



Les marqueurs moléculaires comme outils dans la sélection des céréales

O. MOULLET, D. FOSSATI, F. MASCHER et A. SCHORI, Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil ACW, CP 1012, 1260 Nyon
R. GUADAGNUOLO, Laboratoire de botanique évolutive, Institut de biologie, Université de Neuchâtel, rue Emile Argand 11, 2009 Neuchâtel

@ E-mail: odile.moulet@acw.admin.ch
Tél. (+41) 22 36 34 724.

Résumé

Les récents développements du génie génétique et des biotechnologies constituent de nouvelles approches pour améliorer les stratégies de sélection. Les marqueurs moléculaires permettent d'établir des cartes génétiques qui consistent à ordonner les marqueurs le long du génome. De telles cartes représentent une base pour identifier et localiser des gènes et des QTL (*Quantitative Trait Loci*) d'intérêt agronomique, dans le but d'améliorer les variétés par le biais de la sélection assistée par marqueurs (SAM). Cette technologie permet de sélectionner des individus dès le stade de jeunes plantules et ne nécessite pas l'observation du phénotype. Les marqueurs moléculaires présentent un grand intérêt lors de l'accumulation de plusieurs gènes de résistance contre une maladie dans une même variété en vue d'une résistance plus durable. Cet article présente la «pyramidalisation» à l'aide de la SAM de deux gènes de résistance contre la rouille brune du blé, Lr9 et Lr24.

industriels, des instituts de recherche et des organismes de formation publics et privés, inscrit comme l'un de ses objectifs principaux de «créer le chaînon manquant entre génomique et sélection». Des projets similaires ont débuté ces dernières années dans d'autres pays d'Europe ainsi qu'au Canada, en Inde et en Chine, par exemple.

Dans le programme de sélection des céréales de la Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil ACW, l'utilisation des marqueurs a débuté pour optimiser la méthode d'analyse des lignées issues du projet de «pyramidalisation» de deux gènes de résistance à la rouille brune et les QTL de résistance aux maladies du grain et de l'épi (fusariose et septoriose).

Introduction

En sélection classique, chaque lignée est examinée à travers son aspect phénotypique, soit la résultante de l'expression de ses gènes dans un milieu donné. Ces observations se faisant dans des conditions d'interaction entre le génotype et le milieu, il est important pour le sélectionneur de connaître l'aspect purement génétique du caractère étudié, indépendamment de son expression. A cet effet, de nombreux marqueurs biochimiques ou moléculaires ont été développés pour le blé depuis une vingtaine d'années. Cependant, un saut technologique est nécessaire pour valoriser les acquis sur les connaissances individuelles des gènes lors de leur intégration dans les schémas de sélection. Dans la sélection des céréales,

l'utilisation de marqueurs moléculaires est encore limitée mais plusieurs projets cherchent à développer une méthodologie de sélection assistée par marqueurs (SAM) adaptée aux programmes d'amélioration des plantes. C'est en Australie, sous l'impulsion du GRDC, que l'essor de cette technologie a été le plus rapide. Par exemple, des marqueurs moléculaires y sont utilisés en routine pour la détection de lignées résistantes aux nématodes. Aux Etats-Unis, l'USDA a créé quatre centres de génotypage qui ont commencé leurs travaux en 2005. Ces centres doivent établir un protocole de SAM pour l'orge et le blé, la résistance à la fusariose ayant été adoptée pour une étude pilote. En France, «Céréales Vallée», une nouvelle association fondée en décembre 2005, regroupant des

Marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires sont constitués de séquences d'ADN caractéristiques d'un individu ou groupe d'individus. Contrairement aux marqueurs traditionnels (morphologiques et biochimiques), ils ne sont pas influencés par l'environnement et sont observables à n'importe quel stade de développement de la plante et sur n'importe quel organe. Ils sont très utiles pour l'identification individuelle, variétale, l'établissement de relations phylogénétiques et la sélection assistée par marqueurs. Ils permettent l'élaboration de cartes génétiques où chaque chromosome est représenté sous forme d'un ensemble de marqueurs moléculaires dont l'ordre et l'espacement sont déterminés en com-

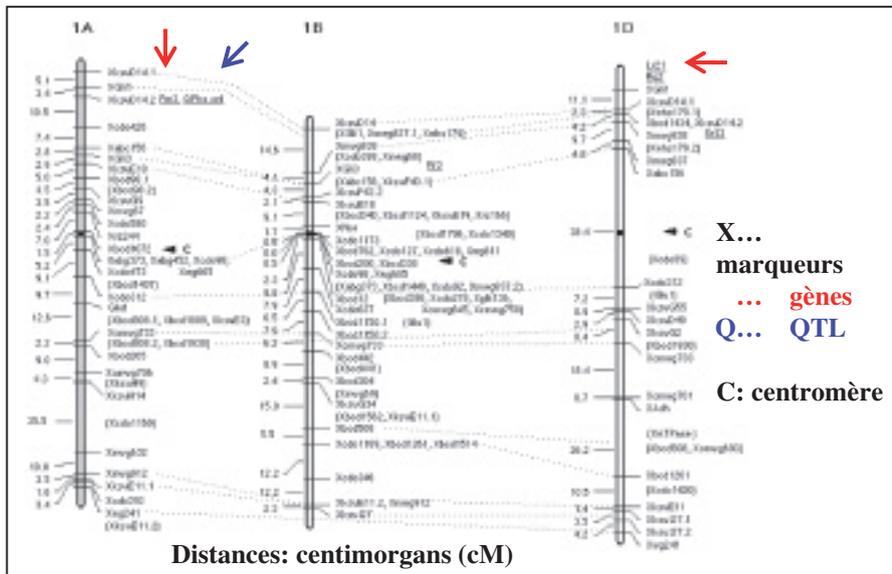


Fig. 1. Exemple de carte génétique du chromosome 1 du blé (*Triticum aestivum*).

parant les individus de la descendance d'un croisement (fig.1).

Certains caractères sont gouvernés par l'action d'un seul gène et sont dits de type «qualitatifs» (présence ou absence). Les caractères de ce type sont transmis de façon simple à la descendance d'un croisement puisqu'il suffit que le gène responsable soit transmis à une descendance pour que celle-ci ait le caractère désiré. Même si la séquence d'un gène responsable d'un phénotype intéressant n'est pas connue, ce gène peut être localisé sur une carte génétique et entouré de marqueurs moléculaires. A l'opposé, d'autres caractères correspondent à la combinaison de l'action de plusieurs gènes et sont dits «quantitatifs»: le rendement ou la hauteur des individus par exemple peuvent ainsi prendre toutes les valeurs entre deux extrêmes. Les régions chromosomiques impliquées dans ces caractères quantitatifs (QTL: *Quantitative Trait Loci*) peuvent être localisées sur une carte génétique à l'aide de méthodes statistiques, et repérées par des marqueurs moléculaires. Ce travail est réalisé en étudiant la correspondance dans la descendance d'un croisement entre les caractères phénotypiques observés et la présence des marqueurs moléculaires associés. Lorsque les QTL sont identifiés, le sélectionneur peut repérer les plantes intéressantes dans la descendance d'un croisement en se basant sur la présence des marqueurs moléculaires proches des gènes contrôlant les caractères recherchés.

Grâce aux marqueurs génétiques, il devient possible d'une part d'établir l'empreinte génétique d'un individu, c'est-à-dire de décrire et définir des individus et des variétés en vue de leur

inscription, de leur protection et de leur classification, d'autre part de mettre en évidence et suivre des gènes impliqués dans l'expression de caractères d'intérêt agronomique ou technologique. Cela s'est traduit plus récemment par l'intégration des biotechnologies dans les programmes de sélection. C'est un outil supplémentaire à la disposition du sélectionneur pour repousser certaines limites rencontrées par les voies classiques de l'amélioration des plantes.

Sélection assistée par marqueurs (SAM)

La SAM est basée sur la possibilité de détecter la présence d'un gène ou d'une caractéristique agronomique intéressante par la recherche du marqueur qui lui est étroitement lié. Les perspectives d'application des marqueurs moléculaires en sélection sont

nombreuses. La SAM est non destructive, elle nécessite peu de tissu végétal et elle n'est pas influencée par des facteurs environnementaux. Ce type de sélection est particulièrement avantageux lorsque le caractère étudié est difficile, coûteux à évaluer ou influencé par les conditions climatiques ou pédologiques (résistance au stress hydrique, tolérance à l'aluminium, résistance à la germination sur pied, etc.). Le sélectionneur doit fréquemment anticiper les problèmes, par exemple en améliorant la résistance contre des maladies dans des régions où le pathogène n'existe pas encore. Dans un tel cas, comme la propagation artificielle du pathogène est proscrite, la SAM est incontournable.

L'amélioration des plantes repose sur deux éléments essentiels, d'une part disposer de larges ressources génétiques et d'autre part sélectionner les rares combinaisons appropriées dans le but d'apporter l'amélioration recherchée. Les marqueurs permettent d'évaluer et de structurer ces ressources génétiques (*core-collections*) en identifiant un nombre limité de variétés représentatives de la totalité de la collection. Ces *core-collections* permettent d'optimiser le choix des géniteurs en sélectionnant les cultivars possédant des allèles favorables complémentaires.

La SAM présente encore un grand intérêt dans les programmes d'introgression destinés à modifier de manière ciblée un matériel génétique existant, en remplaçant un segment chromosomique initial par un segment porteur de caractéristiques favorables provenant d'un autre matériel (fig. 2). Cette approche suppose de croiser deux lignées, l'une considérée comme le parent donneur, l'autre comme le parent receveur, puis d'éliminer progressivement par rétro-croisements successifs (*back-cross*) le génome du parent

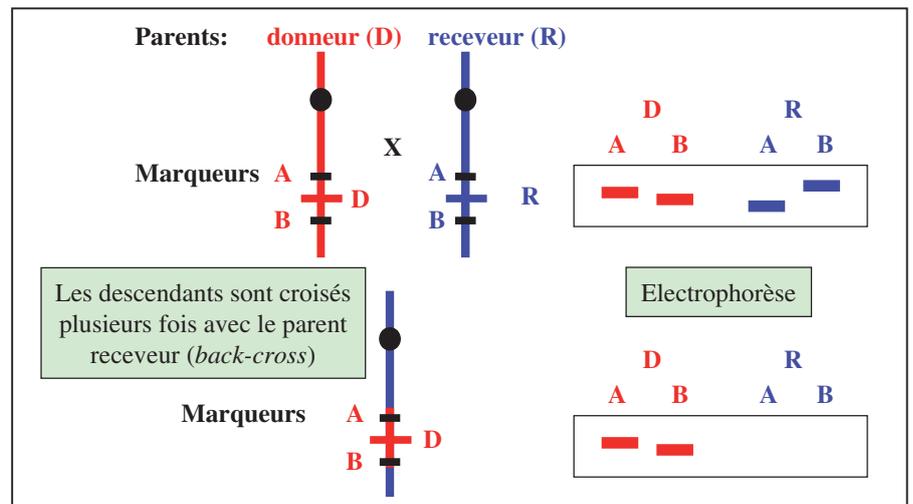


Fig. 2. Schéma d'introgression du gène D provenant du parent donneur dans le génome de la plante receveuse à l'aide des marqueurs A et B visualisés par électrophorèse.

donneur, tout en conservant de façon ciblée le segment d'intérêt. Les plantes porteuses des allèles favorables peuvent être identifiées à l'aide de marqueurs. La SAM peut également aider à accumuler dans une plante des gènes de résistance complémentaires pour une même maladie, de façon à obtenir une résistance multigénique qui sera potentiellement plus stable car plus difficile à contourner par le pathogène. Le phénotype seul ne permet pas de différencier les individus cumulant deux ou plusieurs résistances de ceux qui n'en possèdent qu'une, rendant le recours aux marqueurs indispensable. La SAM a cependant ses limites. Comparée aux méthodes de sélection traditionnelles, cette nouvelle technologie n'est pas compétitive en termes de coût et de temps lorsque le phénotype peut être déterminé facilement (hauteurs des plantes, précocité, résistance à certaines maladies...). Par ailleurs, pour la sélection de caractéristiques agronomiques à déterminisme génétique complexe, comme le rendement par exemple, gouvernées par un grand nombre de gènes ou de QTL qui interagissent et dont la plupart sont encore inconnus, la SAM est actuellement un outil inefficace.

Marqueurs moléculaires dans le blé

Le blé tendre est une espèce hexaploïde (*Triticum aestivum*, $2n = 42$, AABBDD) créée lors de la domestication, il y a environ 10 000 ans, d'un hybride entre un blé tétraploïde (AABB) et *Aegilops tauschii* apportant le génome D. La taille du génome de blé est estimée à environ 17 000 millions de bases (Mb); chacun des 21 chromosomes a une taille supérieure au génome entier du riz. Une cellule de blé contient approximativement cinq fois plus d'ADN qu'une cellule humaine. Bien que nos connaissances sur cette espèce soient moins avancées que sur les plantes modèles (arabette, riz), principalement à cause de la taille de son génome, de nombreuses populations ont été cartographiées. La carte de référence, «ITMI map» (fig.1), comporte plus de 1500 marqueurs et la carte composite, plus de 3700. Une quantité importante d'informations moléculaires est disponible gratuitement sur le site GrainGenes (<http://www.graingenes.org>) pour le blé, l'orge, le seigle et l'avoine. Le développement considérable des marqueurs moléculaires au cours de la dernière décennie a permis une meilleure compréhension du génome des céréales et la cartographie de plusieurs dizaines de locus liés à divers gènes ou QTL d'intérêt agronomique.

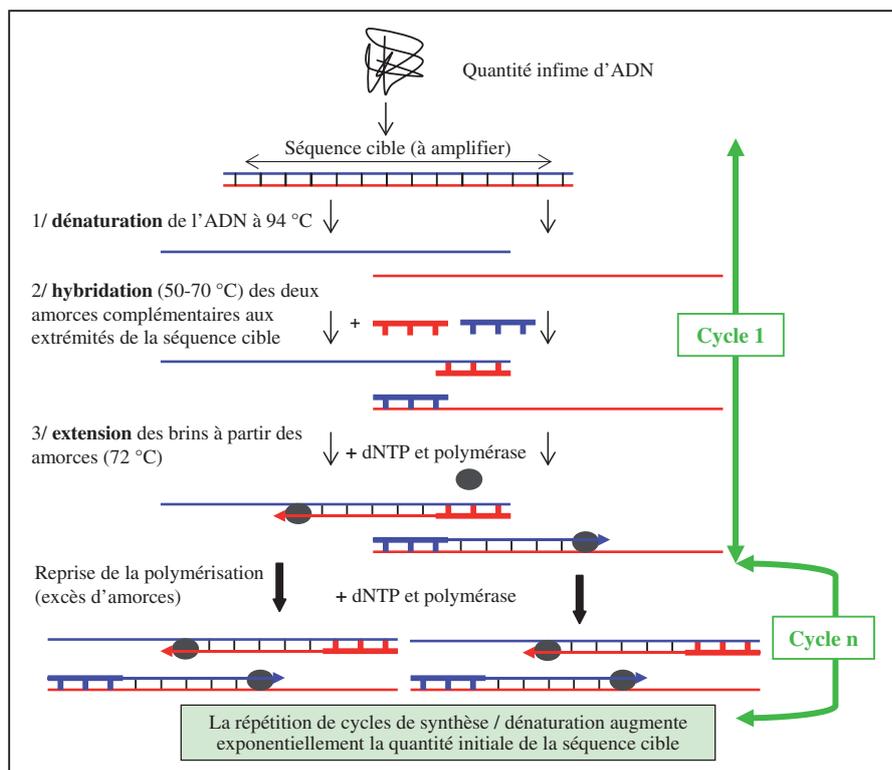


Fig. 3. Schéma représentant les diverses étapes de la réaction en chaîne de polymérisation de l'ADN (PCR).

Techniques de marquage moléculaire

Ces techniques sont nombreuses et évoluent rapidement. La plupart du temps, des polymorphismes de séquence sont révélés au sein d'un fragment d'ADN amplifié par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) à partir de l'ADN génomique total de l'individu à analyser, à l'aide d'une paire d'amorceurs spécifiques des extrémités de la région à étudier. La PCR, ou réaction en chaîne de polymérisation de l'ADN (fig. 3), est basée sur l'utilisation d'une enzyme ADN polymérase thermorésistante. Un très

grand nombre de copies d'un fragment d'ADN est synthétisé si l'enzyme dispose de petits morceaux d'ADN simple brin (amorceurs) complémentaires des deux extrémités de la séquence que l'on veut copier. La réaction est rendue cyclique grâce à des variations de température, et chaque brin néoformé peut servir de matrice pour la synthèse au cycle suivant. L'amplification de cette séquence est donc exponentielle. Les marqueurs PCR le plus largement utilisés sont les microsatellites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*). Ils sont constitués de séquences de di-, tri- ou tétra-nucléotides répétés en tandem (fig. 4).

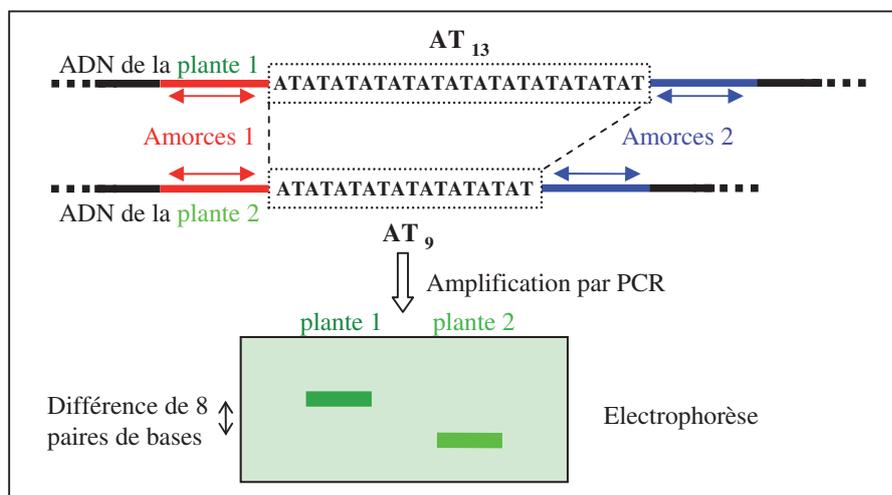


Fig. 4. Exemple d'un marqueur de type microsatellite (SSR).

Ces éléments sont uniformément répartis sur l'ensemble du génome d'une espèce et présentent un taux de polymorphisme élevé. Ce polymorphisme repose sur la variation du nombre d'unités de répétitions constituant le microsatellite. Les séquences bordant ces éléments répétés permettent de définir les amorces pour l'amplification par PCR. La taille des produits amplifiés est estimée par électrophorèse sur gel d'agarose ou d'acrylamide.

Méthodologie et coût

Des marqueurs PCR de type SSR ont été choisis pour des applications de SAM à Changins, en raison de leur simplicité d'exécution et de leur coût réduit. L'utilisation de ces marqueurs dans notre programme de sélection des céréales implique plusieurs étapes: (I) récolte de l'échantillon, (II) extraction et quantification d'ADN, (III) amplification par PCR avec diverses amorces spécifiques et (IV) séparation électrophorétique des fragments obtenus. Le coût de la SAM est un facteur déterminant lorsque cette technique est appliquée à grande échelle.

Récolte des échantillons

Les feuilles encore vertes sont le matériel végétal dont l'ADN est le plus facilement extractible. Elles sont prélevées dans diverses populations semées au champ et utilisées comme matériel de départ dans nos analyses de marqueurs. Chaque plante analysée doit être ultérieurement identifiable afin de pouvoir corréler les résultats de la PCR à une plante spécifique au champ (fig. 5). Les individus qui présentent des caractéristiques intéressantes étant sélectionnés juste avant la récolte (fig. 6), le marquage des plantes doit rester visible plusieurs mois après la prise de l'échantillon.



Fig. 5. Etiquetage des plantes sur lesquelles un fragment de feuille sera récolté et analysé afin de déterminer le génotype de chacune d'elles.



Fig. 6. Identification au champ des plantes présentant les caractéristiques génétiques de résistance à la fusariose.

Extraction et quantification de l'ADN

Les critères déterminant le choix de la méthode d'extraction sont la qualité de l'ADN purifié, la reproductibilité de la méthode avec diverses quantités de matériel d'âge et de conditions physiologiques différents, la rapidité d'exécution et le coût de cette méthode.

Après le broyage du matériel végétal, les noyaux des cellules sont décantés par centrifugation. La lyse des membranes nucléaires et la dénaturation des protéines associées à l'ADN par un détergent libèrent l'acide nucléique qui est alors précipité en longs filaments dans une solution alcoolisée. Cet ADN est solubilisé dans un tampon aqueux et quantifié par une mesure de la densité optique. A partir d'environ 2 g de feuilles, on extrait approximativement 30 à 50 μ g d'ADN, quantité suffisante pour réaliser plus de 1000 analyses par PCR.

Amplification par PCR

Le mélange réactionnel, d'un volume final de 10 μ l, comprend, en plus des cofacteurs nécessaires à la *Taq polymérase*, deux ou quatre amorces spécifiques et 50 ng d'ADN. Un thermocycleur automatise les changements de température nécessaires aux diverses étapes de dénaturation, d'hybridation des amorces et de polymérisation (fig. 3).

Séparation électrophorétique des fragments d'ADN

Dans de nombreux laboratoires, la détection des fragments SSR amplifiés par PCR est réalisée sur gel de poly-

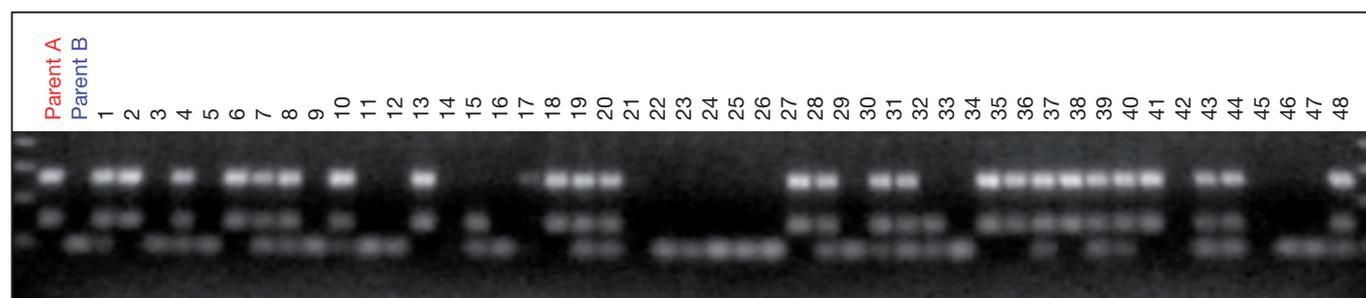


Fig. 7. Exemple de gel d'agarose permettant la visualisation de fragment d'ADN de blé amplifié par PCR à partir des descendants (1 à 48) issus d'un croisement entre les parents A et B. Dans la région du chromosome 3B analysée, les plantes 2, 3 et 4 sont respectivement homozygote pour l'allèle du parent A, homozygote pour l'allèle du parent B et hétérozygote.

acrylamide à l'aide d'un système à capillaire ou d'un appareil, le LI-COR. Ce type d'appareil permet de séparer des fragments dont la taille diffère d'une paire de bases seulement. Le gel d'agarose standard (2%) a été préféré comme moyen de détection, bien que ce type de gel ne permette pas de différencier deux fragments dont la taille diffère de moins de cinq paires de bases (fig. 7). Deux raisons ont guidé ce choix: le coût et la quantité de travail nécessaire pour analyser une centaine d'échantillons.

Coût

Les méthodes classiques de sélection par le phénotype qui combinent un criblage visuel à une analyse statistique sont généralement très efficaces et peu coûteuses pour un grand nombre des caractères recherchés. Toutefois, certains critères de sélection sont difficilement mesurables par le phénotype seulement et, dans ces cas-là, la SAM s'avère une méthode complémentaire essentielle. Cependant, les coûts occasionnés par cette nouvelle stratégie de sélection doivent être en relation avec l'importance agronomique du caractère étudié. Dans nos conditions expérimentales, l'analyse de 1000 échantillons est évaluée à CHF 822.- et peut être réalisée par une personne en quatorze jours environ. Comme, pour le blé, de très nombreux marqueurs liés à des gènes (ou QTL) d'intérêt agronomique sont disponibles, le coût initial du dévelop-

pement des marqueurs, souvent financé par le secteur public, n'est pas pris en compte. Le coût des travaux au champ (labour, semis, traitements, etc.) est également omis puisque la SAM n'implique aucune dépense supplémentaire dans ce domaine.

«Pyramidalisation» des gènes Lr9 et Lr24

Ces gènes de résistance à la rouille brune ont été introgressés dans le blé à partir d'espèces sauvages apparentées, Lr9 provenant de *Aegilops umbellulata* (égilope) et Lr24 d'*Agropyron elongatum* (chiendent). Après plusieurs rétrocroisements successifs, ces résistances ont ensuite été introduites en utilisant le cultivar Arina, variété suisse à succès présentant un bon niveau qualitatif, comme variété receveuse. Afin d'accroître la durabilité de la résistance à la rouille brune, un projet, ayant pour but d'accumuler dans un même génome ces deux gènes de résistance, a débuté en 1996 sur le site de Reckenholz d'Agroscope ART (Valenghi, 1998; Rügger, 2000). Les lignées contenant Lr9 ont été croisées avec celles possédant Lr24. Les trois progénitures obtenues, hétérozygotes Lr9- Lr24-, ont été croisées avec quatre variétés d'élite, engendrant douze populations, soit 1200 plantes (F1). Plus de 400 familles F2 qui ne possédaient ni Lr9 ni Lr24 ont été éliminées grâce à leur phénotype (sen-

sible à la rouille brune). Le marquage moléculaire par PCR des 765 familles restantes (Guadagnuolo, 2000), à l'aide de deux amorces spécifiques pour Lr9 (Schachermayer *et al.*, 1994) et quatre autres pour Lr24 (Schachermayer *et al.*, 1995; Dedryver *et al.*, 1996), montre que 194 familles contiennent les deux gènes de résistance. Le degré d'homozygotie de ces gènes est inconnu. Par la suite, ce matériel a été sélectionné durant huit ans de manière traditionnelle. Une fixité suffisante de ces lignées est difficile à obtenir. Le génotype des trente familles restantes a été déterminé une nouvelle fois en utilisant les mêmes marqueurs. Dix d'entre elles ne contiennent ni Lr9 ni Lr24, quatre possèdent le gène Lr9, dix le gène Lr24 et six les deux gènes. Ces lignées ont été semées à Changins (trois répétitions) et l'infection naturelle de rouille brune a été quantifiée (fig. 8). Depuis l'an passé, une nouvelle race de rouille brune venant d'Espagne a décimé une grande partie des pépinières de blé. Les cultivars contenant Lr9 et ceux portant le gène Lr24 résistent à cette souche. La présence des deux gènes Lr9 et Lr24 dans une même lignée protège également la plante de manière efficace. L'effet de la «pyramidalisation» des gènes sur la durabilité de la résistance nécessite une longue observation de ces lignées. Ce matériel possédant deux gènes de résistance ne représente qu'une étape, il peut être utilisé pour un cumul d'autres gènes de résistance à la rouille brune.

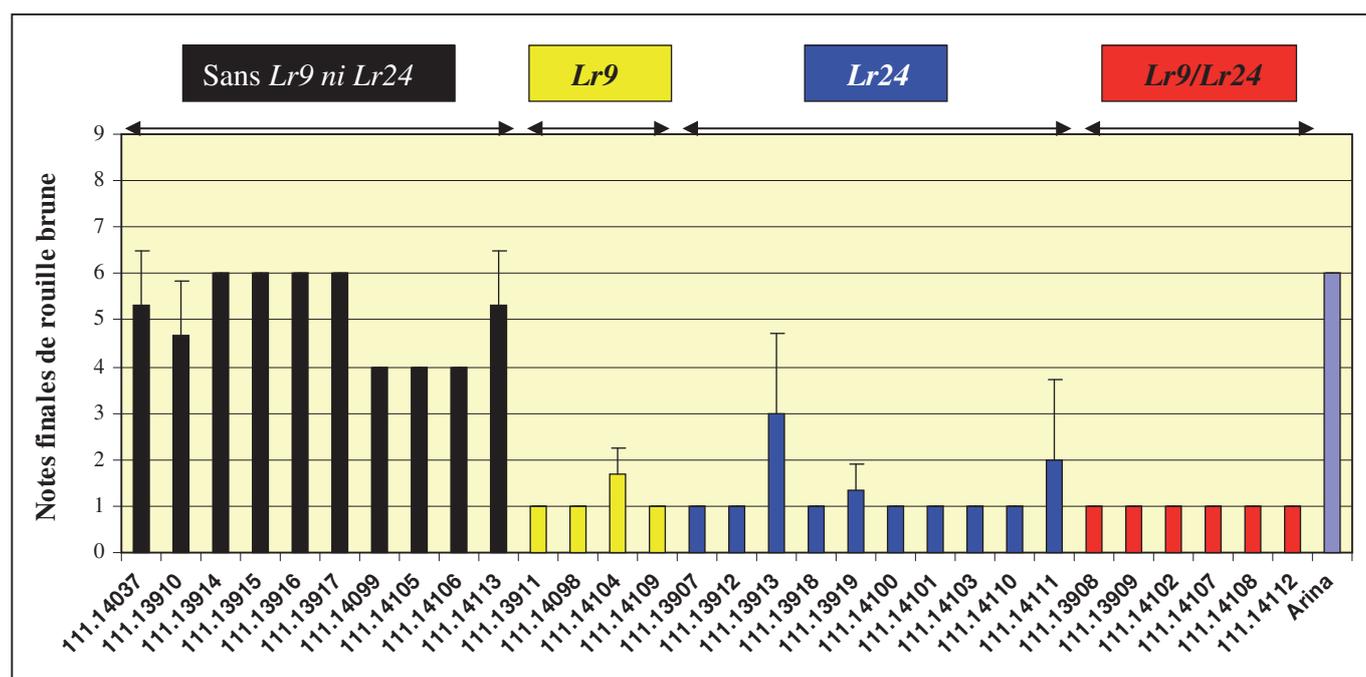


Fig. 8. Evaluation de la résistance à la rouille brune (notes de 1 à 9) de lignées de blé dérivées du projet de pyramidalisation des gènes de résistance Lr9 et Lr24 (note 1: aucun symptôme; note 9: feuilles couvertes de symptômes).

Conclusions

- L'intégration des biotechnologies dans nos programmes de sélection nécessite plusieurs étapes:
 - La mise au point d'une méthodologie fiable, reproductible et peu onéreuse d'utilisation des marqueurs, adaptée aux programmes de sélection suisse.
 - L'évaluation des marqueurs disponibles liés à divers gènes de résistance ou de qualité et leur détection dans les génotypes potentiels.
 - L'utilisation de ces marqueurs comme outils de sélection.
- Plusieurs axes de recherche intégrés à nos programmes de sélection ont été retenus. Des marqueurs seront utilisés pour améliorer la résistance des blés aux maladies fongiques (fusariose et septoriose) et les qualités organoleptiques de la fève de soja.

Bibliographie

- Dedryver F., Jubier M.-F., Thouvenin J. & Goyeau H., 1996. Molecular markers linked to the leaf rust resistance gene Lr24 in different wheat cultivars. *Genome* **39**, 830-835.
- Guadagnuolo R., 2000. Utilisation de marqueurs moléculaires (PCR) pour la détection de deux gènes de résistance à la rouille brune du blé (non publié).
- Rüegger A., 2000. Feldbesichtigt anerkannte Saatgutflächen 1999. *Agrarforschung* **7**, 36-39.
- Schachermayer G., Siedler H., Gale M., Winzeler H., Winzeler M. & Keller B., 1994. Identification and localization of molecular markers linked to the Lr9 leaf rust resistance gene of wheat. *Theor. Appl. Genet.* **88**, 110-115.
- Schachermayer G., Messmer M., Feuillet C., Winzeler H., Winzeler M. & Keller B., 1994. Identification of molecular markers linked to the *Agropyron elongatum*-derived leaf rust resistance gene Lr24 in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **90**, 982-990.
- Valenghi D., 1998. Saatgut-Feldbesichtigungen 1998. *Agrarforschung* **5**, 503-506.

Summary

Molecular markers as tools in cereals breeding

The development in recent years of genetic engineering and biotechnologies provides new approaches to improve the efficiency of breeding strategies. Molecular markers could be used to construct genetic maps consisting of ordering molecular markers across the genome. Such maps represent a framework, which enable the identification and localisation of Quantitative Trait Loci (QTLs) for traits of agronomical interest with the final aim of achieving genetic improvement through marker-assisted selection (MAS). This new technology can select individual plants from the seedling stage without the expression of the phenotype. Molecular markers are essential tools in breeding for accumulation of several disease resistance genes in a single variety for more durable resistance. The MAS «pyramidalisation» of two leaf rust resistance genes, Lr9 and Lr24, is presented.

Key words: molecular marker, PCR, MAS, wheat, leaf rust, Switzerland.

Zusammenfassung

Die molekularen Marker als Werkzeug in der Getreidezucht

Die Entwicklungen der letzten Jahre in der Gentechnologie und der Biotechnologie bilden neue Ansätze, um die Zuchtstrategien zu verbessern. Die molekularen Marker ermöglichen das Anlegen genetischer Karten, welche die Marker entlang des Genoms anzuordnen. Solche Karten stellen die Basis dar, welche Identifikation und Lokalisation von Genen und QTL (*Quantitative Trait Loci*) für Merkmale von agronomischem Interesse ermöglichen. Dies erlaubt die genetische Verbesserung durch die Marker gestützte Züchtung (SAM). Diese neue Technologie kann Einzelpflanzen ab dem Jugendstadium selektieren und ist unabhängig vom Phänotyp. Molekulare Marker sind von grossem Interesse bei der Anhäufung von Resistenzgenen gegen eine Krankheit in derselben Sorte im Hinblick auf eine dauerhafte Resistenz. Dieser Artikel stellt die «Pyramidalisation» mit Hilfe von SAM von zwei Resistenzgenen gegen Braunrost des Weizens, Lr9 und Lr24 vor.

Riassunto

I marcatori molecolari come strumenti nella selezione dei cereali

Gli sviluppi recenti nel campo dell'ingegneria genetica e delle biotecnologie permettono nuovi approcci per migliorare le strategie di selezione. I marcatori molecolari permettono la produzione di carte genetiche, che situano a loro volta questi marcatori sull'insieme del genoma. Tali carte sono la base che permette l'identificazione e la localizzazione di geni e di QTL (*Quantitative Trait Loci*) d'interesse agronomico, il cui scopo è di migliorare la selezione assistita da marcatori (SAM). Questa tecnica permette di selezionare gli individui più promettenti già allo stadio di giovani pianticelle, senza dover attendere il loro completo sviluppo e senza doverne osservare il fenotipo. L'interesse per i marcatori molecolari è particolarmente grande se si desidera accumulare in una varietà specifica diversi geni di resistenza ad una malattia, allo scopo ultimo di ottenere una resistenza più duratura. In questo articolo, presentiamo il caso dell'uso della SAM per la «piramidizzazione» di due geni di resistenza alla ruggine delle foglie del frumento, Lr9 e Lr24.