA GAFL

Adresse : Domaine Saint Maurice

67, Allée des chênes

CS 60094

F-84143 Montfavet cedex

Maître de stage : Jean Marc AUDERGON

Titre français : Recherche et validation de résistances génétiques au dépérissement bactérien causé par *Pseudomonas syringae* chez l'abricotier (*Prunus armeniaca* Linné)

Titre anglais : Investigation of the genetic control of resistance to bacterial canker induced by *Pseudomonas syringae* in the apricot tree (*Prunus armeniaca* Linné)

Résumé : Le dépérissement bactérien des *Prunus* est causé par *Pseudomonas syringae*, première source de dégâts par les bioagresseurs dans la culture de l'abricotier en France. L'absence de moyens de lutte chimique curative et le caractère imprévisible de cette maladie font de l'amélioration génétique une priorité pour la durabilité de la filière. Toutefois, à ce jour aucun travail ne reporte des facteurs génétiques impliqués dans la résistance à *P. syringae*. Nous avons étudié la résistance sur rameaux et sur feuilles de l'abricotier (*Prunus armeniaca* L.) suite à des inoculations sur lésions de *P. syringae* pv. *syringae* (souche 41A). Deux populations biparentales (pseudo-F1), 'Bergeron'×'Bakour'(224 individus) et 'Goldrich'×'Moniqui' (196 individus) ainsi qu'une collection de ressources génétiques ont été choisies. Les populations hybrides ont été génotypées avec des marqueurs Single Sequence Repeat (SSR) et les 76 individus de la collection à l'aide de marqueurs Single Nucleotide Polymorphism (SNP). Les données de phénotypage ont démontré que la résistance est quantitative, sous-tendant une architecture polygénique. Un ensemble de 40 SNP en association avec la résistance sur rameaux et/ou sur feuilles a été détecté. Les analyses de liaison ont révélé sur la population 'Goldrich'×'Moniqui' une zone d'intérêt de 4,8 à 8,8 cM selon la variable, en position terminale du chromosome 4 expliquant 10,1 à 11,4% de la variabilité observée. Des associations pour le caractère de résistance sur rameaux ont également colocalisé dans cette zone. Deux autres régions situées sur les chromosomes 3 et 5 ont présenté des facteurs communs de résistance sur les deux organes. De plus, la faible étendue du déséquilibre de liaison et la diversité présente chez l'abricotier nous encourageant à poursuivre les travaux de Genome Wide Association Study (GWAS) chez cette espèce.

Abstract :Bacterial canker of *Prunus* caused by *Pseudomonas syringae* is of major concern in apricot culture in France. The lack of chemical solution for this disease and the difficulty to predict damages lead us to consider the genetic improvement as a priority. However, little work has been done describing genetic resistance to *P. syringae* in stone fruits. Here, we studied resistance on leaves and branches of apricot tree (*Prunus armeniaca* L.) after inoculation of *P. syringae* pv. *syringae* on wounds (41A strain). Two biparental populations (pseudo-F1), 'Bergeron'×'Bakour' (224 individuals) and 'Goldrich'×'Moniqui' (196 individuals) and a collection of genetic resources have been selected for this work. This material was genotyped, by Single Sequence Repeat markers for biparental populations, and by Single Nucleotide Polymorphism for 76 accessions of the collection. Phenotypic data displayed a quantitative resistance, suggesting a polygenic model for this trait. A set of 40 SNPs showed association with resistance on branches and/or on leaves has been reported. Within the population 'Goldrich'×'Moniqui', linkage analysis showed a region of 4,8 to 8,8 cM (depending on the variable), at the end of the chromosome 4, accounting for 10,1 to 11,4% of the phenotypic variance on leaves. Associations to resistance on branches colocalised in this region. Two other regions on chromosomes 3 and 5 are also linked to resistance in both organs. Thank to the low extent of linkage disequilibrium and considering the available genetic and phenotypic diversity in apricot tree, we recommend to carry on with Genome Wide Association Studies (GWAS) for the genetic improvement in this species.

Mots-clés : *Prunus*, abricotier, dépérissement, bactérien, *Pseudomonas syringae*, vascularisation, inoculation, Single Sequence Repeat, Single Nucleotide Polymorphism , QTL, génétique d'association, déséquilibre de liaison, génomique.

Key words : *Prunus*, apricot tree, bacterial canker, *Pseudomonas syringae*, vascular conduction, inoculation, Single Sequence Repeat, Single Nucleotide Polymorphism , QTL, GWAS, linkage disequilibrium, genomics.

* Élément qui permet d'enregistrer les notices auteurs dans le catalogue des bibliothèques universitaires

Document à déposer sur moodle en format txt