

**AFPP – 10^e CONFÉRENCE INTERNATIONALE SUR LES MALADIES DES PLANTES
TOURS – 3, 4 et 5 DÉCEMBRE 2012**

**MISE AU POINT D'OUTILS AMELIORES POUR L'EVALUATION DES RESISTANCES
VARIETALES DU BLE TENDRE A SEPTORIA TRITICI**

David Gouache¹, Delphine Hourcade², Marc-Henri Lebrun³, Thierry Marcel³, Aurélie Ducasse³, Sian Deller³, Colette Audeon³, Henriette Goyeau³, Frederic Suffert³, Christophe Michelet⁴, Olivier Robert⁵, Valerie Cadot⁶, SMT Ghaffary⁷, Gert HJ Kema⁷

- ⁽¹⁾ Arvalis – Institut du Végétal. IBP Université Paris Sud, rue de Noetzlin, Bât. 630, 91405 Orsay, France, d.gouache@arvalisinstitutduvegetal.fr
⁽²⁾ Arvalis – Institut du Végétal. Station Expérimentale. 91720 Boigneville, France
⁽³⁾ INRA, UR1290 BIOGER-CPP, 78850 Thiverval Grignon, France
⁽⁴⁾ RAGT 2n, Station de recherche RAGT 2n S.A.S., Route d'Epincy – 28150 Louville la Chenard, France
⁽⁵⁾ BIOPLANTE – lieudit Wattines, BP41, 59242 Cappelle en Pévèle, France
⁽⁶⁾ GEVES, Domaine de la Boisselière 49250 Brion, France
⁽⁷⁾ Plant Research International B.V., P.O. Box 16, 6700 AA Wageningen, The Netherlands

RÉSUMÉ

Ce document présente les résultats d'un projet de développement d'outils ayant pour objectif l'évaluation des résistances variétales à la septoriose, de la sélection à la post-inscription. La présence de gènes *Stb* de résistance à la septoriose (*S. tritici*) a été analysée dans 58 variétés françaises. Ceux-ci y sont peu présents, et pourraient potentiellement constituer des sources de résistance. L'intérêt des études de génétique d'association pour identifier les gènes de résistance présents dans le matériel élite français a été montré. Des méthodes de phénotypage ont été spécifiquement mises au point, dans ce cadre. Une importante collection de souches pathogènes a été échantillonnée. Son génotypage et phénotypage donnent des informations pour réfléchir un potentiel déploiement des résistances. Des méthodes d'étude de la résistance partielle ont également été développées, pour mieux comprendre les processus qui sous-tendent les résistances.

Mots-clés : *Septoria tritici*, *Triticum aestivum*, résistance spécifique, résistance partielle, phénotypage

SUMMARY

CREATION OF TOOLS FOR THE IMPROVED EVALUATION OF WHEAT CULTIVAR RESISTANCE TO SEPTORIA TRITICI

Key results from a methodological project aimed at developing improved tools to characterize wheat cultivar resistance to *Septoria tritici*, for breeding, registration, post-registration and academic research, are presented. We tested the presence of known *Stb* genes in 58 cultivars: they are generally absent, implying some may provide useful sources of resistance. Another consequence is that developing association genetics approaches will be useful to identify resistance genes in French elite material: phenotyping approaches to do so were developed. A large collection of isolates was collected from French fields. Genotyping and pathotyping yield interesting information in view of deploying resistance genes. Innovative approaches to study partial resistance were also developed, opening up towards a better understanding of resistance to *Septoria tritici*.

Key words: *Septoria tritici*, *Triticum aestivum*, specific resistance, partial resistance, phenotyping

INTRODUCTION

La septoriose du blé tendre (*Triticum aestivum*), causée par *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*), est la maladie la plus importante économiquement de cette culture en France par sa présence généralisée sur le territoire et sa nuisibilité élevée, pouvant atteindre plus de 50 q/ha dans les situations les plus exposées (Jorgensen *et al.* 2008). Le contrôle de la septoriose s'appuie essentiellement sur la lutte chimique, avec la réalisation de 1 à 3 traitements, qui contribuent en moyenne à approximativement la moitié de l'investissement en fongicides sur blé (Maumené, communication personnelle). La première méthode de lutte complémentaire est l'emploi de variétés résistantes qui permet de réduire l'investissement fongicide de l'ordre de 20 €/ha (Jorgensen *et al.* 2008), soit un tiers à un quart. Toutefois, caractériser les résistances variétales vis-à-vis de la septoriose est une tâche complexe, comme l'ont constaté de nombreux auteurs en France (Bernicot, 2006) et dans le monde (van Ginkel et Rajaram, 1999 ; Goodwin, 2007). Dans sa revue, Goodwin (2007) rappelle ainsi le propos de Nelson et Marshall de 1990 : « en comparaison aux autres maladies du blé, comme les rouilles, peu de progrès ont été réalisés en matière de résistance variétale aux septorioses ». Malgré l'accélération significative des recherches, Goodwin inventoriait 12 gènes de résistance, dits *Stb*, en 2007. Même en tenant compte de la mise à jour de l'inventaire par Cuthbert (2011) auquel se rajoutent les travaux de Ghaffary *et al.* (2011, 2012), 18 gènes *Stb* sont identifiés aujourd'hui, à comparer aux 73, 89, 61 et 95 pour la rouille jaune, rouille brune, rouille noire et oïdium, respectivement (Ghaffary *et al.*, 2011).

van Ginkel et Rajaram (1999) puis Goodwin (2007) explicitent les nombreuses difficultés : grande diversité génétique du pathogène (Zhan *et al.* 2002, 2003), difficulté à mettre en évidence des interactions spécifiques (van Ginkel et Scharen, 1987), et surtout, les difficultés à phénotyper de manière stable et répétable le comportement des génotypes, que ce soit en conditions contrôlées (Bockus 2007) ou au champ, du fait d'un grand nombre de facteurs interagissant avec la progression épidémique comme la précocité, la hauteur des plantes, et d'autres encore (Gouache *et al.*, 2009 ; Arraiano *et al.*, 2009).

Nous présentons ici quelques uns des résultats essentiels d'un projet à vocation méthodologique, dont l'objectif était de mettre au point ou d'améliorer les outils et pratiques en matière de caractérisation des résistances variétales à la septoriose, et de les partager au sein d'un consortium regroupant la recherche académique, la sélection, l'inscription et le conseil post-inscription. Nous présenterons successivement les travaux des différentes tâches du projet, en décrivant brièvement pour chacune les enjeux, les approches mises en œuvre, les résultats essentiels et leur portée. Nous concluerons en discutant les perspectives ouvertes par ces travaux. Les travaux que nous décrirons sont : la recherche des gènes *Stb* connus dans 58 cultivars français via des tests pathologiques et la présence de marqueurs moléculaires associés, la caractérisation phénotypique et moléculaire des populations françaises de septoriose, la mise au point et l'exploitation d'outils d'étude de la résistance partielle, et la mise au point de protocoles de phénotypage de la résistance adulte pour les études de génétique d'association. Des travaux ont également été réalisés sur la mise au point et l'exploitation de méthodes de qPCR et la correction du biais de précocité dans les essais en contamination naturelle, mais ne sont pas présentés ici.

I. CARACTERISATION MOLECULAIRE ET PHENOTYPIQUE DE LA RESISTANCE SPECIFIQUE

La résistance spécifique à *M. graminicola* est pratiquement totale, oligogénique, et gouvernée par une relation gène-pour-gène (Brading *et al.*, 2002). Nous avons caractérisé 58 variétés et lignées de sélection pour les gènes *Stb* 1 à 15 par le biais de tests d'inoculation avec des souches différentielles sur plantules.

MATERIEL & METHODES

Souche	Provenance		Recherche des gènes <i>Stb</i> dans les cultivars français
	Pays	Lieu	
323	Netherlands	W.Brabant	La réalisation des tests sur plantule est décrite en détail dans Ghaffary (2011). Il s'agit d'inoculer des plantules entre l'émergence et le stade 2 feuilles, avec une série de souches présentant des profils de virulence différenciés, permettant de postuler la composition des variétés en gènes <i>Stb</i> . Chaque expérimentation a été répétée 2 fois. Les souches utilisées sont présentées ci-dessous (Tableau 1).
88004	Ethiopia	Kulumsa	
98051	France	Villaines la Gonais	
94218	Canada	Saskatoon	
98042			
90006	Mexico	Toluca	
98022	France	Villaines la Gonais	
98033	France	Capelle-en-Pévèle	
86013	Turkey	Adana	
92034	Algeria	Guelma	
90015	Peru	Inconnu	
9007			
2166	Iran	Dezful, Safi Abad	
99031	France	Beauce	
9008			
98050	France	St. Pol de Léon	Test des marqueurs moléculaires disponibles
95054	Algeria	Berrahal	
99018	France	Beauce	

Tableau 1 : Liste des souches utilisées pour évaluer la présence des gènes *Stb*

Les marqueurs moléculaires disponibles ont ensuite été testés : ils sont présentés Tableau 2 (modifiée de Goodwin, 2007).

Gene	Localisation	Marqueurs et distance au gène	Parent donneur	Stade de développement évalué
<i>Stb1</i>	5BL	barc74(2.8 cM), gwm335	Bulgaria 88	Plantule et adulte
<i>Stb2</i>	3BS	gwm389 (0.9 cM), gwm533, gwm493	Veranopolis	Plantule
<i>Stb3</i>	7AS	wmc83	Israel 493	Plantule
<i>Stb4</i>	7DS	gwm111 (0.7 cM)	Tadinia	Plantule et adulte
<i>Stb5</i>	7DS	gwm44 (7.2 cM)	Chinese Spring (Syntetic 7D)	
<i>Stb6</i>	3AS	gwm369 (2 cM)	Senat, Flame, Kavkaz-K4500	Plantule, adulte et sur feuilles
<i>Stb7</i>	4AL	wmc313 (0.5 cM), wmc219, gwm160	Estanzuela Federal	Plantule et feuilles
<i>Stb8</i>	7BL	gwm146, gwm577	Syntetic W7984	Plantule
<i>Stb9</i>	2BL	gpw1214, gpw4044, gpw5039, wmc317, barc0129	Courtot, Tonic	Plantule
<i>Stb10</i>	1D	gwm848 (private marker)	Kavkaz-K4500	
<i>Stb11</i>	1BS	barc008 (<1cM)	TE 9111	
<i>Stb12</i>	4AL	wmc219	Kavkaz-K4500	Plantule et feuilles
<i>Stb13</i>	7BL	wmc396		
<i>Stb14</i>	3BS	wmc500 (2cM), wmc632 (5cM)		
<i>Stb15</i>	6AS	psr904 (RFLP marker)	Arina	Feuilles

Tableau 2 : Liste des marqueurs testés (modifiée de Goodwin, 2007)

Dans un premier temps, l'amplification des marqueurs a été testée sur une liste de variétés de référence, quand elles étaient connues et disponibles, (Tableau 3) pour valider qu'ils fournissent bien les informations attendues. Ensuite, ils ont été testés sur 54 des 58 variétés du panel phénotypé, si les résultats obtenus sur les variétés de référence le permettaient.

RESULTATS

La recherche des gènes *Stb* a permis de montrer que seul *Stb 6* est présent de manière régulière dans les variétés françaises : il se retrouve dans 28 des 58 cultivars testés. Ce résultat est peu surprenant, Arraiano et Brown (2006) ayant montré qu'il était largement présent dans tout le matériel européen. Ce gène est a priori peu intéressant au champ, car les souches échantillonnées en France (et dans le monde) par l'équipe du PRI contournent cette résistance (Ghaffary et al, 2008). D'après le test effectué, aucune des 58 variétés ne semble posséder les gènes *Stb 1*, *5*, *10*, *11*, *12*, et *15*. *Stb 2*, *3*, *4* et *8* ont été mis en évidence une seule fois chacun, *Stb 9* trois fois et *Stb 7*, *13*, et *14* quatre fois. Dans les variétés ainsi

identifiées, seuls *Stb 2*, *Stb 4* et *Stb 8* sont présents dans du matériel connu pour sa résistance au champ en France. Pour les autres gènes, l'absence de lien avec un comportement de résistance connu peut s'expliquer par 2

phénomènes : soit par l'existence de la virulence correspondante dans les souches françaises, ce qui semble être le cas pour *Stb 7* et *9* (Ghaffary et al, 2008), soit par des différences entre résistance au stade plantule et résistance au stade adulte (Kema et van Silfhout, 1997). Un dernier point important est la sensibilité à toutes les souches inoculées de plusieurs variétés connues pour leur forte résistance au champ, comme Toison dor, Boisseau, Koreli ou Maxwell. Ceci indiquerait qu'il existe chez ces variétés une résistance adulte, que les inoculations au stade plantule ne permettent pas de mettre en évidence.

Du côté des marqueurs moléculaires, nombre d'entre eux ne semblent pas directement utilisables sur le matériel élite français. Les résultats d'amplification obtenus pour les marqueurs de *Stb 1*, *6*, et *8* sur les variétés de référence ne sont pas cohérents avec les données de la littérature. Pour les autres, du polymorphisme a été détecté à ces marqueurs, mais sans lien clair avec les résultats de phénotypage. Ceci est peu surprenant, vu que ces marqueurs ont été obtenus sur du matériel généralement « exotique ». Néanmoins, les marqueurs disponibles pour *Stb 2*, *3*, et *4* semblent prometteurs. Le marqueur pour *Stb 2* est bel est bien présent dans la variété Sankara, seule variété dans laquelle ce gène a été identifié. A noter que le même profil moléculaire a été obtenu sur la variété Trémie, qui elle, ne le porte pas. Pour *Stb 3*, seule Haussmann possède ce gène d'après les tests, et le résultat d'amplification du marqueur associé à ce gène indique également sa présence. 25 autres variétés possèdent ce marqueur, et bien que le gène *Stb 3* n'y ait pas été identifié, plus de la moitié d'entre elles sont entièrement résistantes à la souche 88004 et les autres présentent des niveaux de symptômes faibles. Enfin, Ambition, seule à posséder *Stb 4* d'après les tests en gamme d'hôte, possède également les marqueurs moléculaires attendus

Variétés	gène de resistance
Oasis	stb1
Sullivan	stb1
Clark	stb1
Monon	stb1
Arthur	stb1
Chinese Spring	stb1
Veranopolis	stb2
Yecora Rojo	stb4
Senat	stb6
Amigo	stb6
Gene	stb6
Heines Kolben	stb6
Blé Seigle	stb6
Arina	stb6
Armada	stb6
Atlas 66	stb6
Bezostaya 1	stb6
Longbow	stb6
Synthetic W7984	stb8
Opata 85	stb8
Tonic	stb9
Riband	stb15
Forno	stb15
Courtot	stb9

Tableau 3 : Liste des variétés de référence disponibles utilisées pour vérifier l'amplification des marqueurs

CONCLUSIONS

Le premier résultat remarquable est la faible présence des gènes *Stb* répertoriés dans le matériel élite français. Ceux-ci pourraient donc constituer des sources de résistance intéressantes pour la sélection. En considérant les connaissances sur les virulences correspondantes présentes dans les populations françaises, le comportement au champ des rares variétés élites portant les gènes *Stb*, et les premiers tests de marquage moléculaire, les gènes les plus prometteurs semblent être *Stb 4*, *2* et *3*. Des travaux visant à confirmer leur intérêt et à améliorer la pertinence des marqueurs, s'appuyant par exemple sur des populations recombinantes avec les variétés Ambition, Sankara, et Haussmann comme parents résistants, seraient à poursuivre.

L'autre conclusion essentielle est que le matériel élite français possède donc d'autres résistances : pour mieux l'exploiter, il paraît donc très utile d'en identifier le déterminisme génétique. Des travaux de génétique d'association semblent particulièrement indiqués pour cela. Qui plus est, l'existence de résistances adultes incite fortement à ce que ces travaux de génétique d'association soient aussi conduits avec du phénotypage au champ. Nous y reviendrons plus loin.

II. CARACTERISATION MOLECULAIRE ET PHENOTYPIQUE DES POPULATIONS FRANÇAISES DE SEPTORIOSE

La compréhension des facteurs impliqués dans l'évolution de ces populations est importante pour évaluer l'efficacité potentielle des stratégies de lutte, génétique en particulier (McDonald, 1997). La caractérisation des populations à l'aide des premières générations de marqueurs moléculaires a permis de mieux comprendre la structure génétique des populations de *M. graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) (Zhan et al. 2003). Néanmoins, ceux-ci n'ont pas permis d'établir de lien avec les évolutions phénotypiques : dans les populations d'Orégon, alors qu'aucune trace de sélection n'a été détectée à l'aide de marqueurs neutres RFLP, les études au champ et en serre ont montré une sélection pour une augmentation de la virulence et de l'agressivité au cours de la saison (Chen et al., 1994, McDonald et al., 1996, Mundt et al. 1999). De plus, des gènes de résistance spécifiques Stb ont déjà été contournés avec l'apparition de souches virulentes (Cowger et al. 2000 et 2002). Le projet a donc visé à améliorer la connaissance des souches de septoriose françaises. En effet, la population française caractérisée pour ses virulences (Ghaffary et al, 2008) correspond à un échantillonnage restreint. La caractérisation sur la base de marqueurs neutres d'une autre population, plus vaste, (El Chartrouni, 2011) l'a été sur un faible nombre de marqueurs. Nous avons donc, premièrement, contribué à l'élaboration d'un panel de marqueurs moléculaires, deuxièmement, établi un vaste échantillonnage de souches de septoriose françaises, troisièmement, analysé une partie de la population échantillonnée grâce au panel de marqueurs, et enfin, pathotypé les souches pour leurs virulences.

MATERIEL & METHODES

Mise au point des panels de marqueurs microsatellites

24 marqueurs microsatellites répartis sur les 21 chromosomes de *M. graminicola* ont été sélectionnés parmi les marqueurs précédemment publiés (Owen et al. 1998 ; Goodwin et al. 2007) et parmi un set de 3728 nouveaux marqueurs identifiés suite à une recherche bioinformatique systématique du génôme de la souche IPO-323 récemment séquencée (Goodwin et al., 2011). Les positions des nouveaux marqueurs ont été comparées à celles des gènes prédits sur le génôme de *M. graminicola* afin de ne sélectionner que des microsatellites présents dans les régions codantes. La sélection des marqueurs s'est également faite à partir de la gamme de taille des allèles et du polymorphisme connus des marqueurs. Un protocole a été mis au point afin d'amplifier les 24 marqueurs microsatellites en 3 panels de 8 marqueurs dont les amorces ont été multiplexées avant PCR. Les panels 1 et 2 correspondent à des marqueurs cartographiés sur les chromosomes 1 à 13 (« chromosomes fondamentaux ») et le panel 3 à des marqueurs cartographiés sur les chromosomes 14 à 21 (« chromosomes dispensables »). Pour chaque multiplex une paire d'amorces amplifiant un gène très conservé (peu ou pas de polymorphisme) de *M. graminicola* a été ajouté afin d'avoir une amplification contrôle. Afin de valider les trois panels de marqueurs microsatellites ainsi constitués une collection de 130 isolats, représentant la diversité mondiale de *M. graminicola*, a été génotypée.

Echantillonnage des souches françaises

Au cours des années 2009 à 2011, 2 échantillonnages ont été réalisés. Le premier a été réalisé dans les essais variétaux d'Arvalis et du Geves, sur les parcelles non-traitées des variétés Apache et Premio. Un échantillonnage hiérarchique, de 5 zones par parcelle et 3 feuilles (F1, ou F2 si aucune pycnide n'était présente sur F1) par zone. Par ailleurs, un second échantillonnage, également dans des essais variétaux, a été conduit sur une plus grande

diversité de variétés, présentant différents niveaux de résistance au champ : : Apache, Premio, Caphorn, Sankara, Dinosor.

Génotypage des souches

Les panels 1 et 2 de marqueurs microsatellites correspondant à des marqueurs cartographiés sur les 13 premiers chromosomes ont été utilisés pour génotyper 774 isolats de l'ensemble de la collection constituée (n=1772) afin d'en étudier le niveau de diversité et la structure génétique. Le type sexuel des 774 isolats (MAT1-1 ou MAT1-2) a également été déterminé à l'aide du protocole publié par Waalwijk et al. (2002). La collection a été subdivisée en sous-collections, chaque sous-collection correspondant à des isolats collectés la même année, sur un même cultivar, sur une même parcelle. Les sous-collections présentant un nombre d'isolats suffisant (>30) et respectant la hiérarchie de l'échantillonnage ont été retenues pour les analyses génétiques. Du premier échantillonnage, 17 sous-collections ont été retenues et 421 isolats génotypés. Du second échantillonnage, 15 sous-collections ont été retenues et 353 isolats génotypés. Le nombre d'isolats génotypés par sous-collection est compris entre 17 et 29, avec en moyenne 24,2 isolats par sous-collection.

Pathotypage des souches

150 souches monospores parmi la collection ont été retenues pour les analyses phénotypiques. Ce pathotypage a été réalisé avec le même protocole que celui décrit pour la postulation des gènes *Stb* décrit ci-dessus. Les souches sont confrontées à 22 cultivars différentiels portant un ou plusieurs gènes *Stb* plus 2 variétés témoins de sensibilité. Les résultats présentés sont issus de la moyenne de 2 répétitions.

RESULTATS

Validation des panels de marqueurs microsatellites

Une collection de 130 isolats représentant la diversité mondiale de *M. graminicola* a été génotypée avec les 3 panels de marqueurs microsatellites multiplexés. Les résultats de cette analyse montrent que les niveaux de variabilité génétique (nombre et fréquence des différents allèles) de ces microsatellites sont très hétérogènes. Les microsatellites possèdent de 2 à 28 allèles et ont des niveaux de diversité génique (uH) compris entre 0.085 et 0.920. La plupart des microsatellites présentent un ou deux allèles majoritaires dans la collection, à l'exception de 3 marqueurs localisés sur des chromosomes dispensables. Enfin, un nombre important d'individus présentent des allèles nuls (absence d'amplification) pour les 8 microsatellites du panel 3 (localisés sur les chromosomes dispensables), indiquant que le chromosome correspondant est certainement absent.

Echantillonnage des souches françaises

L'échantillonnage en 2009 a été le plus intensif, aboutissant à plus de 900 souches disponibles pour la 1^{ère} étude et plus de 300 pour la seconde. En 2010, l'effort d'échantillonnage a été plus ciblé, et a abouti tout de même à plus de 350 souches pour chacune des 2 études. Le bilan de la collection 2011 est en cours. La figure 1 détaille l'origine de l'ensemble des différentes souches collectées.

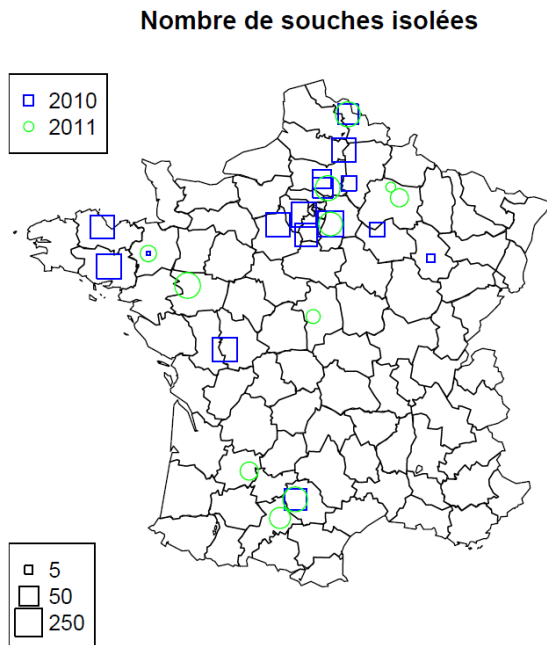


Figure 1 : Carte de l'origine des différentes souches collectées en 2009 et 2010

différenciées entre elles. Seules les deux populations du Sud de la France se distinguent d'abord pour avoir la diversité génique la plus élevée, mais leur échantillonnage ayant été réalisé de manière légèrement différente, ce résultat est à confirmer.

Génotypage des souches

Les 774 isolats français sont répartis en 32 sous-collections différenciées selon le lieu, le cultivar et l'année de collecte. Par souci de simplicité, ces sous-collections seront appelées « populations » ci-après. Globalement, le ratio des types sexuels de 408 *MAT1-1* : 357 *MAT1-2* n'est pas significativement différent d'un ratio 1:1. Parmi les 774 isolats, 584 haplotypes différents ont été identifiés, indiquant une proportion globale d'haplotypes uniques de 75% dans ces populations. Après correction pour la fraction clonale, 592 isolats ont été conservés pour les analyses de diversité et de distances génétiques. La diversité génique moyenne observée est égale à 0.458, et varie dans chaque population de 0.372 à 0.519. D'autre part, une première analyse des distances génétiques de Nei montre que les 32 populations ne sont pas ou peu

Pathotypage des souches

La caractérisation phénotypique de la collection a révélé, qu'au stade plantule, il existe en France des isolats virulents sur tous les gènes *Stb* testés. Cependant, es gènes *Stb* 1 à 5 restent intéressants, *Stb* 5 et *Stb* 3 étant les plus efficaces en France (c.-à-d. moins de 35% des isolats sont virulents). Ceci confirme les observations faites sur la population historique de 1988. Au contraire, les gènes *Stb* 13+14, *Stb* 7, *Stb* 9 et *Stb* 15 ne sont efficaces que très rarement (c.-à-d. plus de 90% des isolats sont virulents). Il est également intéressant de noter que la combinaison de gènes de résistance individuellement peu efficaces augmente significativement le niveau de résistance de lignées testées, notamment en ce qui concerne les gènes *Stb* 6, *Stb* 11 et *Stb* 18. La caractérisation phénotypique des isolats n'a révélé aucune structure particulière de la collection liée à la région ou au cultivar d'échantillonnage des isolats.

L'analyse des données préliminaires de pathotypage des souches semble montrer qu'il n'y a pas de structuration du comportement de celles-ci par rapport à la provenance – régionale ou variétale – des isolats.

CONCLUSIONS

Afin de mieux connaître les populations de *M. graminicola* présentes en France nous avons constituée une collection exceptionnelle de 1772 isolats échantillonnés de manière hiérarchique dans plusieurs bassins de production et sur des variétés aux niveaux de résistance contrastés. Nous avons mis au point un protocole de génotypage des isolats ayant vocation à être mis à la disposition de la communauté scientifique. Son utilisation a permis de conclure que la reproduction sexuée joue un rôle prépondérant, que la diversité au sein de ces populations est élevée, et qu'il n'existe qu'une faible différenciation génétique entre celles-ci, en concordance avec plusieurs autres études (Linde et al. 2002, Zhan et al. 2002, Zhan et al. 2003, El Chartouni et al. 2011) L'étude phénotypique systématique des virulences vis-à-vis des gènes *Stb* d'une population aussi vaste de souches de *M. graminicola* constitue à notre connaissance une première. Les résultats, montrent que certains gènes *Stb* sont efficaces face aux populations françaises. Ils montrent également qu'une stratégie visant à combiner les gènes de résistance à la septoriose dans les cultivars de blé pourrait être efficace. Ils montrent aussi que certaines souches semblent posséder un spectre de virulences complet vis-à-vis de l'ensemble des gènes *Stb*. Ces souches seront à étudier et suivre de manière approfondie.

III. CARACTERISATION DE LA RESISTANCE PARTIELLE

Actuellement, les mesures de résistance quantitative du blé à *M. graminicola* reposent sur la mesure de la surface foliaire sporulante (lésions présentant des pycnides, Kema et van Silfhout 1997, Arraiano 2001). Mais la résistance partielle (quantitative) peut agir en réduisant d'autres composantes du cycle épidémique : efficacité d'infection, période de latence, taille des lésions nécrotiques/sporulantes, quantité de spores produites par lésion, induction de la sénescence, capacité de restauration et vitesse d'épuisement des pycnides (Cowger et al. 2002, Eyal et Brown 1976, Gough 1978, Lovell et al. 2004, Viljanen-Rollinson 2005).

MATERIEL & METHODES

Une technique d'inoculation localisée de *S. tritici* (échelle foliaire, environ 2 cm²) a été mise au point. Elle permet de produire des lésions de septoriose sur plantes adultes en serre (conditions optimales retenues : dose inoculum 10⁵ spores ml⁻¹, application au pinceau, incubation par ensachage pendant 72 h). L'évolution des symptômes a été réalisée par notations visuelles au rythme de deux par semaine (soit une cinétique de développement épidémique à plus de 15 points). Une technique non destructive de collecte de pycnidiospores par mise en solution aqueuse a permis d'estimer la dynamique de sporulation.

L'ensemble des paramètres de la dynamique d'apparition et d'évolution des symptômes (surface chlorotique, surface nécrotique, surface sporulante, dénombrement de pycnides) a été analysé par ajustements non linéaires (modèle Logistique/Gompertz) et conduit à la définition d'une quinzaine de variables épidémiologiques élaborées, accessibles seulement après modélisation des cinétiques. De plus, le potentiel de sporulation d'une cohorte de pycnides (quantité de spores libérée), la capacité de restauration d'une lésion (capacité à produire et libérer des spores au fur et à mesure de son vieillissement) et sa dynamique d'épuisement sont en cours d'analyse par une modélisation de la dynamique temporelle de sporulation.

Ce dispositif expérimental a été déployé sur 4 variétés (Apache, Soissons, Caphorn, Koreli croisées avec 4 souches de septoriose – 3 locales et IPO323) et répété deux fois. Lors de la seconde répétition, les variétés Premio, Balance, Capelle, Toison d'Or et Barok ont été rajoutées au dispositif.

RESULTATS

Tableau 4 : Variables épidémiologiques retenues pour caractériser la résistance partielle

Variable	Signification biologique
Temps du pic de chlorose	Période d'incubation
Temps pour que sporulation atteigne 5% de sporulation maximale	Période de latence
Surface sporulante finale (%)	Sévérité d'attaque
Temps pour que nécrose atteigne 50% de nécrose finale	Vitesse de développent
Vitesse de développent de la surface nécrosée	
Densité de pycnides	Capacité de sporulation
Nombre de spores / pycnide	

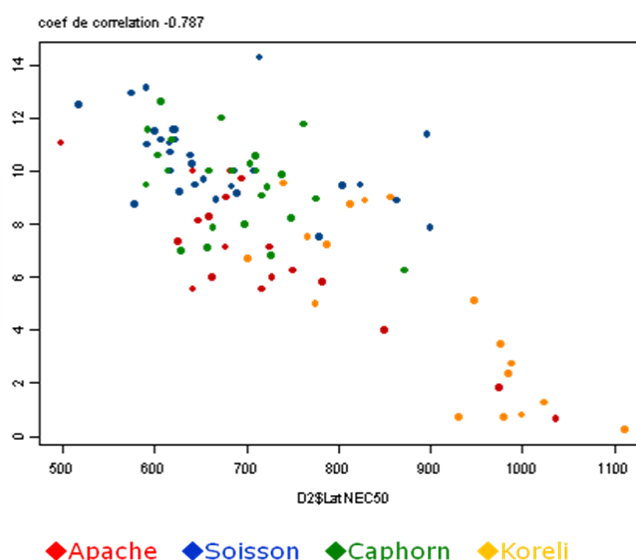
L'analyse des corrélations entre la quinzaine de variables épidémiologiques élaborées a permis de retenir un nombre plus restreint de variables comme composantes principales d'agressivité (Tableau 4). L'analyse en cours des résultats indique des interactions significatives entre souches et variétés pour plusieurs de ces paramètres, révélant de probables résistances partielles. Enfin, des corrélations positives entre composantes d'agressivité ont été mises en évidence. Par exemple, entre dynamique des symptômes et capacité de sporulation (Figure 2). De plus, aucune corrélation négative,

indicatrice de trade-offs entre composantes à l'échelle du monocycle infectieux, n'a été mise en évidence.

CONCLUSIONS

Une méthode expérimentale de caractérisation de la résistance partielle et des composantes d'agressivité a été mise au point pour la septoriose. Ce type de méthode a permis, sur rouille brune, de mieux comprendre les stratégies d'adaptation du pathogène et d'éclairer les questions de durabilité des résistances (Pariaud, 2008) : ces perspectives sont désormais ouvertes pour la septoriose, dont la capacité d'adaptation a été largement mise en évidence d'un point de vue génotypique, mais reste moins étudiée sur le plan de critères phénotypiques d'intérêt.

Figure 2 : Densité de pycnides en fonction du temps thermique (base 0°C) pour atteindre 50% de la surface nécrosée finale



IV. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DE LA RESISTANCE ADULTE AU CHAMP

Les résultats ont montré l'intérêt de caractériser plus précisément le déterminisme génétique de la résistance adulte du matériel élite français. La génétique d'association permet de contourner un certain nombre des problèmes de la détection de QTL classique (Flint-Garcia,

2005). En particulier, dans notre cas, les marqueurs moléculaires existant ont une faible valeur diagnostic sur le matériel français. La précision des études de génétique d'association est néanmoins dépendante de la taille de la population utilisée. Phénotyper, vis-à-vis de la septoriose au stade adulte une large population pose plusieurs problèmes. En contamination naturelle, la diversité génétique des souches présentes peut rendre difficile l'analyse du déterminisme génétique du comportement des variétés. Cela induit également la nécessaire prise en compte de covariables influençant la progression épidémique, comme la hauteur des plantes, leur précocité, et d'autres paramètres architecturaux (Arraiano, 2009). Nous nous sommes donc fixé comme objectif de développer un protocole expérimental sur un panel d'association, avec une contamination contrôlée. Nous avons testé diverses approches de phénotypage, en cherchant à obtenir un maximum de précision pour l'essai. Enfin, nous nous sommes imposé une contrainte de taille de parcelles suffisamment grandes pour être compatible avec des mesures d'élaboration du rendement, ouvrant la possibilité à une caractérisation de la tolérance (Bancal et al., 2012).

MATERIEL & METHODES

Deux cent douze variétés et lignées ont été implantées en microparcelles de 9 m² sur le site de Plélo (48.55°N, 2.93° E) dans un dispositif à 2 répétitions, organisées en 4 sous-blocs de précocité avec 4 témoins répétés 6 fois par bloc. L'essai a été inoculé avec la souche IPO98046, souche française possédant un large spectre de virulences (Ghaffary et al., 2008), à 3 dates, les 27/04/2011, 02/05/2011 et 05/05/2011, de façon à ce que l'ensemble des variétés reçoivent de l'inoculum alors que leur dernière feuille était largement déployée, à une dose de 10¹⁰ spores/m² avec un pulvérisateur agricole.

Le développement des symptômes de septoriose a été suivi depuis la veille de la 1^{ère} inoculation jusqu'à la sénescence complète du couvert, à intervalles d'environ une semaine, aboutissant à 8 dates d'observation. A chaque date, deux types de notations ont été réalisés. D'une part, une notation visuelle, réalisée par un seul opérateur durant toute la durée de l'expérimentation. D'autre part, le même jour, deux photos numériques par parcelle ont été réalisées. Le pourcentage de surface verte de chaque photo a été analysée à l'aide du logiciel SATVA (<http://www4.paca.inra.fr/emmah/Production-Documentation/Outils-et-modeles/SATVA>). Un indice de vert a ensuite été calculé à partir des photos pour chaque parcelle à chaque

$$IV_{photo} = \frac{\% \text{ Vert (t)} - \% \text{ Vert (final)}}{\% \text{ Vert (max)} - \% \text{ Vert (final)}}$$

date : . Les 2 types de notation ont ensuite été analysés directement, ou après calcul de l'aire sous la courbe (AUC). Parallèlement, à chaque date, 15 feuilles des 4 derniers étages foliaires ont été prélevées, scannées, et analysées (logiciel Scanarea : <http://www4.paca.inra.fr/emmah/Production-Documentation/Outils-et-modeles/SCANAREA>), pour 8 variétés, ceci afin de valider les résultats obtenus par les photos verticales. La date d'épiaison, ainsi que des notations visuelles de rouille brune et de rouille jaune ont également été réalisées. Enfin, 15 feuilles F1 ont également été prélevées à 3 dates pour analyse par PCR quantitative, une fois avant l'inoculation, et 2 fois ensuite.

Les corrélations entre différentes approches de phénotypage ont été analysées par calcul de régressions et de coefficients de corrélation de Wald et de Kendall. Les résultats ont ensuite été analysés par analyse de variance classique, en testant l'intégration de covariables comme les notes de rouille brune et rouille jaune. Puis, des classements ont été établis avec des comparaisons multiples via le package agricolae (de Mendiburu, 2010) du logiciel R. Ceci afin de comparer le nombre de groupes significativement différents obtenus suivant le type de mesure utilisée, et suivant le choix d'utiliser une seule date de notation ou d'utiliser la cinétique.

RESULTATS

La contamination a bien fonctionné, comme indiqué par les résultats de qPCR et le développement de la maladie, nettement plus important sur l'essai que sur un essai non-traité mais non-contaminé artificiellement présent sur le même site.

L'utilisation des données de scan a permis de valider l'indice de vert calculé avec les photos verticales. Ainsi, à une date donnée, la corrélation entre l'indice de vert obtenu par scan (moyenne pondérée des surfaces vertes des 4 étages foliaires) et celui obtenu par photo verticale est de 93%, et la corrélation entre les aires sous la courbe des 2 approches est de 83%. La corrélation entre les AUC obtenues avec les notations visuelles et l'indice photo est de 64%, validant également globalement l'approche. L'analyse des données de chaque date a permis de mieux comprendre les différences, et ainsi d'identifier les forces et faiblesses de chaque approche, que nous illustrons avec 2 exemples. Pour les variétés les plus tardives, malgré les 3 dates d'inoculation, la dernière feuille n'était pas encore entièrement déployée, et a donc reçu une moindre dose d'inoculum. La notation visuelle ayant été réalisée sur cet étage foliaire, elle a sous-estimé le niveau d'attaque. Au contraire, la photo intégrant l'ensemble des strates visibles (essentiellement les 3 étages les plus hauts), ce biais n'a pas existé. A contrario, sur les variétés les plus précoces et les plus résistantes, la sénescence due aux conditions hydriques difficiles a biaisé le résultat obtenu par photographie, alors que l'œil du notateur a pu le corriger lors de la notation visuelle.

Les analyses de variance sur les données d'AUC sont présentées ci-dessous (Tableau 5).

Mesure	Effet	ddl	F-value	Pr>F	CV résiduel	ETR
AUDPC_notations	Variétés	211	15.9251	<0.0001	0.0552	2538.40
	Bloc	1	9.4204	0.0024		
	Rouille Jaune	1	0.9785	0.3236		
	Rouille Brune	1	2.9508	0.0872		
	Bloc/Sous-bloc	6	4.1188	0.0006		
AUDPC_photo	Variétés	211	13.3548	<0.0001	0.0845	24.6439
	Bloc	1	30.9015	<0.0001		
	Rouille Jaune	1	6.0004	0.0150		
	Rouille Brune	1	7.8567	0.0055		
	Bloc/Sous-bloc	6	2.4510	0.0256		

Tableau 5 : Analyses de variance des données d'aire sous la courbe de surface verte avec les notations visuelles et photographiques (AUDPC – Aire sous la courbe ; ddl – Degrés de liberté ; F-value – Valeur de la statistique F ; Pr>F – Probabilité critique ; CV résiduel – Coefficient de variation résiduel ; ETR – Ecart type résiduel)

L'analyse de variance permet de calculer la moyenne ajustée de l'AUC en corrigeant pour les effets liés à la présence de rouille et aux gradients contrôlés par le dispositif. Ces valeurs ajustées permettent ensuite de classer les variétés en groupes homogènes, significativement différents entre eux. 86 groupes sont établis avec l'AUC des notations visuelles, et 93 avec l'AUC des indices photos. Le même type d'analyse a été effectué en utilisant comme variable phénotypique non pas l'AUC mais la valeur de la notation à une date ou à 2 dates. Dans ce cas, on n'arrive à établir qu'une trentaine de groupes différenciés. Ceci montre que la prise en compte de la cinétique complète de développement de la maladie apporte un gain important de précision à l'essai.

Les résultats de qPCR sont globalement corrélés aux résultats des notations photos et visuelles, mais ces corrélations ne sont que de l'ordre de 30% à 45%. Ceci montre que les 2

types de mesures peuvent apporter une information complémentaire. En effet, il est possible que les mécanismes de défense de la plante vis-à-vis de la croissance mycélienne et vis-à-vis du développement des symptômes soient différents : disposer de résistances ciblant ainsi des mécanismes différents pourrait être intéressant pour la durabilité des résistances. Il apparaît utile d'approfondir le lien entre ces deux phénomènes (Gouache et al., 2011 ; Bancal et al., 2012).

CONCLUSIONS

Il a été possible de réaliser un essai en contamination contrôlée au champ pour évaluer la résistance adulte. Le grand nombre de mesures effectuées, bien que coûteux, apporte un gain de précision conséquent, qui améliorera la puissance de détection en génétique d'association. L'utilisation de photos est actuellement plus coûteuse en terme de moyens humains qu'une notation visuelle classique, mais le développement d'outils haut débit pourrait changer cette donne. L'approche par appareil photo est par contre plus répétable que la notation visuelle. L'utilisation de la qPCR nous apparaît complémentaire des notations visuelles.

V. CONCLUSIONS GENERALES

Les variétés françaises contiennent peu de gènes Stb connus. En conséquence, leur introduction dans des programmes de sélection pourrait apporter un gain de résistance. Deux freins existent cependant. Premièrement, les marqueurs disponibles ont peu de valeur diagnostic. Nous avons néanmoins identifié les plus prometteurs d'entre eux, et des variétés élites françaises pouvant éventuellement servir de parents donneurs. Deuxièmement, il est nécessaire d'établir quels sont les gènes qui seront les plus efficaces parce qu'ils ne sont pas ou peu contournés sur le territoire français. Nos premiers résultats indiquent qu'il existe des isolats virulents sur tous les gènes Stb testés. Cependant, la fréquence des isolats virulents est très variable d'un gène à l'autre et certains gènes ne sont que rarement contournés. La combinaison de différents gènes Stb individuellement contournés semble également être une approche intéressante pour augmenter le niveau de résistance des variétés françaises de blé tendre.

L'autre conséquence de ce constat est que des approches de génétique d'association semblent particulièrement indiquées pour mieux valoriser les résistances existantes dans le matériel français. Nous avons mis au point un protocole expérimental qui a permis d'acquérir un jeu de données très précis pour réaliser ce type d'analyse. Un dispositif expérimental permettant de caractériser de nombreux paramètres de résistance quantitative et d'agressivité a également été mis au point, ouvrant la voie à une meilleure compréhension de la durabilité des résistances vis-à-vis de la septoriose. Enfin, la découverte de souches à très large spectre de virulence appelle à poursuivre la caractérisation et le suivi de telles souches.

REMERCIEMENTS

Les résultats présentés ici ont été obtenus grâce au soutien du GNIS, par le biais du projet FSOV 2008-H « Evaluation de la résistance du blé à la septoriose provoquée par *Mycosphaerella graminicola* ». La mise au point du panel de marqueurs microsatellites de *M. graminicola* a été mise en place en collaboration avec AS Walker, J Confais et A Gautier à l'UMR INRA-AgroParisTech BIOGER-CCP avec l'appui du département SPE de l'INRA, en collaboration avec les partenaires du projet FSOV. L'étude bio-informatique de la séquence d'IPO323 a été réalisée par C Crane (USDA-ARS). Lilian Gout (UMR INRA-AgroParisTech BIOGER-CCP) a participé à l'analyse de la caractérisation génotypique de la collection d'isolats français de *M. graminicola*. Nicolas Roperch et Georges Ingoat sont remerciés pour la conduite de l'essai de Plélo.

BIBLIOGRAPHIE

Arraiano, L.S., J.K.M. Brown. 2006. Identification of isolate-specific and partial resistance to *Septoria tritici* blotch in 238 European wheat cultivars and breeding lines. *Plant Pathology* 55: 726-738.

Arraiano, L.S., N. Balaam, P.M. Fenwick, C. Chapman, D. Feuerhelm, P. Howell, S.J. Smith, J.P. Widdowson, J.K.M. Brown. 2009. Contributions of disease resistance and escape to the control of *Septoria tritici* blotch of wheat. *Plant Pathology* 58: 910-922.

Bancal M.O., Bancal P., Bingham IJ., Foulkes J., Gouache D., Ney B., Paveley N., Smith J. 2012. Crop Architecture and Crop tolerance to biotic stresses - Mechanisms to limit crop losses. Epidemiology and Canopy Architecture Conference. Rennes, France. 1-5 Juillet 2012

Bernicot, MH. 2006. Décryptage des variétés cultivées. *Perspectives Agricoles* 323 : 48-51

Bockus, W.W., Z. Su, K.A. Garrett, B.S. Gill, J.P. Stack, A.K. Fritz, K.L. Roozeboom, T.J. Martin. 2007. Number of Experiments Needed to Determine Wheat Disease Phenotypes for Four Wheat Diseases. *Plant Disease* 91: 103-108.

Chen RS, Boeger JM and McDonald BA, 1994. Genetic stability in a population of a plant pathogenic fungus over time. *Molecular Ecology* 3, 209-218.

Cowger, C., M.E. Hoffer, and C.C. Mundt. 2000. Specific adaptation by *Mycosphaerella graminicola* to a resistant wheat cultivar. *Plant Pathology* 49:445-451.

Cowger, C. and Mundt, C.C. 2002. Aggressiveness of *Mycosphaerella graminicola* isolates from susceptible and partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology* 92: 624-630

Cuthbert, R.D. 2011. Molecular mapping of *Septoria tritici* blotch resistance in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). Thèse de doctorat. University of Manitoba. 149 pp.

de Mendiburu, F. 2010. agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.0-9. <http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>

El Chartouni L, Tisserant B, Siah A, Duyme F, Leducq JB, Deweer C, Fichter-Roisin C, Sanssené J, Durand R, Halama P, Reignault P. 2011. Genetic diversity and population structure in French populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Mycologia* 103: 764-774

Eyal, Z., M. B. Brown. 1976. A quantitative method for estimating density of *Septoria tritici* pycnidia on wheat leaves. *Phytopathology* 66: 11-14.

Flint-Garcia, S.A., A.-C. Thuillet, J. Yu, G. Pressoir, S.M. Romero, S.E. Mitchell, J. Doebley, S. Kresovich, M.M. Goodman, E.S. Buckler. 2005. Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. *The Plant Journal* 44: 1054-64.

Ghaffary, S.M.T. 2011. Efficacy and mapping of resistance to *Mycosphaerella graminicola* in wheat. Thèse de doctorat. Wageningen University. 241 pp.

Ghaffary S.M.T., van der Lee T.A.J., Verstappen E.C.P., Kema G.H.J. (2008) Screening for resistance to *Septoria tritici* blotch, the major wheat disease in Western Europe. 7th international *Mycosphaerella* and *Stagonospora* symposium, 18–22 August, Ascona, Switzerland

Ghaffary, S.M.T., O. Robert, V. Laurent, P. Lonnet, E. Margalé, T.A.J. van der Lee, R.G.F. Visser, G.H.J. Kema. 2011. Genetic analysis of resistance to *Septoria tritici* blotch in the French winter wheat cultivars Balance and Apache. *Theoretical and Applied Genetics* 123: 741-754

Ghaffary, S.M.T., J.D. Faris, T.L. Friesen, R.G.F. Visser, T.A.J. van der Lee, O. Robert, G.H.J. Kema. 2012. New broad-spectrum resistance to septoria tritici blotch derived from synthetic hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 124: 125-42

Goodwin, S.B. 2007. Back to basics and beyond: increasing the level of resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. *Australasian Plant Pathology* 36: 532-538.

Goodwin, S.B., T.A.J. van der Lee, J.R. Cavaletto, B. te Lintel Hekkert, C.F. Crane, G.H.J. Kema. 2007. Identification and genetic mapping of highly polymorphic microsatellite loci from an EST database of the septoria tritici blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology* 44: 398-414.

Goodwin, S.B., S. Ben M'Barek, B. Dhillon, A.H.J. Wittenberg, C.F. Crane, et al. 2011. Finished Genome of the Fungal Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola* Reveals Dispensome Structure , Chromosome Plasticity , and Stealth Pathogenesis. *PLoS Genetics* 7: 1-17.

Gouache D., B. Andrieu, M-O. Bancal, P. Bancal, M. Chelle, C. Fournier, C. Robert, B. Ney 2009. Modélisation des interactions épidémies-couvert végétal : de la recherche à la mise au point d'outils opérationnels pour la protection intégrée des cultures. AFPP. 9ème conférence Internationale sur les maladies et les plantes – Tours.

Gouache D., S Thepot, C Roisin-Fichter, S Selim 2011. Exploring quantitative relationships between mycelial growth and visual symptoms of *Septoria tritici*. 8th International Symposium on *Mycosphaerella* and *Stagonospora* Diseases of cereals 11-14 Sept. 2011. Mexico City, Mexico.

Gough, F. J. 1978. Effect of wheat host cultivars on pycnidiospore production by *Septoria tritici*. *Phytopathology* 68: 1343-1345.

Jorgensen L.N., M. Jahn, W. Clark, D. Antichi, T. Goral, H. Schepers, P. Lucas, B. Rolland, D. Gouache, L. Hornok, 2008. Endure Wheat Case Report.

Kema, G.H.J., C.H. van Silfhout. 1997. Genetic Variation for Virulence and Resistance in the Wheat-*Mycosphaerella graminicola* Pathosystem III . Comparative Seedling and Adult Plant Experiments. *Phytopathology* 87: 266-272.

Linde, C.C., J. Zhan, and B.A. McDonald. 2002. Population Structure of *Mycosphaerella graminicola* : From Lesions to Continents. *Phytopathology* 92: 946–955.

Lovell, D.J., T. Hunter, S.J. Powers, S.R. Parker, F.V.D. Bosch. 2004. Effect of temperature on latent period of septoria leaf blotch on winter wheat under outdoor conditions. *Plant Pathology* 53: 170 -181.

McDonald, B.A., Mundt, C.C. and Chen, R.S. 1996. The role of selection on the genetic structure of pathogen populations: Evidence from field experiments with *Mycosphaerella graminicola* on wheat. *Euphytica* 92: 73-86

McDonald, B.A. 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* 87: 448-453

Mundt CC, Hoffer ME, Ahmed HU, Coakley SM, DiLeone JA, Cowger C, 1999. Population genetics and host resistance. In : Lucas JA, Bowyer P, Anderson AM, eds. *Septoria on Cereals : A study of Pathosystems*. Wallingford, UK : CAB International, 115-130.

Owen, P.G., Pei, M., Karp, A., Royle, D.J., Edwards, K.J., 1998. Isolation and characterization of microsatellite loci in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Ecology* 7: 1611–1612.

Pariaud, B. 2008. Agressivité de *Puccinia triticina* (agent de la rouille brune du blé) et son adaptation à l'hôte. Thèse de doctorat. Université Paris-Sud 11. 202 pp.

van Ginkel M., S. Rajaram, 1999. Breeding for Resistance to the Septoria/Stagonospora Blights of Wheat. In: van Ginkel, M., A. McNab, and J. Krupinsky, eds. 1999. *Septoria and Stagonospora Diseases of Cereals: A Compilation of Global Research*. Mexico, D.F.: CIMMYT.

van Ginkel, M., Scharen, A.L., 1987. Generation mean analysis and heritabilities of resistance to *Septoria tritici* in durum wheat. *Phytopathology* 77: 1629-1633.

Viljanen-Rollinson, S.L.H., M.V. Marroni, R.C. Butler, Y. Deng, T. Armour. 2005. Latent periods of *Septoria tritici* blotch on ten cultivars of wheat. *New Zealand Plant Protection* 260: 256-260.

Waalwijk, C., Mendes, O., Verstappen, E.C.P., de Waard, M.A., Kema, G.H.J. 2002. Isolation and Characterization of the Mating-Type Idiomorphs from the Wheat Septoria Leaf Blotch Fungus *Mycosphaerella graminicola*, *Fungal Genetics and Biology* 35, 277-286

Zhan, J., G.H.J. Kema, C. Waalwijk, and B.A. McDonald. 2002. Distribution of mating type alleles in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* over spatial scales from lesions to continents. *Fungal Genetics and Biology* 36:128–136.

Zhan, J., Pettway, R.E. and McDonald, B.A. 2003. The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. *Fungal Genetics and Biology* 38: 286-297