

Mesurer le niveau de résistance quantitative des variétés de tournesol face au mildiou dans les processus de sélection et d'évaluation variétale : un enjeu fort pour la gestion durable du risque

Mestries E.¹, Auclert B.¹, Poisson-Bammé B.¹, Penaud A.¹, Grimault V.², Perrot S.², Robert A.², Roche S.³, Serre F.³, Tourvieille de Labrouhe D.³, Vear F.³, Boniface M.C.⁴, Bordat A.⁵, Pouilly N.⁴, Vincourt P.⁴, Muñoz S.⁴

¹ Terres Inovia (CETIOM), Grignon, Le Chaumoy et Toulouse

² SNES, GEVES, Beaucauzé

³ INRA, équipe Tournesol du GDEC, Clermont-Ferrand

⁴ INRA, équipe Génétique et Génomique Tournesol du LIPM, Toulouse

⁵ INRA, UMR Biologie du fruit et Pathologie, Bordeaux.

Correspondance : e.mestries@terresinovia.fr – Terres Inovia, Centre INRA de Toulouse, Bât. AGIR, 24 Chemin de Borde-Rouge, CS 52627, 31326 Castanet-Tolosan.

Résumé

La résistance quantitative du tournesol (*Helianthus annuus*) au mildiou (*Plasmopara halstedii*), mise en évidence récemment, est difficile à évaluer. Un réseau de onze expérimentations associant la GEVES-SNES, deux laboratoires de l'INRA et Terres Inovia a été construit afin de proposer une méthodologie permettant de mieux caractériser et quantifier cette résistance. En plus de lignées témoins, 17 lignées recombinantes obtenues par l'INRA et portant entre 0 et 3 QTL (quantitative trait loci) impliqués dans la résistance quantitative du tournesol au mildiou ont été testées face à 5 pathotypes de mildiou : 710, 704, 714, 304 et 334. Bien que des différences aient été observées entre laboratoires, les résultats ont permis de poser les bases d'un futur protocole utilisable en routine pour valoriser ce type de résistance dès la création variétale jusqu'à l'inscription puis la post-inscription des variétés.

Mots-clés : *Plasmopara halstedii*, résistance quantitative, phénotypage, conditions contrôlées.

Abstract: Assessing quantitative resistance of sunflower varieties to downy mildew during breeding and variety evaluation: a key stake for disease risk management

A quantitative resistance of sunflower (*Helianthus annuus*) to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) has been identified a few years ago. An experimental network involving several labs (GEVES-SNES, INRA and Terres Inovia) over several years aimed at describing and quantifying such a quantitative response. It was hoped to propose a methodology useable to improve sustainable resistance. In addition to check varieties and breeding lines, 17 recombinant inbred lines carrying 0 to 3 quantitative trait loci alleles for quantitative resistance were tested with five downy mildew pathotypes (710, 704, 714, 304, 334). While the experimental results revealed some discrepancies between experiments, this study provided a first experimental protocol to evaluate quantitative resistance both for breeding and for variety registration and development

Keywords: *Plasmopara halstedii*, quantitative resistance, phenotyping, controlled conditions.

Introduction

L'agent responsable du mildiou du tournesol (*Plasmopara halstedii*) est un parasite obligatoire, biotrophe, doué d'un fort pouvoir évolutif, à la fois en terme de virulence, d'agressivité et de résistance

au traitement de semences (Moinard *et al.*, 2006 ; notes communes DGAL/SDQPV-INRA-CETIOM, 1993 à 2015 ; Viranyi *et al.*, 2015). Organisme réglementé dans l'Union Européenne, cet oomycète fait l'objet d'une lutte obligatoire sur le territoire, qui doit mobiliser l'ensemble des méthodes de lutte disponibles : génétique, chimique et agronomique (arrêté du 9 Novembre 2005).

A ce jour, la lutte génétique passe essentiellement par l'exploitation de gènes de résistance spécifique appelés *PI* (Vear *et al.*, 2006). Elle a permis, associée à la lutte chimique, un bon contrôle de la maladie en culture jusqu'en 2000. Depuis, onze nouvelles races ont été détectées sur le territoire français. Des expérimentations ciblées sur les stratégies de gestion des gènes de résistance spécifique ont révélé une évolution très similaire de la virulence du mildiou en cas de mise en culture répétée de variétés exprimant les mêmes résistances et permis de montrer l'intérêt de l'alternance et du pyramidage de ces gènes pour le maintien de leur efficacité au cours du temps (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2005 et 2010).

En ce qui concerne la lutte chimique, malgré l'assouplissement de la réglementation en 2005, la proportion de semences traitées avec le seul fongicide autorisé (méfénoxam) commercialisées en France reste très élevée : entre 75 et 90% entre 2006 et 2014 (source : Union française des semenciers). Depuis 2008, la résistance du mildiou au traitement fongicide se confirme au sein des pathotypes « récents » identifiés depuis 2004 et touche en particulier la race 714, race dont l'extension sur le territoire ne cesse de progresser (DGAL/SDQPV *et al.*, 2015).

L'exploitation de la résistance quantitative (ou partielle) du tournesol permettrait de contribuer à augmenter la durabilité des résistances spécifiques et de réduire le recours quasi-systématique au traitement de semences. Les premiers travaux sur la résistance partielle du tournesol au mildiou ont été entrepris sous l'impulsion de l'INRA à Clermont-Ferrand après sa mise en évidence dans les essais VAT (valeur agronomique et technologique) conduits pour le CTPS (Comité technique permanent de la sélection). En effet, des variétés dépourvues de gène *PI* de résistance efficace vis-à-vis des races présentes montraient des niveaux d'attaque moindres qu'attendus. De même, dans le cadre des procédures d'inscription des variétés de tournesol au Catalogue Français, la SNES (Station nationale d'essais de semences) réalise chaque année des tests en laboratoire pour caractériser le comportement des variétés déposées face à différentes races de mildiou (1 à 9 races selon la demande des obtenteurs). Les résultats de ces tests montrent que des variétés, jugées sensibles, semblent présenter toutefois un certain degré de résistance partielle.

A partir de ce constat, partagé par les sélectionneurs, plusieurs expérimentations conduites en laboratoire par l'INRA à Clermont-Ferrand, par des semenciers et par Terres Inovia, complétées par des essais au champ en infection naturelle, ont permis de confirmer l'existence de ce type de résistance chez le tournesol. Ces observations répétées plusieurs années ont mis en évidence chez le tournesol cultivé des niveaux de résistance partielle élevés et exploitables en sélection (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2008 ; Vear *et al.*, 2008). Ainsi, parmi une collection de plus de 1000 lignées de *Helianthus annuus* cultivé représentant des origines génétiques très diverses, une cinquantaine d'entre elles, sans gène *PI* de résistance spécifique face aux races de mildiou présentes (703 et 710), a montré des niveaux de résistance quantitative intéressants : 10-20% de plantes attaquées contre 80 à 100% pour les génotypes les plus sensibles. Ces résultats ont été confirmés à partir d'un réseau multi-local d'expérimentations pluriannuelles sur un sous-ensemble d'une trentaine de lignées. A partir de ces résultats, l'analyse de croisements factoriels entre lignées d'intérêt a montré que cette résistance quantitative évaluée au champ était héritable, avec une forte aptitude générale à la combinaison. La recherche de QTL (Quantitative Trait Loci) impliqués dans la résistance quantitative a permis d'identifier trois QTL d'intérêt dont un situé sur le groupe de liaison 10 de la carte génétique du tournesol, expliquant dans une population de lignées recombinantes 30% à 40% de la variabilité de résistance pour la résistance quantitative au champ selon les années et 65% en conditions contrôlées (Vincourt *et al.*, 2012). Les travaux engagés sur la cartographie fine de ce QTL pour son exploitation en sélection (As-Sadi *et al.*, 2009 ; As-Sadi *et al.*, 2010) ont permis de créer des couples de lignées quasi-

isogéniques (presque identiques mais possédant ou non un allèle de résistance au QTL) qui constitueront un matériel de choix pour caractériser à terme la résistance quantitative.

La caractérisation de ce niveau de résistance quantitative n'est toutefois pas aisée. Les tests en laboratoire réalisés par l'INRA et le laboratoire de Pathologie de la SNES ont montré la complexité de la mesure de ce type de caractère dont l'expression dépend de nombreux facteurs qui sont souvent difficiles à gérer en enceinte de confinement (Serre *et al.*, 2008 ; Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2009). De plus, la majorité des travaux réalisés à ce jour ont porté principalement sur deux races, 710 et 703. Il est donc important de vérifier le caractère horizontal (*ie* non race-spécifique) de cette résistance, en explorant une gamme plus large de pathotypes, représentative de la variabilité rencontrée en culture à la fois en termes de virulence et d'agressivité (Sakr *et al.*, 2009).

L'objectif de ce projet est donc de mettre au point une méthode opérationnelle, reproductible, discriminante et fiable, permettant de mesurer le niveau de résistance partielle des génotypes de tournesol au mildiou en conditions contrôlées. Cette méthode, utilisable en sélection, devrait permettre aux sélectionneurs de valoriser leur travail lors de l'évaluation des variétés à l'inscription et de promouvoir ce type de résistance en post-inscription.

1. Le dispositif mis en place

L'ensemble des expériences antérieures de chacun des partenaires du projet a été mobilisé pour concevoir de nouveaux protocoles d'expérimentation. Sont présentées ici les expérimentations réalisées en laboratoires (répondant aux normes de confinement en vigueur).

Le matériel végétal

Le choix des témoins est particulièrement important dans les travaux sur la résistance quantitative. Il a été conçu de manière à explorer une gamme de niveaux de résistance (Tableau 1), avec :

- des témoins sensibles à toutes les races de mildiou connues, sans aucun gène *PI* de résistance spécifique ni aucun QTL de résistance : la lignée GB (lignée obtenue par l'INRA) ou la population Peredovik (VNIIMK, Russie) selon les expérimentations,
- quatre lignées obtenues par l'INRA bien connues car déjà utilisées lors des travaux antérieurs sur la résistance quantitative du tournesol au mildiou : FU, sans résistance spécifique face aux races testées, porte l'allèle de sensibilité au QTL du groupe de liaison 10. PSU7 et PR56, toutes deux sensibles aux races 710, 704 et 714 et résistantes aux races 304 et 334 (allèles *PI2* et *pl5*) se différencient par leur niveau de résistance quantitative : PSU7 n'en exprime pas, contrairement à PR56. Leur allèle au QTL du groupe de liaison 10 n'est toutefois pas connu. PAZ2 (*PI21*, *pl2*, *pl5*) est sensible aux races 710, 704, 714 et 334 et résistante à la race 304 ; elle porte l'allèle de résistance au QTL du groupe de liaison 10.
- une lignée résistante à toutes les races connues, RHA340 (USDA, USA), porteuse de l'allèle de résistance au locus du gène *PI8*, et choisie car elle exprime sa résistance à travers des symptômes de type II (la plante résistante réagit à l'infection tardivement et permet au mildiou, d'atteindre les cotylédons, contrairement à une résistance de type I pour laquelle le parasite est bloqué au niveau du collet après une infection racinaire).

Parmi le matériel créé pour la recherche de QTL impliqués dans la résistance quantitative, dix-sept lignées recombinantes issues des descendances du croisement entre les lignées XRQ et PSC8 (lignées INRA) ont été choisies pour porter des allèles de résistance ou de sensibilité quantitative au mildiou sur la base du génotype des marqueurs flanquant les trois QTL de résistance partielle identifiés dans ces descendances sur les groupes de liaison (LG) 7, 8 et 10 de la carte génétique du tournesol (Vincourt *et al.*, 2012). Elles permettent de couvrir une gamme de niveaux de résistance quantitative allant de 0 (pas

de résistance quantitative) à 4 (niveau élevé de résistance quantitative). Certaines d'entre elles présentent une résistance spécifique à tout ou partie des races de mildiou étudiées. Grâce au croisement de deux lignées quasi-isogéniques issues de la lignée recombinante RIL174, une population F2 en ségrégation pour le QTL de résistance au mildiou du LG10 seulement (QTL dénommé QRM1) a été créée. Pour plus de simplicité, cette population est dénommée « RIL174 » dans la suite de l'article.

Les lignées parentales des lignées recombinantes ont également fait partie du matériel testé : XRQ (*pl2*, *Pl5*) et PSC8 (*Pl2*, *pl5*) sont toutes deux résistantes à la race 304 mais diffèrent par leur comportement face aux races 710, 704, 714 (XRQ résistante et PSC8 sensible) et 334 (XRQ sensible et PSC8 résistante). Pour la résistance quantitative, XRQ porte l'allèle de résistance et PSC8 l'allèle de sensibilité aux 3 QTL identifiés.

Tableau 1 : Caractéristiques des génotypes témoins utilisés dans les expérimentations.

Lignée	Caractéristiques	Phénotype					Génotype		
		710	704	714	304	334	QRM1	<i>pl2</i>	<i>pl5</i>
Peredovik	Témoin sensible, sans aucune résistance	S	S	S	S	S	S	-	-
GB	Témoin sensible, sans aucune résistance	S	S	S	S	S	S	-	-
XRQ	Parent des RIL – <i>pl2</i> , <i>Pl5</i>	R	R	R	R	S	R	A	A
PSC8	Parent des RIL – <i>Pl2</i> , <i>pl5</i>	S	S	S	R	R	S	B	B
FU	Témoin – certain niveau de résistance quantitative	S	S	S	S	S	S	-	A
PAZ2	Témoin – <i>Pl21</i> , <i>pl2</i> , <i>pl5</i>	S	S	S	R	S	R	-	A
PR56	Témoin – <i>Pl2</i> , <i>pl5</i> – certain niveau de résistance quantitative	S	S	S	R	R	-	-	-
PSU7	Témoin – <i>Pl2</i> , <i>pl5</i> – pas de résistance quantitative	S	S	S	R	R	-	-	-
RHA340	Témoin résistant à toutes les races étudiées – <i>Pl8</i> - type II	R	R	R	R	R	-	-	-

Le choix des races de mildiou

La race 710 a été choisie car elle est la race de référence pour les travaux de recherche sur la résistance quantitative. Afin de travailler avec des races moins agressives et d'évaluer la spécificité de la résistance partielle face à différents pathotypes, quatre autres races choisies parmi les neuf races reconnues officiellement présentes sur le territoire français ont également été travaillées : 304, 334, 704 et 714. Le choix de la race 714 s'est avéré particulièrement pertinent, son installation sur le territoire ayant progressé de manière très rapide au cours du projet (DGAL/SDQPV *et al.*, 2015).

Le type et les modalités d'infection en laboratoire

En culture, les infections les plus fréquentes sont les attaques primaires au moment de la levée du tournesol : l'agent pathogène pénètre dans les tissus des plantules par les racines puis colonise les parties aériennes. Les partenaires du projet ont donc opté pour ce type d'infection pour les premières expérimentations en laboratoire (2012-2013). Afin de faciliter la mise en évidence de différences entre génotypes pour la résistance partielle, deux niveaux de compétition entre la plante hôte et l'agent pathogène ont été créés, en modulant le délai entre l'infection (au moment de la germination des graines) et la création de conditions d'humidité saturante par ensachage permettant l'expression des symptômes. Deux modalités ont donc été étudiées dans chaque laboratoire : un ensachage des plantules cinq ou six jours après infection et un ensachage douze jours après infection (référence).

Dans les conditions des quatre laboratoires partenaires, l'infection primaire (quel que soit le délai d'ensachage) s'est révélée trop sévère et n'a pas permis de discriminer les génotypes selon leur niveau attendu de résistance quantitative. En 2014, les expérimentations suivantes ont donc été menées en infection secondaire précoce, par pulvérisation d'une suspension de zoosporanges sur des plantules au stade « 1^{ère} paire de feuilles étalées », avec une seule modalité d'ensachage.

L'observation des symptômes

Chaque laboratoire a adapté le suivi des symptômes selon le niveau d'agressivité de son test. Deux grilles de notation des symptômes ont été utilisées : la grille SNES, qui prend en compte l'état de la plantule dans sa globalité (Figure 1) et la grille mise au point au LIPM, qui décrit les symptômes organe par organe (Figure 2) : cotylédons, première paire de feuilles, deuxième paire de feuilles. Pour chacun, sont notées la présence/absence de plages de nécroses (révélatrice d'une réaction d'hypersensibilité) et leur importance, la présence/absence de sporulation et son importance, la présence/absence de systémie, la présence/absence de mosaïque, la présence/absence de décoloration. Des notations de sporulation sur hypocotyle ont également été réalisées dans certains laboratoires (LIPM, CETIOM) ainsi que de fonte de semis ou d'état des cotylédons (SNES, GDEC). La plupart des expérimentations menées en 2012-2013 ont fait l'objet d'un suivi de l'évolution des symptômes, jusqu'à huit dates d'observations selon l'évolution de la sévérité de la maladie.

Trois critères quantitatifs ont été proposés comme indicateurs du niveau de résistance quantitative sur les expérimentations 2012-2013 : la durée de latence entre l'infection et la sporulation, l'intensité de la sporulation, par une évaluation du nombre de zoosporanges émis par unité de surface des organes de la plantule, la longueur de l'hypocotyle.

Une vue d'ensemble du dispositif

Au total, onze expérimentations ont été conduites en conditions de confinement (Tableau 2). L'objectif des expérimentations 2014 étant d'aboutir à un protocole opérationnel, compatible avec une activité de phénotypage en routine, la mesure des critères quantitatifs a été abandonnée car trop lourde à mettre en œuvre ; de même, les symptômes n'ont été observés qu'une seule fois, deux jours après l'ensachage. Chaque expérimentation a comporté deux à trois répétitions de dix plantes par génotype.

Tableau 2 : Récapitulatif des expérimentations menées en laboratoire.

Partenaire	Infection primaire (2012-2013)				Infection secondaire (2014)	
	Races	Observation des symptômes			Races	Observation des symptômes : échelle LIPM
		Echelle SNES	Echelle LIPM	Critères quantitatifs		
SNES	710 et 714	X	X	X	714 et 334	X
LIPM	710 et 304	-	X	X	-	-
GDEC	710 et 334	-	X	X	-	-
Terres Inovia	710 et 704	X	-	X	710	X

L'analyse des données

La démarche d'analyse des données adoptée a pour objectif de répondre aux questions suivantes :

- quelle est la capacité des protocoles testés à mettre en évidence des différences significatives de niveau de résistance quantitative entre génotypes et quelle est la stabilité du comportement des génotypes entre laboratoires ?
- peut-on relier le phénotype observé à la connaissance de la génétique des loci de résistance des génotypes testés ?
- peut-on confirmer le caractère non-race spécifique de la résistance quantitative au travers de la stabilité du comportement des génotypes entre races ?

Pour cela, les méthodes suivantes ont été utilisées :

- une analyse de la variance a été réalisée pour chaque critère observé sur les données plante à plante, selon un modèle linéaire avec les effets «génotype», «répétition» et

«interaction génotype x répétition» puis complétée par un test de comparaison de moyennes de Student-Newman-Keuls.

- l'index de résistance quantitative (RI) développé par Vincourt *et al.* (2012) et permettant de classer les génotypes selon leur niveau de résistance quantitative a été calculé sur les expérimentations en infection secondaire :

$$RI = \frac{(\text{nombre de plantes présentant une nécrose sans sporulation sur les feuilles infectées}) + 1,5 * (\text{nombre de plantes avec une décoloration sur les feuilles infectées}) + 2 * (\text{nombre de plantes saines})}{\text{nombre total de plantes}}$$

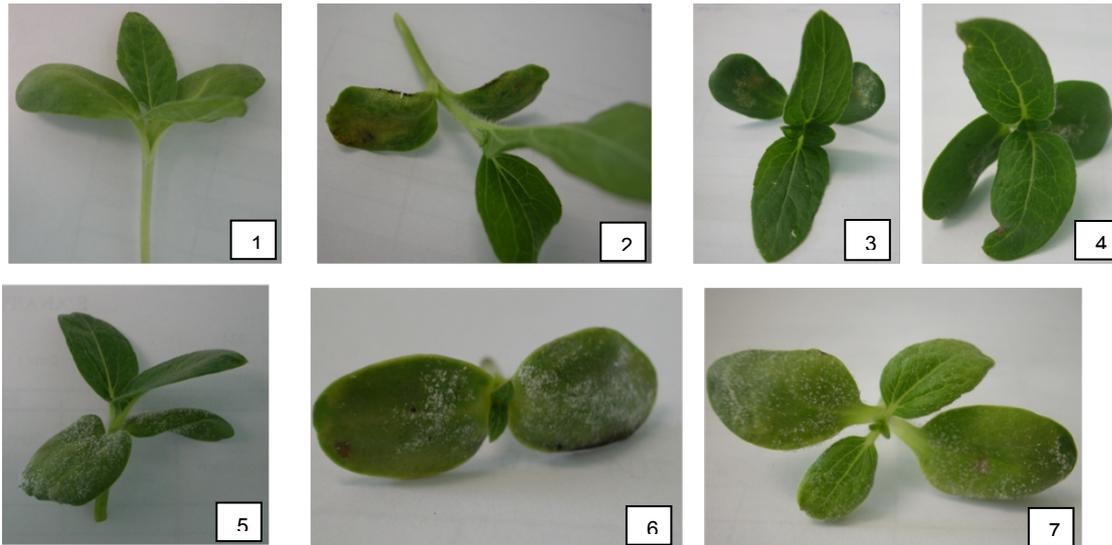
- une analyse factorielle des correspondances (AFC) a été réalisée sur les effectifs de chaque classe de symptôme au sein de chaque répétition (profils de comportement de chaque génotype par répétition). L'analyse de la variance (avec effets «génotype» et «répétition») des coordonnées de l'axe 1 de l'AFC a ensuite permis la représentation graphique conjointe des génotypes (Ismeans issues de l'analyse de la variance) et des symptômes (coordonnées issues de l'AFC) sur les deux premiers axes de l'AFC, pour la recherche de profils de symptômes associés à notre connaissance de la génétique des génotypes (ex. présence de nécroses d'hypersensibilité sur cotylédons et sur feuilles sans sporulation associée à un niveau élevé de résistance quantitative ?).

Ces analyses ont été mises en œuvre sur tout ou partie des expérimentations, et pour la plupart réalisées une première fois avec l'ensemble des génotypes étudiés dans chaque expérimentation puis une seconde fois en excluant les génotypes témoins exprimant une résistance spécifique face au pathotype utilisé, afin de mieux discerner la variabilité s'exprimant au sein du matériel sans résistance spécifique. Les lignées recombinantes exprimant de la résistance spécifique face à certaines races n'ont pas été exclues, l'idée étant de se placer dans la situation où la génétique du matériel végétal qui arrive en test n'est pas forcément connue de l'expérimentateur.

2. Résultats

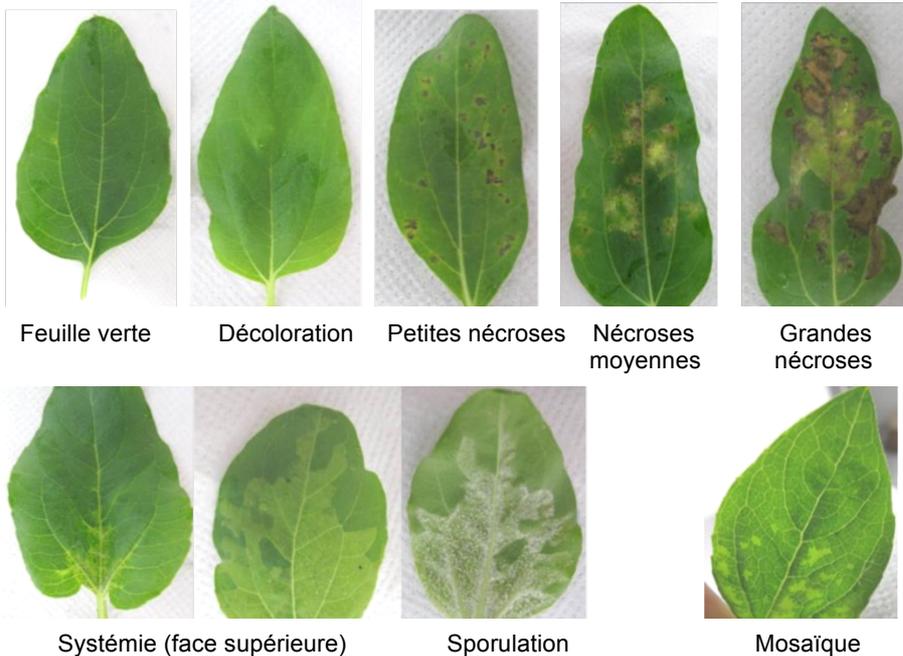
2.1 L'infection primaire ne permet pas suffisamment à la résistance quantitative de s'exprimer

Dans tous les laboratoires, les infections primaires ont conduit à des symptômes très importants sur les témoins sensibles, quelles que soient les races de mildiou utilisées. L'apparition des symptômes s'est parfois manifestée avant même l'ensachage des plantules : ceci a particulièrement été le cas dans le laboratoire de Terres Inovia, où des sporulations sur hypocotyle ont pu être observées entre sept jours et un jour avant ensachage selon les pathotypes et les modalités. De plus, dans tous les laboratoires, de nombreux génotypes n'ont pas eu le temps de mettre en place leur première paire de feuilles, détruits rapidement par une pourriture (fonte de semis) : par exemple, les conditions environnementales du laboratoire de l'INRA à Clermont-Ferrand font que des génotypes tels que la RIL002, dont le niveau de résistance quantitative attendu est très élevé (niveau 4), est déjà très touchée trois jours après ensachage (modalité 710, ensachage à douze jours). L'ensemble de ces observations témoigne donc de conditions très favorables à l'agent pathogène, ne laissant peu ou pas suffisamment le temps à la plante-hôte d'exprimer sa résistance quantitative.



Catégorie 1	Catégorie 2	Catégorie 3	Catégorie 4	Catégorie 5	Catégorie 6	Catégorie 7
Aucune sporulation sur cotylédons et sur feuilles	Hypersensibilité sans sporulation	Hypersensibilité avec sporulation sur cotylédons	Sporulation faible sur cotylédons	Sporulation forte sur cotylédons avec feuilles développées	Sporulation sur cotylédons avec petites ou absence de feuilles	Sporulation sur cotylédons et feuilles

Figure 1 : Echelle de notation des symptômes utilisée par la SNES (source : SNES).



Organe	Couleur de l'organe	Taille des nécroses	Sporulation	Symptômes de mosaïque	Système	Etat de l'organe
Cotylédons	Verts / décolorés	Petites / moyennes / grandes	Présence / absence	∅	∅	Desséchés / non desséchés
1 ^{ère} paire de feuilles	Verte / décolorée	Petites / moyennes / grandes	Présence / absence	∅	∅	Desséchée / non desséchée
2 ^{ème} paire de feuilles				Présence / absence	Présence / absence	

Figure 2 : Echelle de notation des symptômes développée par l'équipe Tournesol du LIPM (source : LIPM).

L'analyse des données acquises avec la race 710, utilisée dans les quatre laboratoires, permet par ailleurs de mettre en évidence des différences dans le niveau d'agressivité du test entre laboratoires, liées aux conditions environnementales de ceux-ci (substrat, éclairage, hygrométrie) : par exemple, pour la modalité d'ensachage à douze jours, les témoins avec un certain niveau de résistance quantitative, FU, PAZ2 et PR56, manifestent une forte proportion de plantes présentant une hypersensibilité avec sporulation sur cotylédons (classe 3) dans le laboratoire de Terres Inovia mais des symptômes plus sévères (forte sporulation sur cotylédons) dans le laboratoire de la SNES (classe 5). Ces résultats sont en accord avec les observations précédentes sur différents hybrides de tournesol soumis à une infection primaire dans deux chambres de culture différentes (Tourvieille *et al.*, 2009a).

Dans les quatre laboratoires, des différences significatives entre lignées (hors témoins exprimant de la résistance spécifique) ont pu être mises en évidence pour tout ou partie des variables observées pour les cinq races étudiées. Pour aller au-delà de ce résultat, il est plus intéressant de tenter de caractériser chaque lignée par une combinaison de critères phénotypiques plutôt que critère par critère. Cette recherche de « profils associés à la résistance quantitative » a été réalisée à travers la représentation conjointe des génotypes et des symptômes sur les analyses factorielles des correspondances. Construites avec tous les génotypes, puis sans les témoins avec résistance spécifique afin d'éclater la variabilité au sein des lignées recombinantes, cette démarche n'a toutefois pas permis d'associer des profils de critères phénotypiques à notre connaissance de la génétique des génotypes : la compréhension de la structuration des axes à partir des variables phénotypiques n'a pas ou rarement de sens biologique et leur association avec la génétique de la résistance des génotypes n'apparaît pas. A titre d'illustration, la Figure 3 montre l'absence de structuration des associations entre génotypes et symptômes suite à une infection primaire avec la race 710 (modalité d'ensachage à douze jours) dans le laboratoire du LIPM. De plus, il n'est pas possible de retrouver dans cette représentation l'expertise des expérimentateurs sur les types de symptômes (ou d'absence de symptômes) liés à l'expression de la résistance quantitative du tournesol au mildiou (Tableau 2).

Tableau 2 : Phénotypes liés à l'expression de la résistance quantitative du tournesol au mildiou d'après l'expertise des expérimentateurs du projet.

Partenaire	Infection primaire	Infection secondaire
Terres Inovia	Absence ou faible sporulation sur cotylédons Petites nécroses avec ou sans sporulation Absence de systémie	Petites nécroses sans sporulation sur cotylédons et feuilles Système sans sporulation sur feuilles
SNES	Résistance quantitative très difficile à mettre en évidence, les plantules n'ont pas le temps de mettre en place leur première paire de feuilles	Absence de sporulation Absence de systémie
LIPM	Nécroses sans sporulation Absence de sporulation sur cotylédons et sur feuilles quand elles existent	
GDEC	État des cotylédons (non pourris, pas marrons) > absence de sporulation Absence de sporulation sur l'hypocotyle	

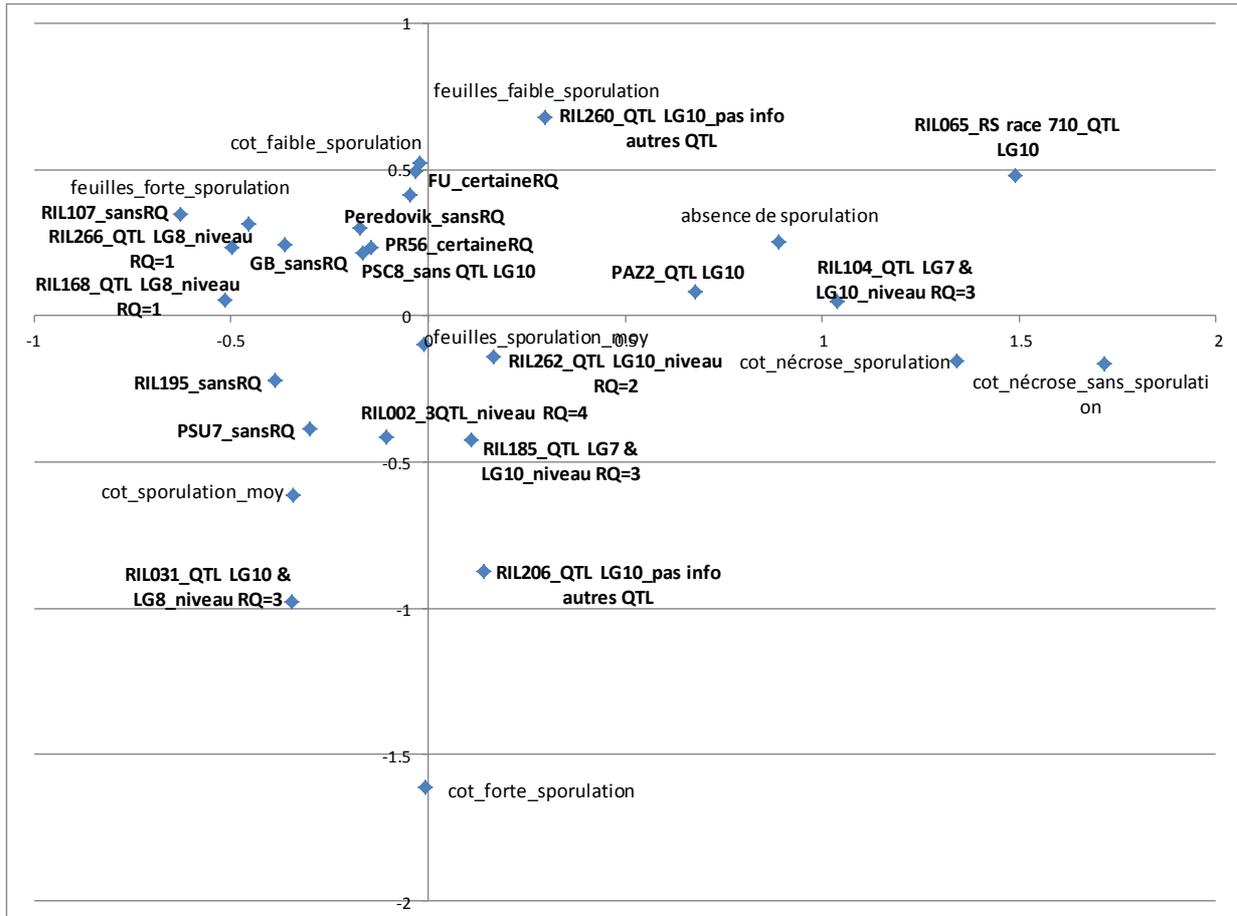


Figure 3 : Analyse factorielle des correspondances sur l'expérimentation du LIPM en infection primaire, avec la race 710, modalité d'ensachage à 12 jours, lecture des symptômes 6 jours après, hors témoins exprimant une résistance spécifique. Les deux premiers axes de l'AFC expliquent 48% de la variabilité observée (cot = cotylédons ; RS = résistance spécifique ; RQ = résistance quantitative).

2.2 En infection secondaire, l'index de résistance quantitative confirme son intérêt

Sur les expérimentations menées en 2014, l'index RI de résistance quantitative a été calculé sur les données par répétition pour chaque génotype, en excluant les témoins exprimant une résistance spécifique (RHA340 pour les 3 races, XRQ pour les races 710 et 714, PSC8 pour la race 334) afin de mieux évaluer la pertinence de cet index pour juger du niveau de résistance quantitative des génotypes testés (Tableau 3). La gamme d'index (moyenne des trois répétitions) varie de 0,37 à 0,72 pour la race 710, 0,30 à 0,53 pour la race 714 et 0 à 0,21 pour la race 334. Pour la race 710, cette gamme établie sur cinq génotypes seulement, s'inscrit pleinement dans celle mesurée par Vincourt *et al.* (2012) sur 136 lignées recombinantes XRQxPSC8 exprimant une gamme de niveau de résistance quantitative plus large face à cette race (entre 0 et 1,8).

Cet index apparaît très bien corrélé avec les coordonnées des génotypes sur l'axe 1 de l'AFC pour la race 710 ($r = 0,80$, significatif au seuil de 5%). Cette relation apparaît moins forte pour la race 714 ($r = 0,46$, non significatif) et la race 334 ($r = 0,62$, non-significatif). Pour ces deux races, l'infection a eu lieu un peu tardivement, sur la deuxième paire de feuilles et l'index a été calculé en prenant en compte le nombre de plantes présentant une décoloration sur la première paire de feuilles, cette information n'étant pas disponible sur la paire de feuilles infectées. De plus, le nombre de génotypes testés ici est très faible (seulement cinq). Ces résultats sont donc fragiles mais encourageants.

Tableau 3 : Index de résistance quantitative moyen des génotypes évalués en infection secondaire précoce face à trois races de mildiou.

Génotype	Race 710	Race 714	Race 334
Peredovik	0,35	0,30	0,20
FU	0,42	0,23	0,00
RHA340	-	-	-
XRQ	-	-	0,21
PSC8	0,35	0,23	-
RIL056	0,65	0,30	0,07
RIL174	0,59	0,53	0,15

2.3 Le caractère non-race spécifique de la résistance quantitative reste à confirmer

Compte-tenu de la difficulté d'aborder cette question à partir des expérimentations en infection primaire en raison de la sévérité de ce type d'infection, cette question est abordée uniquement à travers les expérimentations en infection secondaire conduites avec trois pathotypes : 710, 714 et 334.

Malgré un développement trop rapide des plantules qui a conduit à réaliser la contamination au stade « 2^{ème} paire de feuilles » avec les races 714 et 334, et une faible agressivité de l'isolat de la race 710, des différences significatives se révèlent entre génotypes (hors témoins exprimant une résistance spécifique face aux races utilisées) pour chaque race pour tout ou partie des variables permettant de décrire le phénotype des plantules (Tableau 4).

Tableau 4 : Valeurs de P-value pour l'effet « génotype » sur les expérimentations en infection secondaire pour trois races, hors témoins exprimant de la résistance spécifique face aux races utilisées (cot = cotylédons, feuil1 = 1^{ère} paire de feuilles, feuil2 = 2^{ème} paire de feuilles, nec = nécrose d'hypersensibilité, spo = présence de sporulation, nospo = absence de sporulation, syst = présence de systémie).

Variables phénotypiques observées	P-value de l'effet "génotype"		
	714	334	710
cot_nec_nospo	0.0001	0.0000	0.0000
feuil1_nec_spo	0.0000	0.0000	0.0016
feuil1_nec_nospo	0.0000	0.2263	0.7410
feuil2_nec_spo	0.0002	0.0000	0.6268
feuil2_nec_nospo	0.1174	0.0005	-
feuil1_decoloration	0.0166	0.0234	0.1881
feuil2_decoloration	-	-	0.0000
feuil1_syst_spo	-	-	0.0004
feuil1_syst_nospo	-	-	0.0210
feuil2_syst_spo	-	0.8837	-
feuil2_syst_nospo	0.8988	0.8835	0.6358
feuil1_mosaïque	-	-	0.0000
feuil2_mosaïque	0.3646	0.6761	0.2435

La stabilité de l'efficacité de la résistance quantitative selon les races de mildiou utilisées peut être étudiée à travers le comportement des génotypes RIL56 (hétérozygote au QTL du LG7 et porteuse de l'allèle de résistance au QTL du LG10) et RIL174, en ségrégation au QTL du LG10 (figure 4).

L'efficacité du QTL situé sur le LG 10, QTL expliquant la part la plus importante de résistance quantitative de la descendance XRQxPSC8 face à la race 710 (Vincourt *et al.*, 2012), semble s'exprimer face aux races 710 et 714 pour la RIL174 et la RIL56 : le phénotype moyen de ces deux génotypes correspond en effet à des symptômes associés à la résistance sur cotylédons et feuilles : présence de

nécroses d'hypersensibilité sans sporulation, décoloration. Par contre, leur phénotype suite à une infection par la race 334 apparaît plutôt de type sensible, associé sur l'AFC à une pourriture des plantules (variable « fonte_semis ») pour la RIL174 et à la présence de nécrose et systémie sur feuilles associées à des sporulations pour la RIL56. Ainsi, dans les conditions expérimentales du laboratoire de la SNES, en infection secondaire, l'efficacité du QTL de résistance quantitative du LG10 s'exprimerait vis-à-vis de la race 714 mais pas de la race 334. Ce résultat reste toutefois à confirmer sur une gamme plus large de génotypes en cours de développement à l'INRA à Toulouse.

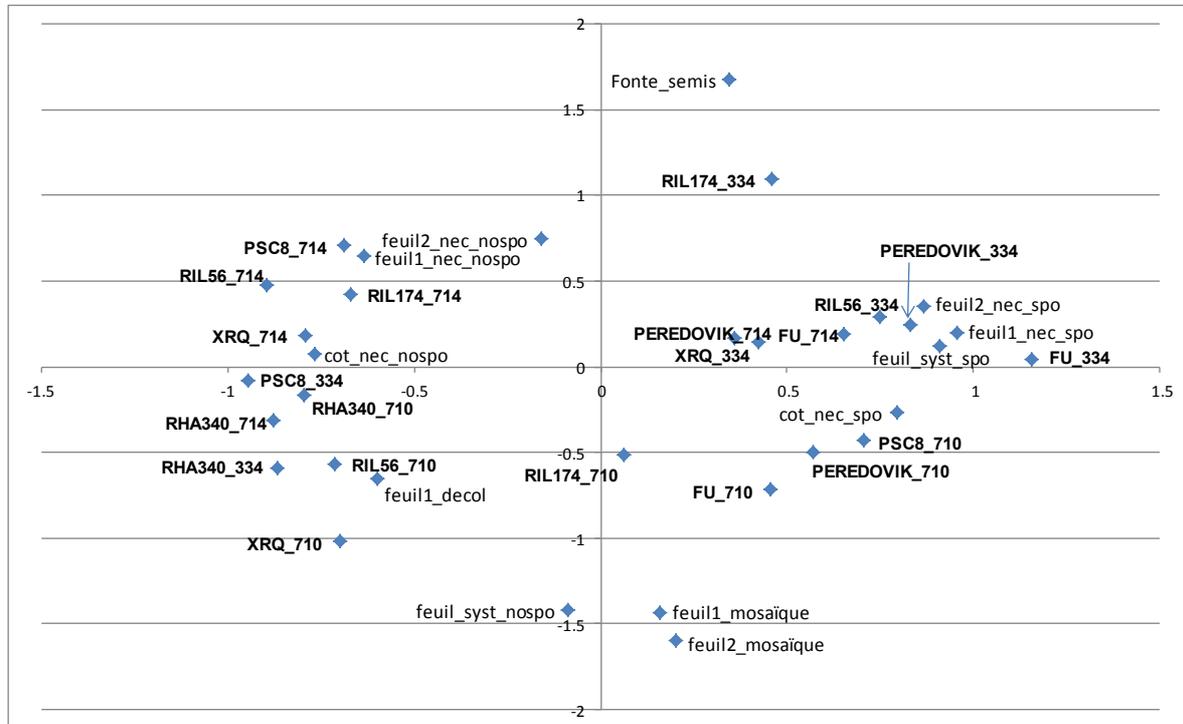


Figure 4 : Analyse factorielle des correspondances sur l'ensemble des trois expérimentations en infection secondaire, tous génotypes confondus. Les deux premiers axes de l'AFC expliquent 46% de la variabilité observée (cot = cotylédons, feuil1= 1^{ère} paire de feuilles, feuil2 = 2^{ème} paire de feuilles, nec = nécrose d'hypersensibilité, spo = présence de sporulation, nospo = absence de sporulation, decol = décoloration, syst = présence de systémie).

Conclusion et perspectives

Suite à l'élaboration de deux protocoles par les partenaires du projet, onze expérimentations (en laboratoire ont été conduites. Elles ont permis d'explorer une gamme de vingt-six génotypes (génotypes témoins et lignées recombinantes produites par l'INRA portant entre zéro et trois QTL impliqués dans la résistance quantitative du tournesol au mildiou) et ont mis en jeu cinq pathotypes de mildiou (710, 704, 714, 304 et 334). Au total, environ onze mille plantules ont été contaminées et observées.

La comparaison du comportement des génotypes au sein d'une même expérimentation ou entre expérimentations est complexe parce que chaque génotype se caractérise par la répartition de ses individus dans un ensemble de classes de symptômes qui ne sont pas indépendantes entre elles : ainsi, la sporulation sur feuilles peut par exemple être affectée par la sporulation sur cotylédons. Il est donc nécessaire de tenir compte du « profil de symptômes » dans sa globalité et de ne pas raisonner uniquement symptôme par symptôme. De plus, le profil génétique des génotypes utilisés est déterminant dans l'interprétation des résultats. Or, nous ne disposons pas toujours d'une connaissance très fine du profil génétique des génotypes utilisés, ce qui a compliqué cette interprétation. La construction récente de génotypes quasi-isogéniques pour le QTL du groupe de liaison 10 et les gènes

de résistance spécifique *PI2* et *PI5* par l'équipe du LIPM fournira des ressources génétiques très utiles pour la poursuite des travaux car il permettra de juger plus efficacement de la pertinence du protocole d'évaluation de la résistance quantitative proposé.

En infection primaire, mode d'infection privilégié dans le projet car identique à celui qui se manifeste en conditions réelles de culture, une forte variabilité des réponses a été mise en évidence entre laboratoires, confirmant les travaux antérieurs (Tourvieille *et al.*, 2009a). Le protocole proposé montre sa capacité à mettre en évidence des différences significatives entre génotypes, mais celles-ci n'apparaissent pas en lien avec le niveau de résistance quantitative des génotypes. Il n'a en effet pas été possible d'identifier une combinaison de critères d'intérêt pour le screening de génotypes spécifiques à chaque laboratoire afin de tenir compte de l'agressivité du test dans chacun. Les critères quantitatifs tels que le délai entre l'infection et l'expression de premiers symptômes et la longueur de l'hypocotyle n'apparaissent pas, sur le set de génotypes exploré, révélateurs du niveau de résistance quantitative de ces génotypes. Ce type d'infection semble donc trop sévère pour juger du niveau de résistance partielle du tournesol au mildiou. Mis au point pour mettre en évidence le rôle de gènes majeurs à hérédité simple, et donc faire émerger des réponses mécanistes (type résistant/sensible), ce protocole d'infection primaire en conditions contrôlées ne s'avère pas adapté pour la mise en évidence de réponses plus complexes de type quantitatif. Le niveau d'agressivité du test apparaît donc déterminant pour pouvoir accéder à la résistance quantitative et un optimum d'agressivité résultant à la fois de l'agressivité intrinsèque de l'isolat utilisé et des conditions environnementales doit probablement être trouvé. De plus, une résistance quantitative peut être « résistance spécifique dépendante », donc ne s'exprimer, et notamment à la faveur de conditions environnementales spécifiques, que dans un contexte de « résistance spécifique » particulier.

A ce sujet, le caractère non-race spécifique de la résistance quantitative du tournesol au mildiou n'a pu être confirmé pour tous les QTL à partir des données acquises lors des expérimentations mises en œuvre dans ce projet. Il semble toutefois que le QTL à effet le plus fort du groupe de liaison 10 montre une efficacité face à la race 714 en plus de la race 710.

La cohérence des résultats entre le laboratoire et le champ n'a pas pu être explorée de manière satisfaisante au cours du projet, en raison d'infections insuffisantes dans les expérimentations au champ. Cette question reste donc en suspens, la confirmation au champ (idéalement en allant jusqu'au rendement pour convaincre les distributeurs et producteurs de l'efficacité de ce type de résistance) étant indispensable pour valider un protocole opérationnel en laboratoire.

Toutefois, les grandes lignes d'un protocole opérationnel en laboratoire pour caractériser la résistance quantitative des génotypes peuvent être proposées suite à ce travail :

- une infection secondaire précoce, au stade « 1^{ère} paire de feuilles étalées », avec un isolat dont le niveau d'agressivité devrait être évalué au préalable, par exemple à travers les dégâts occasionnés sur une lignée de tournesol multi-sensible telle que la lignée GB. Des travaux antérieurs ont en effet montré qu'un excès d'agressivité (issu de l'adaptation de l'isolat aux conditions du laboratoire) ou qu'une agressivité insuffisante peuvent conduire à une mauvaise interprétation du phénotype du matériel étudié (Tourvieille *et al.*, 2009b).
- une description des symptômes sur les organes infectés : l'index de résistance RI défini par Vincourt *et al.* (2012) prenant en compte le nombre de plantes saines ainsi que la présence de décoloration et de nécroses sans sporulation sur les organes infectés semble en effet être un indicateur prometteur pour les tests en infection secondaire précoce. Il reste toutefois à confirmer sur une gamme de génotypes hybrides dans des laboratoires autres que celui du LIPM où il a été construit et s'est confirmé depuis.
- une seule date d'observation des symptômes, le suivi de l'évolution des symptômes sur plusieurs jours n'étant pas opérationnel en routine. Le délai de deux semaines entre l'infection et l'observation des symptômes (12 jours d'incubation puis 2 jours d'ensachage

pour l'expression des symptômes) permet la mise en évidence de différences entre génotypes dans les expérimentations conduites en 2014 dans ce projet et dans celles menées précédemment dans les laboratoires de la SNES et de l'INRA.

- un set de témoins sous forme hybride présentant une gamme de niveau de résistance quantitative, set qui est à construire aujourd'hui et qui permettra une évaluation plus sûre du matériel hybride qui arrive à l'inscription ou en post-inscription.
- enfin, soulignons toute l'importance de l'expertise des expérimentateurs dans la conduite des expérimentations, leur suivi et l'observation des symptômes, ceux-ci étant parfois assez difficiles à identifier.

Dans une activité d'évaluation variétale, ce protocole devra être associé à un test classique en infection primaire tel que réalisé par les sélectionneurs et la SNES aujourd'hui pour l'identification des résistances spécifiques dans le matériel.

Remerciements

La coordinatrice du projet souhaite remercier très vivement l'ensemble des équipes techniques qui ont assumé les expérimentations de ce projet. Un grand merci également à Célia Pontet (Terres Inovia) pour son expertise en statistiques.

Ce travail a bénéficié du soutien financier du CASDAR à travers le projet CTPS n°C2011-04 « Mise au point d'une méthodologie de mesure de la résistance partielle du tournesol au mildiou (*Plasmopara halstedii*) pour sa prise en compte dans les programmes de sélection et dans les procédures d'évaluation variétale pour une gestion durable du risque », associant Terres Inovia, l'INRA et le GEVES et proposé dans le cadre d'un soutien méthodologique aux Sections CTPS.

Références bibliographiques

As-Sadi F., Pouilly N., Boniface M.-C., Bordat A., Bellec A., Helmstetter N., Vautrin S., Berges H., Tourvieille de Labrouhe D., Vear F., Vincourt P., Godiard L., 2009. Towards the characterization of a Quantitative Resistance to Downy Mildew in cultivated Sunflower, *Helianthus annuus*. 22nd New Physiologist Symposium - Effectors in Plant-Microbe Interactions, Versailles (France).

As-Sadi F., Pouilly N., Boniface M.C., Bordat A., Bellec A., Helmstetter N., Vautrin S., Berges H., Tourvieille de Labrouhe D., Vear F., Brunel D., Lespalier M.C., Gouzy J., Carrere S., Vincourt P., Godiard L., 2010. Two genomic based approaches towards a better sustainability to sunflower *Helianthus annuus* resistance to downy mildew *Plasmopara halstedii*. Eur. Sunflower Biotech. Conf., 1-3 march, Antalya (Turkey).

DGAL/SDQPV, Terres Inovia, INRA, 2015. Note commune Mildiou du tournesol (*Plasmopara halstedii*), 2 p.
http://www.terresinovia.fr/fileadmin/cetiom/Cultures/Tournesol/maladies/note_commune_mildiou_tournesol_2015.pdf

Moinard J., Mestries E., Penaud A., Pinochet X., Tourvieille de Labrouhe D., Vear F., Tardin M.C., Pauchet I., Eychenne N., 2006. Le mildiou du tournesol : mieux le connaître pour mieux gérer le risque, un enjeu majeur pour la culture du tournesol en France. Phytoma – La défense des Végétaux 586, 33-43.

Sakr N., Ducher M., Tourvieille J., Walser P., Vear F., Tourvieille de Labrouhe D., 2009. A method to measure aggressiveness of *Plasmopara halstedii* (Sunflower Downy Mildew). Journal of Phytopathology 157(2), 133-136.

Serre F., Walser P., Roche S., Vear F., Tourvieille de Labrouhe D., 2008. Research on a growth chamber test to measure quantitative resistance to sunflower downy mildew. Proc. 17th International Sunflower Conference, Córdoba, Spain, vol.I, 109-114.

Tourvieille de Labrouhe D., Serre F., Walser P., Roche S., Vear F., 2008. Quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus*). Euphytica 164(2), 433-444. DOI 10.1007/s10681-008-9698-1.

Tourvieille de Labrouhe D., Mestries E., Walser P., 2005. Quelles perspectives pour la lutte génétique vis-à-vis du mildiou du tournesol ? *Oléagineux Corps gras Lipides* 12, 85-93.

Tourvieille de Labrouhe D., Grimault V., Serre F., Penaud A., Perrot S., Walser P., Mestries E., 2009a. Evaluation de la résistance quantitative du tournesol au mildiou (*Plasmopara halstedii*). *IXème Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes*, AFPP, Tours, France, 9-10 Décembre 2009, p. 319.

Tourvieille de Labrouhe D., Walser P., Serre F., Tourvieille J., 2009b. Variabilité de l'agressivité de *Plasmopara halstedii*, étude de sa stabilité en test de laboratoire. *Oléagineux Corps gras Lipides* 16(1), 52-57.

Tourvieille de Labrouhe D., Bordat A., Tourvieille J., Mestries E., Walser P., Sakr N., Ducher M., Delmotte F., Vear F., 2010. Impact of major gene resistance management for sunflower on fitness of *Plasmopara halstedii* (downy mildew) populations. *Oléagineux Corps gras Lipides* 17(1), 56-64.

Vear F., Serre F., Roche S., Walser P., Tourvieille de Labrouhe D., 2006. Recent research on downy mildew resistance useful for breeding industrial – use sunflowers. *ISA Symposium on Sunflower Industrial Uses*, 10-13 September 2006, Udine, Italy.

Vear F., Serre F., Jouan I., Bert P.F., Roche S., Walser P., Tourvieille de Labrouhe D., Vincourt P., 2008. Inheritance of quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus*). *Euphytica* 164(2), 561-570.

Viranyi F., Gulya T., Tourvieille de Labrouhe D., 2015. Recent changes in the pathogenic variability of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) populations from different continents. *Helia* ISSN (Online) 2197-0483, ISSN (Print) 1018-1806, DOI: 10.1515/helia-2015-0009, August 2015.

Vincourt P., As-Sadi, F., Bordat A., Langlade N.B., Gouzy J., Pouilly N., Lippi Y., Serre F., Godiard L., Tourvieille de Labrouhe D., Vear F., 2012. Consensus mapping of major resistance genes and independant QTL for quantitative resistance to sunflower downy mildew. *Theor. Appl. Genet.* 125, 909-920.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL)